



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Carolina de Jesus de Camargo

NANOCARREADORES DE siRNAs COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NA
CERATITE AMEBIANA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE FRENTE A *Acanthamoeba castellanii*

Florianópolis

2021

Carolina de Jesus de Camargo

**NANOCARREADORES DE siRNAs COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NA
CERATITE AMEBIANA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE FRENTE A *Acanthamoeba castellanii***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.
Orientadora: Prof. Karin Silva Caumo, Dr^a.
Coorientadora: Adny Henrique Silva, Dr^a.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Camargo, Carolina de Jesus de
NANOCARREADORES DE siRNAs COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NA
CERATITE AMEBIANA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE FRENTE A *Acanthamoeba castellanii* / Carolina
de Jesus de Camargo ; orientadora, Karin Silva Caumo,
coorientadora, Adny Henrique Silva, 2021.

89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Acanthamoeba* spp.. 3. silenciamento
gênico. 4. encistamento. I. Caumo, Karin Silva . II.
Silva, Adny Henrique . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Carolina de Jesus de Camargo

**NANOCARREADORES DE siRNAs COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NA
CERATITE AMEBIANA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE FRENTE A *Acanthamoeba castellanii***

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Thiago Caon, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Marilise Brittes Rott, Dr.(a)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.(a) Evelyn Winter, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia.

Coordenadora: Prof^ª. Dr^ª. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Karin Silva Caumo, Dr.(a) - Orientador(a)

Adny Henrique Silva, Dr.(a) - Corientador(a)

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado à minha família, em especial aos meus avós Eduardo (*in memorian*), Rosalina e Maria (*in memorian*) por todo o incentivo em meus estudos e caminho que segui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por guiar minhas escolhas, conduzir meu caminho e adicionar pessoas essenciais a minha formação nestes últimos anos.

À minha família, por apoiar e compreender que a ausência e distância eram necessárias para atingir meus objetivos. Muito obrigada por estarem ao meu lado nas escolhas, apoiarem meus passos e por sempre me receberem com muito amor e festas. Em especial, ao meu pai, por ser meu exemplo de superação e de que o estudo é nossa base. À minha mãe, por ter me dado suas mãos e trilhado este caminho ao meu lado, somente você sabia o quanto eu precisava da sua presença. À minha terceira mãe, Tânia, obrigada por toda dedicação em minha criação. Aos meus irmãos: Kelvin, João Pedro e Bernardo. À minha amada prima Maria Paula, seus conselhos e diversos áudios trouxeram a paz necessária para suportar a distância e dificuldades. Aos meus avós maternos, por me criarem com todo amor e zelo, e serem casa e abrigo em todos esses anos.

Ao meu noivo, pelos últimos 7 anos de amor e apoio nas minhas escolhas. Obrigada por me amar mesmo nos dias de turbulência, ter paciência, ajudar na edição de todos os vídeos, ouvir atentamente meus ensaios para apresentações e por simplesmente me abraçar quando foi necessário. Quando olho para você tenho a certeza de que estamos trilhando uma bela jornada de amor, cumplicidade e parceria. Obrigada também por permitir que nosso pequeno terror entrasse na família, alegrasse nossa pandemia e o final do meu mestrado.

À minha orientadora professora Dr.^a Karin Silva Caumo, por ter aberto as portas de seu laboratório em 2015 e me apresentado com muito amor e zelo a vida de cientista no Brasil. Obrigada por acreditar em meu potencial e por toda a troca de conhecimento ao longo destes anos. As amebas não seriam tão apaixonantes sem sua dedicação e amor ao que faz.

À minha coorientadora Dr.^a Adny Henrique Silva, por todo suporte, ensinamentos e por ter ido para a bancada e enfrentado comigo as dificuldades.

A todas as equipes que passaram pelo Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas (LAPEO), vocês tornaram meus dias alegres com cafés e discussões de quem era a vez de levar o óxido. Em especial a Fabiana Casara, Maria Luiza Carneiro Büchele, Jaqueline da Silveira, Paula Monteiro, Tháís Castro e nossa eterna Deborinha. Aos meus ICs, Arthur e Higor, por terem preparados inúmeros meios, lavado muita louça e me acompanhado neste desafio.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia e Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao CNPq pelo fomento ao projeto.

A todos que direta ou indiretamente se fizeram presentes e auxiliaram a realização deste trabalho.

“Ensinarão-me que o caminho do progresso não era rápido nem fácil.”

(Marie Curie)

RESUMO

A ceratite amebiana é uma inflamação da córnea, considerada grave e de difícil tratamento, causada por *Acanthamoeba* spp. As membranas dos trofozoítos e parede dos cistos de *Acanthamoeba* spp., apresentam componentes essenciais como o ergosterol e celulose. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi preparar e avaliar nanocarreadores de siRNAs para o silenciamento das enzimas 14 α -demetilase (14alpha) e glicogênio fosforilase (Glico) e seus efeitos sinérgicos em *Acanthamoeba castellanii*. Como carreadores utilizou-se nanopartículas híbridas (NP) e nanoemulsão lipídica (NE), preparadas e caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta. Para avaliação dos efeitos das formulações em *Acanthamoeba* spp., trofozoítos foram incubados em meio PYG e em meio de indução de encistamento (NEM) com os nanocarreadores com siRNAs (NP_Glico, NP_14alpha, NE_Glico, NE_14alpha) e na ausência de siRNAs (NK) por contagem em hemocitômetro e pelo ensaio de AlamarBlue®. A citotoxicidade das NE foi avaliada pelo ensaio do MTT em células de córnea de coelho (SIRC). O silenciamento gênico foi avaliado por reação em cadeia da polimerase em tempo real após incubação dos trofozoítos em meio NEM por 15 h com as formulações de NE. A microscopia confocal confirmou a capacidade dos sistemas em promover o escape endossomal e entregar os siRNAs. As NE se mantiveram adequadas para utilização ocular durante os 21 dias analisados, e as NP perderam sua estabilidade com aumento considerável de tamanho e PdI após 7 dias. Ambos os carreadores apresentaram potencial zeta negativo. No tratamento dos trofozoítos com a formulação NP_14alpha não houve diminuição da viabilidade, já NP_Glico ocorreu a queda de 17% em 96 h. Após incubação no meio NEM, NP_14alpha e NP_Glico foram capazes de diminuir 10% dos cistos formados. Na concentração de 1 μ M com a NP, observou-se diminuição da formação de cistos maduros em maior porcentagem, porém devido aos precipitados de cálcio visualizados optou-se em parar as análises com este carreador. Quando as nanoemulsões foram incubadas com os trofozoítos, observou-se diminuição das formas de 32% para NK_Glico e NE_Glico, além de 57% e 33% na presença de NK_14alpha e NE_14alpha, respectivamente. Quando tratados com ambos siRNAs (G14), para NK_G14 e NE_G14 apresentaram diminuição da viabilidade dos trofozoítos de 45% e 51%, respectivamente. Após incubação em meio NEM, com NK_Glico e NE_Glico houve queda de 30% e 13% na formação dos cistos, e NE_G14 foi capaz de diminuir 18%. A citotoxicidade em células SIRC manteve-se superior a 90%. Observou-se a redução da expressão dos genes glicogênio fosforilase e 14 α -demetilase de 20% (NE_Glico) e 21% (NE_14alpha) em relação aos controles. A partir dos resultados pode-se concluir que ambos os nanocarreadores foram eficientes na entrega de siRNA em *A. castellanii*. O carreador NE contendo siRNAs para os genes alvos utilizados é promissor para a aplicação na terapia gênica ocular associada a fármacos no tratamento da ceratite amebiana.

Palavras-chave: *Acanthamoeba* spp.; siRNA; silenciamento gênico; encistamento.

ABSTRACT

Amoebic keratitis is a corneal inflammation, considered severe and difficult to treat, caused by *Acanthamoeba* spp. The trophozoites membranes and the *Acanthamoeba* spp. cysts walls have essential components such as ergosterol and cellulose. Therefore, the aim of the present work was to prepare and evaluate siRNA nanocarriers for the silencing of 14 α -demethylase (14 α) and glycogen phosphorylase (Glyco) enzymes and their synergistic effects in *Acanthamoeba castellanii*. Hybrid nanoparticles (NP) and lipid nanoemulsion (NE) were used as carriers, prepared and characterized in terms of size, polydispersion index (Pdl) and zeta potential. To evaluate the effects of the formulations on *Acanthamoeba* spp., trophozoites were incubated in PYG medium and in encystment induction (NEM) medium with nanocarriers with siRNAs (NP_Glico, NP_14 α , NE_Glico, NE_14 α) and in the absence of siRNAs (NK) by counting in a hemocytometer and by the AlamarBlue® assay. The cytotoxicity of NE was evaluated by the rabbit corneal cell MTT assay (SIRC). Gene silencing was evaluated by real-time polymerase chain reaction after trophozoites incubation in NEM medium for 15 h with the NE formulations. Confocal microscopy confirmed the system's ability to promote endosomal escape and deliver siRNAs. NE remained adequate for ocular use during the 21 days analyzed, and NP lost its stability with a considerable increase in size and Pdl after 7 days. Both carriers had negative zeta potential. In the treatment of trophozoites with the NP_14 α formulation, there was no decrease in viability, whereas NP_Glico had a 17% drop in 96 h. After incubation in NEM medium, NP_14 α and NP_Glico were able to reduce 10% of the cysts formed. At a concentration of 1 μ M with NP, there was a decrease in the formation of mature cysts in a greater percentage, however, due to the calcium precipitates seen, it was decided to stop the analysis with this carrier. When the nanoemulsions were incubated with trophozoites, there was a reduction of 32% of forms for NK_Glico and NE_Glico, in addition to 57% and 33% in the presence of NK_14 α and NE_14 α , respectively. When treated with both siRNAs (G14), for NK_G14 and NE_G14 they presented decreased trophozoite viability of 45% and 51%, respectively. After incubation in NEM medium, with NK_Glico and NE_Glico, there was a decrease of 30% and 13% in the formation of cysts, and NE_G14 was able to decrease 18%. Cytotoxicity in SIRC cells remained above 90%. There was a reduction in the expression of glycogen phosphorylase and 14 α -demethylase genes of 20% (NE_Glico) and 21% (NE_14 α) compared to controls. From the results, it can be concluded that both nanocarriers were efficient in delivering siRNA in *A. castellanii*. The NE carrier containing siRNAs for the target genes used is promising for application in drug-associated ocular gene therapy in the treatment of amoebic keratitis.

Keywords: *Acanthamoeba* spp.; siRNA; gene silencing; encystment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formas de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	24
Figura 2- Lectina em <i>Acanthamoeba</i> spp.	25
Figura 3- Modelo hipotético da biossíntese de celulose em <i>Acanthamoeba</i> spp.....	27
Figura 4- Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp.	31
Figura 5- Representação esquemática das camadas da córnea	33
Figura 6- Estrutura do olho	34
Figura 7- Mecanismo de ação de pequenos RNAs de interferência	37
Figura 8- Sistemas nanocarreadores de siRNAs	39
Figura 9- Estrutura química da L- α -fosfatidilcolina de ovo	42
Figura 10- Ilustração esquemática do preparo de nanopartícula híbrida contendo siRNAs	46
Figura 11- Ilustração esquemática do preparo da nanoemulsão lipídica contendo siRNAs	47
Figura 12 - Avaliação da estabilidade da formulação de nanopartículas híbridas a 4° C.....	53
Figura 13 - Avaliação da estabilidade da formulação da nanoemulsão lipídica a 4 °C.	55
Figura 14- Análise por microscopia confocal de trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> tratados com a formulação de nanopartículas híbridas e siRNA_Cy5.....	56
Figura 15 - Análise por microscopia confocal de trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> tratados com nanoemulsão lipídica.	57
Figura 16 - Viabilidade dos trofozoítos e cistos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> após tratamento com nanopartículas híbridas, na presença e ausência de siRNAs.	59
Figura 17- Morfologia dos trofozoítos após incubação com a formulação de nanopartículas híbridas.....	60
Figura 18 - Cistos viáveis após tratamento com a formulação de nanopartículas híbridas carreadoras de siRNAs.....	61
Figura 19 - Agregados formados após incubação das células com NP_siRNA na concentração de 1 μ M	61

Figura 20 - Viabilidade dos trofozoítos após tratamento com nanoemulsão lipídica carreadora de siRNAs.	62
Figura 21- Viabilidade dos cistos após tratamento com nanoemulsão lipídica carreadora de siRNAs.	63
Figura 22 - Coloração com branco de calcoflúor após 96h de tratamento com as formulações da nanoemulsão carreadoras de siRNAs.	64
Figura 23- Viabilidade de células de córnea de coelho (ATCC® - CCL 60) frente a formulações da nanoemulsão lipídica com e sem siRNA.....	66
Figura 24 - Análise quantitativa da expressão dos genes glicogênio fosforilase e 14 α -demetilase durante o processo de encistamento após o tratamento com as formulações da nanoemulsão carreadora de siRNAs.	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Condições da reação de qPCR	51
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Oligonucleotídeos de siRNAs	45
Tabela 2 - Avaliação da estabilidade da formulação de nanopartículas híbridas a 4° C.....	53
Tabela 3 - Avaliação da estabilidade da formulação da nanoemulsão lipídica a 4 °C.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
AC	Acantopódio
AGO2	Argonauta 2
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVL	Amebas de vida livre
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Too</i>
CA	Ceratite amebiana
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CaP	Fosfato de cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CLX	Digluconato de clorexidina
CN	Controle negativo
Cy-5	Cianina-5
Cy-5	Cianina-5
CYP	Enzimas do citocromo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenillindol
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	<i>Double strand RNA</i>
EAG	Encefalite amebiana granulomatosa
EC	Ectocisto
EN	Endocisto
Erk	Quinase regulada por sinal extracelular
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GLU	Ácido glutâmico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanol sulfônico
HMG-CoA	3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase

LAPEO	Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MIP133	Protease induzida por manose
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MyD88	Diferenciação mieloide TLR4 88
N	Núcleo
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NE	Nanoemulsões lipídicas
NE_14alpha	Nanoemulsão carreando siRNA 14alpha
NE_Cy5	Nanoemulsão carreando siRNA marcado com cianina-5
NE_G14	Nanoemulsões carreando siRNA 14alpha e siRNA Glico
NE_Glico	Nanoemulsão carreando siRNA Glico
NE_Mock	Nanoemulsão branca
NE_SCR	Nanoemulsão carreando siRNA scramble
NEM	Meio isento de nutrientes
NF-κB	Fator nuclear -κB
NK	<i>Naked</i> - siRNA não incorporado a nanocarreadores
NK_14alpha	siRNA14alpha não incorporado a nanocarreadores
NK_G14	siRNAs 14alpha e Glico não incorporado a nanocarreadores
NK_Glico	siRNA Glico não incorporado a nanocarreadores
Nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NP	Nanopartículas
NP_14alpha	Nanopartícula híbrida carreando siRNA 14alpha
NP_Cy5	Nanopartícula híbrida carreando siRNA marcado com cianina-5
NP_Glico	Nanopartícula híbrida carreando siRNA Glico
NP_Mock	Nanopartícula híbrida branca
NP_SCR	Nanopartícula híbrida carreando siRNA scramble
P13K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase

PdI	Índice de polidispersão
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHMB	Polihexametileno biguanida
PYG	Meio proteose peptona, extrato de levedura e glicose
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RNAm	RNA mensageiro
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SBF	Soro fetal bovino
SCR	Scramble
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
si14alpha	siRNA 14 α -demetilase
siGlico	siRNA glicogênio fosforilase
SIRC	<i>Statens Seruminstitut Rabbit Cornea</i>
siRNA I%	Porcentagem de siRNA incorporado
siRNA	<i>Small interference RNA</i>
TCL	Triglicerídeos de cadeia longa
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
λ	Comprimento de onda
μ L	Micro litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	Amebas de vida livre.....	23
2.2	O gênero <i>Acanthamoeba</i>	23
2.2.1	Classificação morfológica e molecular	28
2.2.2	Infecções em humanos causadas por <i>Acanthamoeba</i> spp.	29
2.2.3	Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp.	29
2.2.4	Patogenese da Ceratite Amebiana.....	31
2.2.5	Tratamentos da ceratite amebiana.....	32
2.3	Córnea: estrutura e fisiologia	33
2.4	Terapia gênica ocular	34
2.5	Pequenos RNAs de interferência (siRNA) e silenciamento gênico	36
2.6	Sistemas nanocarreadores para liberação de siRNAs	38
2.4.1	Nanopartículas híbridas.....	40
2.4.2	Nanoemulsões lipídicas.....	40
3	OBJETIVOS	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1	Cultura de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	44
4.2	Construção das sequências de siRNAs	44
4.3	Preparação e caracterização das formulações nanocarreadoras de siRNAs .	45
4.3.1	Preparação de nanopartículas híbridas.....	45
4.3.2	Preparo da nanoemulsão lipídica	46
4.3.3	Caracterização das formulações nanocarreadoras	47
4.3.4	Observação da internalização de nanocarreadores em <i>Acanthamoeba castellanii</i> .	48
4.4	Estudo da atividade biológica dos nanocarreadores contendo siRNAs frente a formas de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	48

4.4.1	Avaliação da viabilidade de trofozoítos e formação de cistos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> após incubação com nanopartículas híbridas contendo siRNAs.....	48
4.4.2	Avaliação da viabilidade de trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> após incubação com nanoemulsão lipídica contendo siRNAs.....	49
4.4.3	Avaliação da inibição do encistamento de trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> após incubação com nanoemulsão lipídica contendo siRNAs	49
4.4.4	Coloração com branco de calcoflúor	49
4.5	Avaliação da citotoxicidade das formulações da nanoemulsão lipídica	50
4.6.1	Extração de RNA total	51
4.6.2	Síntese do DNA complementar (cDNA).....	51
4.5	Análise estatística.....	52
5	RESULTADOS	53
5.1	Obtenção e caracterização das formulações nanocarreadoras	53
5.2	Internalização das formulações nanocarreadoras de siRNAs em <i>Acanthamoeba castellanii</i>	56
5.3	Avaliação da viabilidade de trofozoítos e formação dos cistos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> após tratamentos com a formulação de nanopartículas híbridas carreadoras de siRNAs.....	57
5.4	Avaliação da viabilidade de trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> após tratamento com a formulação de nanoemulsão lipídica carreadora de siRNAs.....	62
5.5	Avaliação da inibição da formação de cistos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> após tratamento com a nanoemulsão lipídica carreadora de siRNAs	62
5.6	Coloração dos cistos com calcoflúor white após tratamento com as formulações de nanoemulsão lipídica carreadora de siRNAs	63
5.7	Citotoxicidade das formulações da nanoemulsão lipídica em células de córnea de coelho	65
5.8	Avaliação da expressão dos genes glicogênio fosforilase e 14 α -demetilase durante o processo de indução do encistamento após o tratamento com as formulações da nanoemulsão lipídica carreadora de siRNA.....	66

6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÃO.....	75
8	PERSPECTIVAS.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários ubiqüitários e oportunistas com ampla distribuição ambiental (LASS *et al.*, 2017; WOPEREIS *et al.*, 2020). São seres anfitriões, pois possuem a capacidade de viverem livremente no ambiente, como também causar infecções em humanos e animais (CASTRILLÓN; OROZCO, 2013; LACERDA; LIRA, 2021a).

A ceratite amebiana (CA) é uma infecção da córnea grave causada por *Acanthamoeba* spp., caracterizada por apresentar lenta progressão, dor intensa e desproporcional ao tamanho da lesão, atingindo principalmente usuários de lentes de contato (KALRA *et al.*, 2020). Uma grande variedade de fármacos é utilizada no tratamento da ceratite amebiana, como diamidinas, biguanidas, neomicina, polimixina B, clotrimazol e intraconazol (CARRIJO-CARVALHO *et al.*, 2017).

A maioria dos tratamentos atua sobre os trofozoítos, forma vegetativa da ameba, porém são pouco efetivos contra os cistos, que apresentam alta resistência pela presença de dupla parede (endocisto e ectocisto). A busca de novas abordagens terapêuticas que atinjam a ameba de forma efetiva, eliminando as formas trofozoíticas, não induzindo ao encistamento e com atividade anticisto é de grande importância para a clínica.

Nos últimos anos, a possibilidade de desenhar e sintetizar pequenos RNAs de interferência (siRNA) para o silenciamento de genes, tornou as técnicas de RNA de interferência (RNAi) uma poderosa ferramenta para o estudo e entendimento de novas vias celulares de proteínas e suas funções, bem como a aplicação na terapia de diversas doenças (SETTEN; ROSSI; HAN, 2019). O uso de siRNA enfrenta algumas barreiras para sua entrega eficiente à célula alvo, como degradação por ação de endonucleases séricas, alta massa molar e cargas aniônicas, que tornam os siRNAs incapazes de entrar facilmente nas células alvo, necessitando de um sistema de entrega eficaz (HATTAB; GAZZALI; BAKHTIAR, 2021).

O emprego de nanopartículas, como as nanopartículas híbridas compostas por polietilenoglicol, fosfato de cálcio e siRNA são ideais para entrega de ácidos nucleicos como siRNAs nas células alvos (MELLO *et al.*, 2017; PITTELLA *et al.*, 2012). O uso de nanoemulsões é considerado uma ótima estratégia para veiculação de medicamentos e ácidos nucleicos. Vantagens como tamanho, aumento da biodisponibilidade com consequente aumento da atividade e aumento da estabilidade de muitos componentes, capacidade de proteção de hidrólise e degradação, além de ser um importante veículo para administração

ocular, tornam as nanoemulsões como alternativa no carreamento de siRNAs (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021a).

A composição do endocisto é principalmente celulose e do ectocisto consiste em uma mistura de proteínas, polissacarídeos e esteróis (THOMSON *et al.*, 2017). Durante o encistamento, a biossíntese de celulose em *Acanthamoeba* spp. é obtida pela conversão do glicogênio celular em glicose via glicogênio fosforilase (GARAJOVÁ *et al.*, 2019a). Entre os esteróis na *Acanthamoeba* spp., apresenta-se majoritariamente o ergosterol em suas membranas lipídicas, que é sintetizado pela enzima 14 α -demetilase (SMITH; KORN, 1968; THOMSON *et al.*, 2017). Logo, a inibição da enzima 14 α -demetilase e do domínio catalítico da glicogênio fosforilase durante o tratamento da ceratite amebiana poderá conduzir a resultados favoráveis, reduzindo a integridade das membranas e paredes viabilidade celular e processo de encistamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Amebas de vida livre

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários ubiqüitários e oportunistas com ampla distribuição ambiental, sendo já isoladas de diversas fontes como solo, ar, água de torneira, poeira, piscinas, esgotos, sistemas de ar condicionado, soluções de lentes de contato, entre outros (KRÓL-TURMIŃSKA; LASS *et al.*, 2017; OLENDER, 2017; WOPEREIS *et al.*, 2020). São considerados organismos anfitriônicos, devido a capacidade de viver dispersos no ambiente, como também causar infecções em humanos e animais. Estão associadas à formação de biofilmes, que conferem ao protozoário proteção e favorecem aumento de sua patogenicidade (CASTRILLÓN; OROZCO, 2013; PINTO *et al.*, 2021).

Dentre as AVL, os quatro principais gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* e *Sappinia*, estão relacionados a infecções em humanos (WOPEREIS *et al.*, 2020). *Balamuthia mandrillaris* está relacionada a casos de infecções cutâneas e encefalites (TRABELSI *et al.*, 2012). *Naegleria fowleri* agente da meningoencefalite amebiana primária, infecção aguda, hemorrágica e fulminante, frequentemente leva à morte indivíduos saudáveis com história de contato com água contaminada (SIDDIQUI *et al.*, 2016). *Sappinia pedata* descrita como agente de caso de encefalite amebiana (QVARNSTROM *et al.*, 2009).

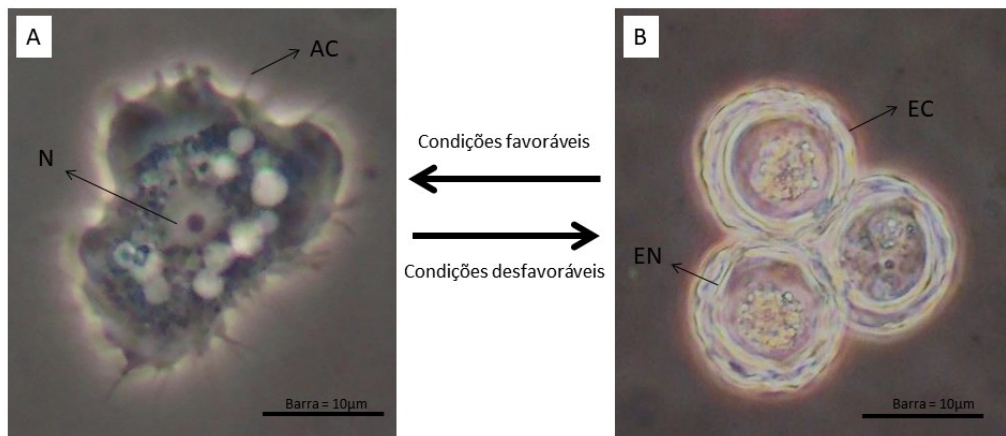
AVL pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* são capazes de causar doenças como a encefalite amebiana granulomatosa (EAG), lesões cutâneas e sinusites em indivíduos imunologicamente debilitados, e a ceratite amebiana (CA) em indivíduos imunocompetentes, relacionados ao uso de lentes de contato e lesão prévia da córnea (PINTO *et al.*, 2021).

2.2 O gênero *Acanthamoeba*

Acanthamoeba spp. estão entre os eucariontes mais antigos, que foram estudados desde a descoberta do microscópio. Isolado primeiramente de amostra de poeira por Puschkarew em 1913 e chamada de *Amoeba polyphagus*, mais tarde foi considerada um gênero por Volkonsky's (1931), e reescrita por Page (1967) como *Acanthamoeba polyphaga* (PAGE, 1967; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). Em 1930, Castellani isolou amebas como contaminantes de culturas de *Cryptococcus pararoseus*, que mais tarde foi chamada de *Acanthamoeba castellanii* (KHAN, 2006). Nas décadas de 1960 e 1970, *Acanthamoeba castellanii* foi descrita como agente causador de infecções em humanos, como a EAG e a CA (SIDDIQUI; KHAN, 2012a; VISVESVARA, 2013).

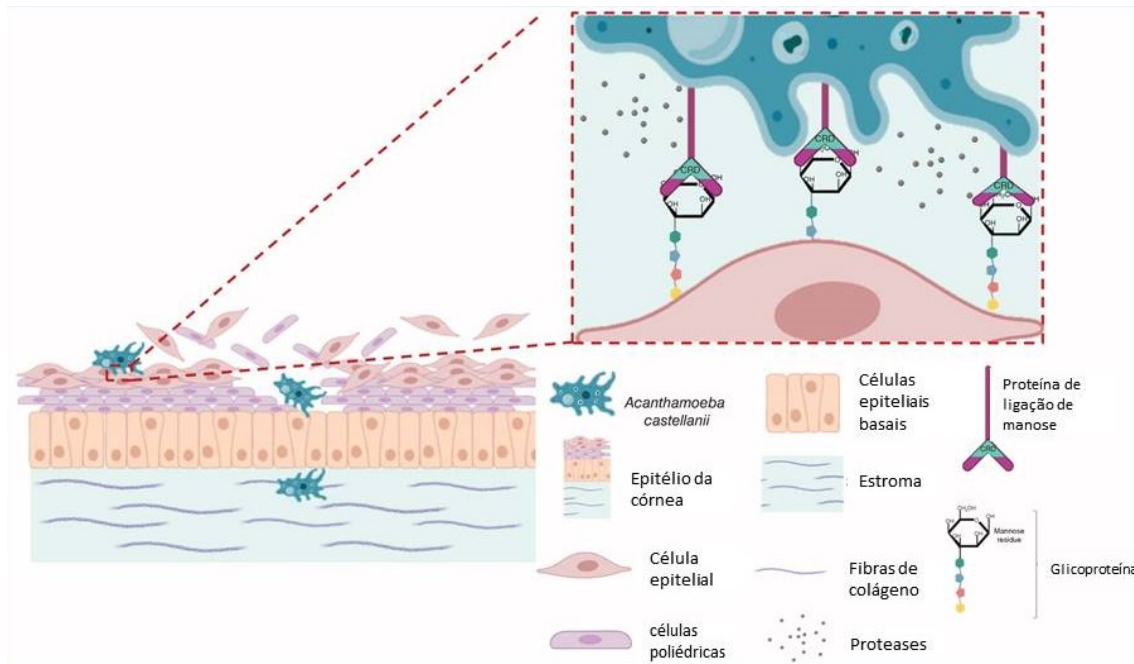
O gênero *Acanthamoeba* pertence ao reino Protista, filo Protozoa, subfilo Sarcodina, Classe Lobosea e Família Acanthamoebidae (ITIS, 2021). Em seu ciclo biológico, esse protozoário apresenta-se sob duas formas: trofozoíto (Figura 1A) e cisto (Figura 1B) (ANWAR; KHAN; SIDDIQUI, 2018).

Figura 1 – Formas de *Acanthamoeba* spp.



Trofozoíto (A) e cistos (B) de *Acanthamoeba* spp. Núcleo (N), acantopódio (AC), endocisto (EN) e ectocisto (EC). As barras correspondem a 10 μm. Fonte: LAPEO, 2017.

Os trofozoítos são as formas vegetativas e metabolicamente ativas de *Acanthamoeba* spp., também considerada a forma infectiva. Medem cerca de 25-50 μm, dependendo do genótipo e espécie (MAYCOCK; JAYASWAL, 2016a). Apresentam morfologia caracterizada pela presença de um único núcleo, com nucléolo central bem evidente, possuem acantopódios, que são pseudópodes finos semelhante a espinhos, que servem para movimento celular, adesão em superfícies e captura de alimento (LORENZO-MORALES *et al.*, 2013; MAYCOCK; JAYASWAL, 2016a). O citoplasma dos trofozoítos é abundante e granular, contendo ribossomos, mitocôndrias e vacúolos, como os lisossomas, vacúolos digestivos, e os contráteis que exercem a regulação osmótica (B; ED, 1973; BOWERS; KORN, 1968). Se alimentam de leveduras, bactérias, outros protozoários, vírus e na córnea de queratócitos (LACERDA; LIRA, 2021a), reproduzem-se de forma assexuada por fissão binária (ALKHARASHI *et al.*, 2015). Nesse estágio são capazes de adesão às células da córnea por meio da proteína de ligação à manose, uma lectina (Figura 2) presente na membrana de *Acanthamoeba* spp. que reconhece resíduos de manose na superfície das células (GUZMÁN-TÉLLEZ *et al.*, 2020; LACERDA; LIRA, 2021a).

Figura 2- Lectina em *Acanthamoeba* spp.

Esquema da ligação da proteína de ligação à manose em células de córnea quando infectadas por *Acanthamoeba* spp. Fonte: Adaptado de GUZMÁN-TÉLLEZ *et al.*, (2020).

A membrana plasmática deste protozoário consiste de 33% de proteínas, 25% de fosfolípidios, 13% de esteróis e 29% de lipofosfoglicanos (GONÇALVES *et al.*, 2018; PALUSINSKA-SZYSZ *et al.*, 2014; SIDDIQUI; KHAN, 2012b). Entender a composição bioquímica deste organismo se faz necessário para aplicações terapêuticas específicas. Dentre os fosfolípidios descritos em *Acanthamoeba* spp. estão a fosfatidilcolina (45%), fosfatidiletanolamina (33%), fosfatidilserina (10%), fosfoinositida (6%) e difosfatidilglicerol (4%) (SMITH; KORN, 1968). A *Acanthamoeba* apresenta níveis baixos de glicolípideos, sendo que a glicose representa 60% destes (SIDDIQUI; KHAN, 2012c).

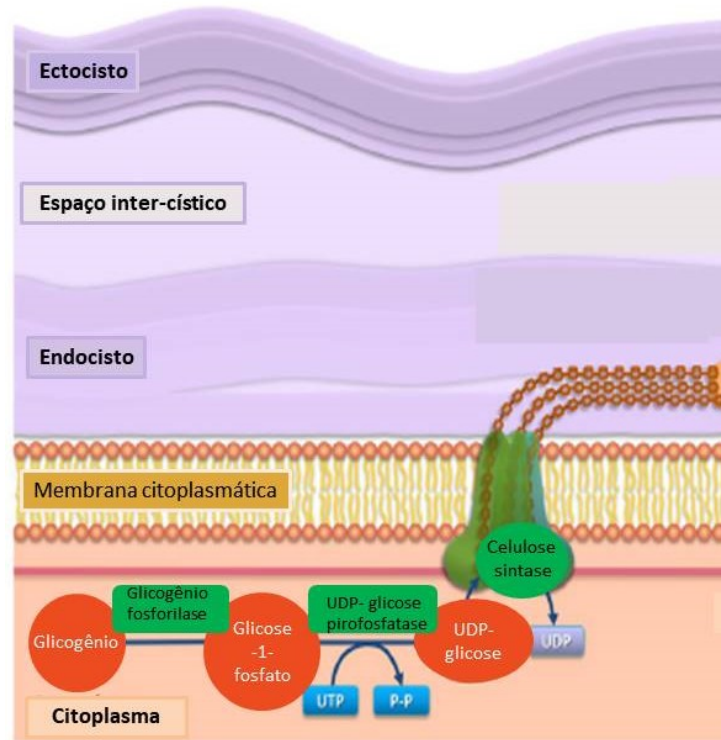
Em condições desfavoráveis como falta de alimento, temperaturas extremas, mudança de pH, aumento da osmolaridade e presença de agentes químicos, o protozoário assume a forma de resistência, arredondada com dupla parede (ecto e endocisto) (GARAJOVÁ *et al.*, 2019a). No início do encistamento ocorre um direcionamento do metabolismo, levando a uma diminuição da massa citoplasmática e desidratação gradual do organismo (BOWERS; KORN, 1969). Os cistos chegam a medir de 15-30 μm e podem permanecer viáveis por mais de 20 anos no ambiente, resistindo à dessecação, frio e calor (SRIRAM *et al.*, 2008).

Pseudocistos foram descritos *in vitro* após a exposição de trofozoítos a solventes orgânicos e propilenoglicol (KLIESCIKOVA; KULDA; NOHYNKOVA, 2011), sem

confirmação de que são formados na natureza. Dentre as diferenças entre pseudocistos e cistos, estão a velocidade da resposta celular a estresse, a estrutura e a composição do revestimento formado na superfície celular, bem como sua resistência em altas temperaturas e baixos pH (LACERDA; LIRA, 2021a). Ambos os estágios apresentam a capacidade de desencistamento, retornando ao estado metabolicamente ativo da *Acanthamoeba* spp. A forma de maior preocupação para busca de novas abordagens terapêuticas é a cística. Como as paredes do cisto fornecem uma barreira física para que os fármacos atinjam a ameba, é necessário entender sua bioquímica no processo de síntese (ZORZI *et al.*, 2019a). A composição das paredes do cisto denominadas de endocisto e ectocisto é 35% de carboidratos, principalmente a celulose, 33% de proteínas, 4 a 6% de lipídios e 20% de material não identificado (AGUILAR-DÍAZ *et al.*, 2011). As paredes do protozoário são separadas por um espaço e em certos pontos se formam os opérculos no centro dos ostíolos, que são pontos para desencistamento (BOWERS; KORN, 1969).

Em *Acanthamoeba* spp., a biossíntese de celulose representado na Figura 3, ocorre pela conversão de glicogênio celular, armazenado nos vacúolos deste protozoário, em glicose via glicogênio fosforilase (MOON *et al.*, 2014). Durante o encistamento, são expressos em elevados níveis as enzimas glicogênio fosforilase, UDP-glicose pirofosforilase e celulose sintase (MOON; KONG, 2012).

Figura 3- Modelo hipotético da biossíntese de celulose em *Acanthamoeba* spp.



Biossíntese de celulose em cisto de *Acanthamoeba* spp. O glicogênio no citoplasma é degradado pela ação catalítica da glicogênio fosforilase, liberando glicose-1-fosfato. Posteriormente, a glicose UDP (difosfato de uridina) é sintetizada a partir da glicose-1-fosfato e da UTP (trifosfato de uridina) catalisada pela UDP-glicose pirofosforilase. Fonte: adaptado de GARAJOVÁ *et al.* (2019).

Em cultivo, *Acanthamoeba* spp. armazenam glicose na forma de glicogênio. Estudos bioquímicos anteriores sugerem que o glicogênio serve como uma fonte de glicose para a síntese de celulose durante a formação da parede do cisto (GARAJOVÁ *et al.*, 2019a). Lorenzo-Morales e colaboradores (2008) estabeleceram o papel da glicogênio fosforilase no encistamento como contribuinte para a quebra do glicogênio e demonstraram sua necessidade na formação do endocisto (LORENZO-MORALES *et al.*, 2008; ZORZI *et al.*, 2019b).

Outra via relacionada ao processo de encistamento é a autofagia, mecanismo essencial para manter a homeostase em células eucarióticas, que envolve o sequestro e digestão de macromoléculas citoplasmáticas. Processos autofágicos alteram a composição celular e a estrutura organelar para sintetizar a parede do cisto (LLOYD, 2014). Esse processo necessita que a estrutura autofagossômica precursora, chamada de fagóforo, sequestre componentes celulares, expandindo e formando uma vesícula de membrana dupla chamada de autofagossomo (MOON *et al.*, 2015b).

Sabe-se que os principais esteróis presentes na membrana de cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. são o ergosterol (40%) e o 7-dehydrostigmasterol (60%), os dois representam 5% do total de lipídios nos trofozoítos e 3% nas células encistadas (SMITH; KORN, 1968). Diversos fármacos azólicos, como o clotrimazol, fluconazol e miconazol possuem atividade antifúngica, interferindo na síntese de ergosterol presente na membrana de fungos. Especificamente, interferem na síntese de esteróis, inibindo a enzima 14 α -demetilase dependente de enzimas do citocromo (CYP), que atua na conversão de lanosterol em ergosterol (THOMSON *et al.*, 2017).

Com a elevada resistência dos cistos, *Acanthamoeba* spp. não respondem aos processos imunológicos desenvolvidos pelo hospedeiro, além de permanecer por longo período viável protegidas da ação de desinfetantes e agentes quimioterápicos (HEASELGRAVE *et al.*, 2016).

2.2.1 Classificação morfológica e molecular

Atualmente são descritas 30 espécies de *Acanthamoeba*, identificadas com base na morfologia dos cistos ou por meio da análise do gene 18S rDNA (CASTRILLÓN; OROZCO, 2013). A classificação morfológica dos cistos segue os critérios propostos por Pussard e Pons em 1977, que divide as espécies em três grupos (I, II e III), de acordo com tamanho e morfologia da dupla parede dos cistos, endocisto (parede interna) e ectocisto (parede externa) (CASTRILLÓN; OROZCO, 2013).

- Grupo I: tamanho médio de 18 μ m. Endocisto estrelado e com ectocisto enrugado ou liso.
- Grupo II: tamanho médio inferior a 18 μ m. Camada interna (endocisto) com diferentes formas dentre elas, arredondada, oval, triangular, poliédrica ou em formato de estrela. Camada externa (ectocisto) enrugada e/ou ondulada. Dentre os grupos, o grupo II se destaca por apresentar maior número de espécies, incluindo espécies causadoras de infecções em humanos como a *A. castelanii* (KHAN, 2006).
- Grupo III: tamanho médio inferior a 18 μ m. Endocisto maciço arredondado e ectocisto fino, liso ou ondulado. A ameba patogênica *A. culbertsoni* pertence a este grupo (LACERDA; LIRA, 2021a).

Durante muito tempo, os critérios morfológicos foram utilizados para classificação de *Acanthamoeba* spp., porém observou-se que dependendo das condições de cultivo pode ocorrer variação da morfologia dos cistos, o que torna inconsistente a identificação de

espécies apenas pela análise morfológica (CHAN *et al.*, 2011; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

Atualmente, a metodologia mais aceita para classificar *Acanthamoeba* spp. é baseada nas sequências da subunidade menor do gene 18S rDNA, de modo que o gênero pode ser dividido em genótipos. Cada genótipo exibe 5% ou mais de sequências divergentes entre os diferentes genótipos (KHAN, 2006; CORSARO *et al.*, 2017; STOTHARD *et al.*, 1998). Atualmente estão descritos 23 genótipos baseados no gene 18S rDNA, nomeados de T1-T23 (PUTAPORNTIP *et al.*, 2021). O genótipo T4 é o mais comum e o mais relacionado a casos de infecções humanas, o que pode estar relacionado a propriedades como maior virulência, que aumentam sua transmissibilidade e potencial de resistência a agentes químicos (AYKUR; DAGCI, 2021; SIDDIQUI; KHAN, 2012c).

2.2.2 Infecções em humanos causadas por *Acanthamoeba* spp.

Dentre as principais infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. estão a EAG e a CA (KOFMAN; GUARNER, 2021a). A EAG é uma doença rara que acomete principalmente pacientes com sistema imunológico debilitado (KOFMAN; GUARNER, 2021b). Apresenta alta taxa de mortalidade, mais de 90% (PINTO *et al.*, 2021). O protozoário pode infectar o paciente por diversas vias, incluindo o trato respiratório, fissuras na pele e pela cavidade nasal (KALRA *et al.*, 2020). Casos de EAG são frequentemente subdiagnosticados pela ausência de suspeita clínica específica. Outra infecção primária acometida por *Acanthamoeba* spp. é a ceratite amebiana, considerada a infecção acanthamebiana mais comum, atinge principalmente indivíduos saudáveis usuários de lentes de contato, devido ao mal uso das lentes de contato (BUCHELE *et al.*, 2018; STAPLETON, 2021).

2.2.3 Ceratite por *Acanthamoeba* spp.

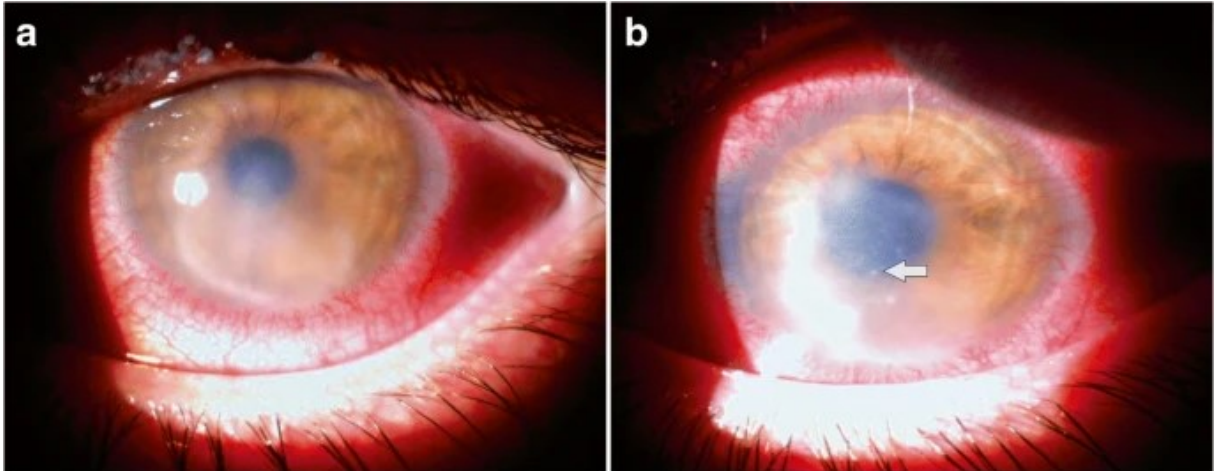
A CA é uma infecção ocasionada por diversas espécies de *Acanthamoeba*, caracterizada por processo inflamatório intenso da córnea, progressão lenta, e dor desproporcional ao tamanho da lesão, provocada pela ceratoneurite radial, devido ao alto tropismo amebiano pelos nervos corneanos (LACERDA; LIRA, 2021a). Dentre os principais fatores de risco associados a doença, estão o uso de lentes de contato por longos períodos, uso de soluções inadequadas e não estéreis para limpeza das lentes e estojos, trauma corneano e banhos em águas contaminadas (PINTO *et al.*, 2021). Os casos de CA são majoritariamente

relacionados a usuários de lentes de contato (cerca de 85%), mas existem relatos de casos pós traumas e exposição à água ou solo contaminados (AYKUR; DAGCI, 2021).

A incidência de ceratite por *Acanthamoeba* spp. é difícil de estimar com precisão devido à dificuldade de diagnóstico. Na Europa, Estados Unidos e Austrália variam na ordem de 1 a 5 casos por milhão de usuários de lentes de contato gelatinosas por ano (CARNT; STAPLETON, 2016). No Reino Unido, o número de casos estimados é de 1,4 por milhão (BOUHERAOUA *et al.*, 2014). No Brasil há relatos de casos de CA nos últimos 30 anos, principalmente no sul e sudeste, porém a maioria dos casos são subdiagnosticados (BOCACCI *et al.*, 1997; BUCHELE *et al.*, 2018; DOS SANTOS *et al.*, 2018; OBEID *et al.*, 2003). A incidência e impacto da doença abrangem fatores além do cuidado com saúde, mas também socioeconômicos e condições ambientais, sendo relativa aos fatores de regiões, especialmente em países de baixa renda onde os casos são subnotificados (STAPLETON, 2021). Em países de baixa renda, a maior incidência de CA é atribuída a lesões na córnea causadas por acidentes de trabalho em associação a águas contaminadas e a falta de acesso à saúde (STAPLETON, 2021).

Normalmente a lesão ocorre em um dos olhos, porém já foram demonstrados casos bilaterais (COPE *et al.*, 2016). Pacientes com CA relatam dor intensa, fotofobia, vermelhidão e sensação de corpo estranho, apresentam lesões com infiltrado estromal em forma de anel (Figura 4), aspecto dendritiforme, pequenos infiltrados esbranquiçados e ceratoneurite radial. Se tratada tardiamente ou de maneira inadequada, pode progredir para perda progressiva da visão (KOFMAN; GUARNER, 2021a; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Figura 4- Ceratite por *Acanthamoeba* spp.



Características clínicas de caso de ceratite amebiana. O exame clínico revela infiltrado neutrofílico (a), início da formação de um anel. (b) pontos de infiltrado denso na lesão da córnea. Fonte: BUCHELE *et al.*, 2018.

2.2.4 Patogenese da Ceratite Amebiana

Para que a infecção ocorra, é necessário que a ameba esteja em sua forma trofozoítica para aderir às células epiteliais da córnea humana através de adesinas, as glicoproteínas de manose, expostas no epitélio corneano (GUZMÁN-TÉLLEZ *et al.*, 2020). Após adesão, os trofozoítos produzem uma série de proteases que facilitam a invasão, como a serino-protease, cisteino-protease, elastase e metaloproteases (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). No estroma, os trofozoítos secretam a protease de 133 kDa induzida por manose (MIP133), que causa citólise nas células epiteliais e se alimentam de queratócitos levando a indução de uma resposta inflamatória intensa e finalmente a necrose estromal (BOUHERAOUA *et al.*, 2014; FANSELOW *et al.*, 2021b).

Proteases são importantes marcadores de virulência de muitos protozoários como *Acanthamoeba* spp. Serino proteases estão envolvidas em diversos processos em protozoários, entre eles a absorção de nutrientes, infecção do hospedeiro, invasão de tecidos e adaptação ambiental, ou seja, no processo de encistamento (CIRELLI *et al.*, 2019). Durante o processo patogênico de *Acanthamoeba* spp., uma série de vias de sinalização são ativadas, incluindo receptores acoplados a proteína G, receptores beta-adrenalina, Toll-like 4, gene de resposta primária de diferenciação mieloide TLR4 88 (MyD88), fator nuclear κ B (NF- κ B), quinase regulada por sinal extracelular (Erk), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e fosfolipase citosólica (A2acPLA2 α) (GUZMÁN-TÉLLEZ *et al.*, 2020; SIDDIQUI; KHAN, 2012b).

2.2.5 Tratamentos da ceratite amebiana

Os protocolos para o tratamento da ceratite amebiana baseiam-se na combinação de antimicrobianos, que podem fornecer efeitos sinérgicos e melhores resultados (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020a). Atualmente são empregadas diamidinas e biguanidas; dentre elas o polihexametileno biguanida (PHMB) e o digluconato de clorexidina (CLX), que representam a primeira linha de tratamento eficaz, principalmente sobre os trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.; as diamidinas: hexamidina (Desomedine®), isotionato de propamidina (Brolene®) ativas contra trofozoítos e cistos (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020a; TRABELSI *et al.*, 2012). Outros tratamentos também são utilizados em combinação com antibióticos (aminoglicosídeos, neomicina) e antifúngicos (azoles, itraconazol, voriconazol, anfotericina B) (GUEUDRY *et al.*, 2018; RICE *et al.*, 2020; THOMSON *et al.*, 2017). A miltefosina (Impavido ®) está disponível para tratamento de casos de infecções por *Acanthamoeba* spp. por meio de protocolo de novo medicamento experimental aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos para o tratamento de leishmaniose visceral, com atividade *in vitro* em amebas de vida livre, como *N. fowleri*, *B. mandrillaris* e espécies de *Acanthamoeba* (BRONDFIELD *et al.*, 2017).

A resistência dos cistos de *Acanthamoeba* spp. aos antimicrobianos é a maior dificuldade no tratamento da ceratite amebiana, pois a ameba pode permanecer encistada e retornar a forma trofozoítica após o uso das terapias (LACERDA; LIRA, 2021a; MAYCOCK; JAYASWAL, 2016b). Outra problemática, é o tempo prolongado de tratamento, cerca de 6 meses com instilações a cada hora, que acarretam efeitos colaterais causado pela toxicidade dos fármacos que dificultam a regeneração do tecido da córnea, ocasionando complicações como catarata, atrofia da íris e ulceração da córnea (CARRIJO-CARVALHO *et al.*, 2017).

O tratamento usualmente é administrado na forma tópica a cada hora nos primeiros dias, com duração de 3 a 4 semanas, porém o tratamento pode durar vários meses para prevenir a reinfecção (FANSELOW *et al.*, 2021a). A capacidade de encistamento deste protozoário representa o maior obstáculo, devido a estrutura robusta de dupla parede dos cistos. O aumento da inflamação no início do tratamento é observado, e isto se deve a toxicidade dos fármacos pelas altas doses recomendadas, ou pelos antígenos liberados pelo protozoário. Corticosteróides são utilizados para reduzir a dor, no entanto suprimem a atividade dos macrófagos causando intensa inflamação pelas estruturas inativas do protozoário depositadas no estroma corneano (SEAL, 2003), além de serem associados à indução do desencistamento aumentando o grau das lesões. Se o tratamento recomendado

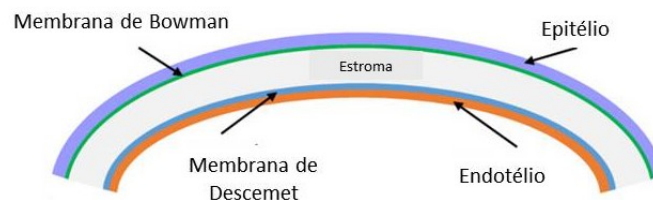
falhar, poderá ocorrer à progressão da infecção para ulceração da córnea, transplante de córnea ou ceratoplastias podem ser recomendadas (SAEED *et al.*, 2009).

2.3 Córnea: estrutura e fisiologia

O olho humano pode ser dividido em segmento anterior, que é formado pela córnea, conjuntiva, humor aquoso, íris, corpo ciliar e cristalino, e o segmento posterior, composto pelo humo vítreo, retina, coróide e nervo óptico (SCHNEIDER-FUTSCHIK; REYES-ORTEGA, 2021).

A córnea é uma estrutura fina de cinco camadas, que protege as estruturas internas do olho e tem o poder de refração (MOSHIRFAR; THOMSON; RONQUILLO, 2021). Localiza-se na camada mais externa do olho e possui transparência por não conter vasos sanguíneos, os nutrientes e oxigenação é realizada por meio do humor aquoso e do fluido lacrimal (DUXFIELD *et al.*, 2015). Dentre as camadas estão o epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio, representados na Figura 5. Sua espessura pode variar até 700 μm , o que a torna uma barreira para microrganismos como também para administração de fármacos.

Figura 5- Representação esquemática das camadas da córnea



Fonte: Adaptado de MOSHIRFAR; THOMSON; RONQUILLO, (2021)

O epitélio é a camada protetora, apresenta superfície lisa que fornece a interface do filme lacrimal. Essa membrana representada na Figura 6 é composta por cinco camadas de células, que possuem a capacidade de manter a estabilidade e promover impermeabilidade. A membrana de Bowman é a porção anterior do estroma e auxilia na manutenção da forma da córnea, composta por fibras de colágeno dispostas irregularmente. O estroma é o meio de refração primário da córnea e fonte de resistência mecânica. A córnea é altamente innervada com plexos subepiteliais e estromais supridos pelo nervo oftálmico. O endotélio é uma monocamada de células hexagonais com extensas interdigitações e junções, e com baixo

potencial de regeneração (DUXFIELD *et al.*, 2015; MOSHIRFAR; THOMSON; RONQUILLO, 2021; SINGH *et al.*, 2020).

Figura 6- Estrutura do olho

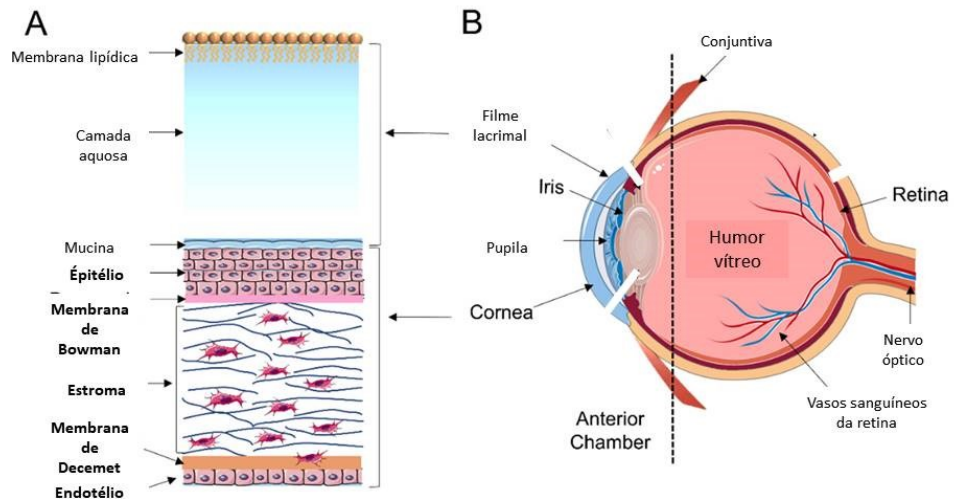


Ilustração esquemática das barreiras oculares. (A) Barreira da camada lipídica do filme lacrimal (B) Estrutura do olho. Fonte: Adaptado de SINGH *et al.*, (2020)

As macromoléculas possuem baixa biodisponibilidade ocular, uma vez que a anatomia do olho é composta por inúmeras barreiras fisiológicas, que diminuem a permeabilidade de fármacos, permitindo que apenas 5% do fármaco administrado seja absorvido (SCHNEIDER-FUTSCHIK; REYES-ORTEGA, 2021). Dentre as preparações terapêuticas utilizadas em tratamentos oculares, estão as de aplicação tópica como pomadas, colírios, géis e lentes de contato gelatinosas, sendo que 90% delas são soluções e suspensões (SINGH *et al.*, 2020).

Ceratites infecciosas causadas por *Acanthamoeba* spp. ocorrem pela invasão e degradação dos componentes corneanos, gerando reação inflamatória e consequente destruição tecidual. Ao contrário de outras infecções oculares, a CA não avança do tecido corneano, sendo raros os casos intraoculares (GUZMÁN-TÉLLEZ *et al.*, 2020).

2.4 Terapia gênica ocular

Inúmeras doenças são causadas por danos no DNA, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, pulmonares e neurodegenerativas. O Projeto Genoma Humano, lançado em 1990 pelo Consórcio Internacional de Sequenciamento do Genoma Humano, teve grande importância na elucidação dos mecanismos moleculares das mais diversas patologias,

promovendo diagnósticos, identificando genes de propensão e permitindo o desenvolvimento de abordagens terapêuticas racionais (ABDELLAH *et al.*, 2004; LANDER *et al.*, 2001). A partir de técnicas utilizando DNA recombinante e sequenciamento de DNA, foi possível utilizar genes com propósito terapêutico.

A terapia gênica consiste na modificação de genes sadios e sua introdução em células/tecidos para compensar anormalidades (SAHU; CHUG; KHANNA, 2021). Porém esta substituição é um processo trabalhoso, assim é necessária a utilização de vetores, que podem ser administrados *in vivo*, onde se introduz o gene diretamente no organismo ou *ex vivo*, e para isto células são removidas e modificadas *in vitro* para posteriormente serem reintroduzidas (ZORZI *et al.*, 2017).

Tratamentos com terapias gênicas possuem efeitos de longo prazo, melhorando a adesão a terapêutica, uma vez que diminui o número de doses e tempos necessários (WANG *et al.*, 2021). Atualmente existem diversas vias para aplicação da terapia gênica ocular *in vivo* utilizando coelho, rato ou camundongo e *in vitro* com células do epitélio corneano humano, células do epitélio conjuntival e células do epitélio da retina (ZORZI *et al.*, 2017). Dentre as técnicas comumente empregadas na terapia genética ocular estão os plasmídeos, oligonucleotídeos antissentido, pequenos RNAs de interferência e aptâmeros. Os primeiros medicamentos baseados em terapia genética aprovados para via ocular foram o oligonucleotídeo antissentido Vitravene® e o aptâmero Macugen® (NG; ADAMIS, 2005; ZORZI *et al.*, 2017).

Para a transfecção destes genes existem duas classes de vetores, os vetores virais e não virais. Para entrega não viral atualmente são utilizados sistemas carreadores como nanopartículas que são geralmente envolvidas pelas células alvo por endocitose ou fagocitose, outro vetor para entrega eficiente de genes é o plasmídeo, que são fragmentos de DNA circular presentes nas bactérias, permitem a incorporação de fragmentos de DNA levando a expressão e tradução da proteína na célula alvo (DHURANDHAR *et al.*, 2021). Dentre as vantagens no uso de vetores não virais esta a baixa patogenicidade, baixo custo, facilidade de produção e maior segurança em relação aos virais (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Já os vetores virais para entrega de genes são introduzidos *in vivo* e *in vitro* na célula por vírus com replicação deficiente, é a técnica mais utilizada devido a capacidade que os vírus possuem de penetrarem nas células e de depositarem seu material genético (SAHU; CHUG; KHANNA, 2021).

O maior desafio na utilização das terapias gênicas está no desenvolvimento de sistemas de entrega seguros e eficazes nas células alvos. Aptâmeros são sistemas de entrega de moléculas, adequado para tratamentos oculares com natureza não imunogênica e tempo de retenção no olho prolongado devido seu grande tamanho (KANWAR *et al.*, 2014). A terapia utilizando oligonucleotídeos antissenso são moléculas de DNA ou RNA que podem ser administrados sozinhos ou por meio de vetores virais, possui como alvo os mecanismos de *splicing*, retirando íntrons de um RNA precursor de forma a produzir um RNAm, evitando a tradução de proteínas causadoras de doenças (DHURANDHAR *et al.*, 2021).

2.5 Pequenos RNAs de interferência (siRNA) e silenciamento gênico

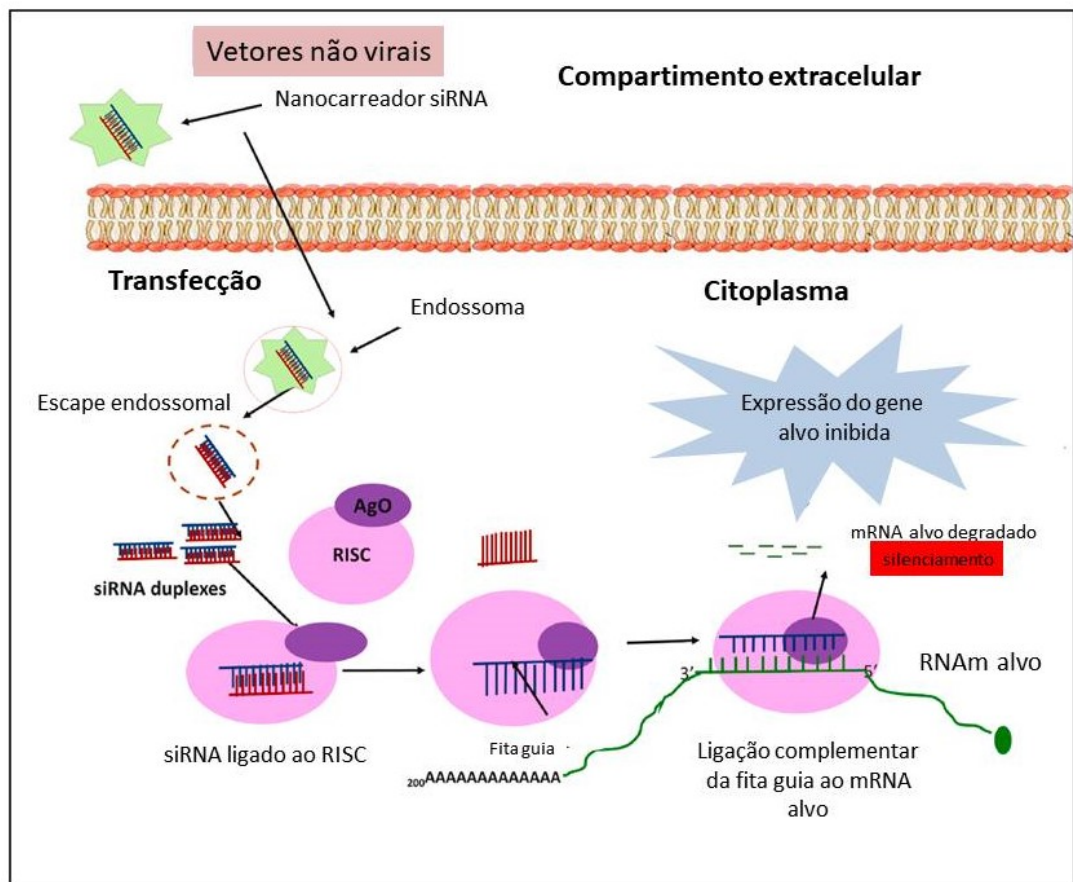
Embora considerada uma causa rara de ceratite, alguns estudos relatam que 5% dos casos de ceratites infecciosas são ocasionados por *Acanthamoeba* spp. e a maioria dos casos (85%) estão relacionados a usuários de lentes de contato, o que deve-se ao aumento do número de usuários de lentes nas últimas décadas, em consequência, a necessidade da busca de novas estratégias terapêuticas (SOMANI; RONQUILLO; MOSHIRFAR, 2021). O silenciamento gênico de vias essenciais desse protozoário é uma alternativa para os desafios terapêuticos e demandas crescentes por medicamentos específicos anti-*Acanthamoeba* (ZORZI *et al.*, 2019a).

Uma estratégia para reduzir a expressão de genes é denominada de RNA de interferência (RNAi), descrito pela primeira vez por Craig Mello e Andrew Fire (FIRE *et al.*, 1998), que prevê a inibição de alvos específicos, e com isso a redução da produção de proteínas. Atualmente representa uma abordagem de descobertas e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, em 2006 o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina foi concedido aos pesquisadores reconhecendo a importância do RNAi na ciência. O RNAi atua por pequenas moléculas de RNAs complementares a RNAs mensageiros (mRNA), que inibem a expressão gênica na fase de tradução ou dificultam a transcrição de genes específicos (SETTEN; ROSSI; HAN, 2019). Atualmente, diferentes abordagens são utilizadas para aprimorar o silenciamento gênico como, por exemplo, a utilização de pequenos RNAs de interferência (*small ou short interfering RNA* - siRNAs).

Os siRNAs apresentam tamanho de 21-23 nucleotídeos, podem ser gerados *in vivo* a partir de longos pedaços de RNA (double strand RNA - dsRNA) ou sintetizados *in vitro* e então introduzidos nas células. Biologicamente, a via se inicia com a clivagem do dsRNA (Figura 7) pela enzima DICER em pequenos RNAs. Estes, quando no citoplasma da célula,

integram-se ao complexo de indução de silenciamento (*RNA-Induced Silencing Complex - RISC*), que possui uma proteína denominada argonauta 2 (AGO2), a qual desenrola o siRNA. O complexo RISC ativado irá carregar a fita antisense do siRNA para a fita do RNAm complementar e desta forma induzir o silenciamento. Endonucleases degradam o RNAm complementar específico e assim a tradução é impedida (HATTAB; GAZZALI; BAKHTIAR, 2021).

Figura 7- Mecanismo de ação de pequenos RNAs de interferência



Esquema ilustrativo do mecanismo de ação do siRNA. RNA longo de fita dupla, chamado dsRNA (Double Strand RNA), é clivado por uma enzima denominada DICER, em pequenos RNAs. Quando no citoplasma da célula, integram-se ao complexo de indução de silenciamento (RISC), onde a proteína argonauta 2 (AGO2) desenrola o siRNA. O complexo RISC ativado, contendo a fita antisense do siRNA, procura e degrada o RNAm complementar, levando ao silenciamento gênico. Fonte: Adaptado de (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2010; SUPE; UPADHYA; SINGH, 2021).

Estudos de silenciamento utilizando siRNAs em *Acanthamoeba* spp. se mostram promissores para novos tratamentos. Resultados demonstrados por Martín-Navarro e colaboradores (2013), que utilizaram siRNAs e avaliaram os efeitos induzidos pela inibição da 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA) em *Acanthamoeba* spp., apresentam perspectivas no uso desta enzima como alvo terapêutico em infecções amebianas

(MARTÍN-NAVARRO *et al.*, 2013). Outros estudos utilizando silenciamento de proteases resultaram no impedimento da ameba em degradar células da córnea (LORENZO-MORALES *et al.*, 2005), assim como o silenciamento da glicogênio fosforilase (LORENZO-MORALES *et al.*, 2010), cisteíno proteases (LEE *et al.*, 2013; MOON *et al.*, 2012) e metaloprotease M17 leucine aminopeptidase (LEE *et al.*, 2015), o que tornaram a ameba incapaz de formar cistos maduros.

O uso de siRNAs enfrenta algumas barreiras para sua entrega eficiente à célula-alvo, como a suscetibilidade à degradação por ação de endonucleases séricas, propriedades como a alta massa molar (~ 13 kDa), cargas aniônicas e pouca hidrofobicidade, suprimindo a penetração na membrana celular, o que torna os siRNAs incapazes de entrar facilmente nas células-alvo, necessitando de um sistema de entrega eficaz (HATTAB; GAZZALI; BAKHTIAR, 2021). Neste contexto, o uso de vetores biocompatíveis que promovam a transfecção segura e não provoquem efeitos indesejáveis se faz necessário.

Moléculas de siRNA podem ser entregues por administração tópica ocular e por injeção intravítrea nos olhos (SUPE; UPADHYA; SINGH, 2021). Assim que a barreira vítrea é ultrapassada, a formulação carreadora de siRNA deve ser capaz de proteger a sequência na presença de moléculas aniônicas, presentes nas matrizes de células oculares, além de barreiras físicas como a barreira hemato-retiniana (SUPE; UPADHYA; SINGH, 2021).

Carregado negativamente devido aos grupamentos fosfatos presentes em sua estrutura, os siRNAs são repelidos pelas membranas celulares, desta maneira se faz necessária a utilização de vetores de transfecção. Nos últimos anos, a utilização de sistemas de base nanotecnológica empregados na terapia genética ocular tornou-se uma abordagem comum, uma vez que sua pequena dimensão permite a distribuição dentro da célula e suas propriedades como biocompatibilidade e biodegradabilidade podem ser moduladas conforme seus componentes. A escolha dos materiais para formulação dos nanocarreadores de siRNAs depende de diversos fatores como carga, peso molecular e grau de protonação (TATIPARTI *et al.*, 2017).

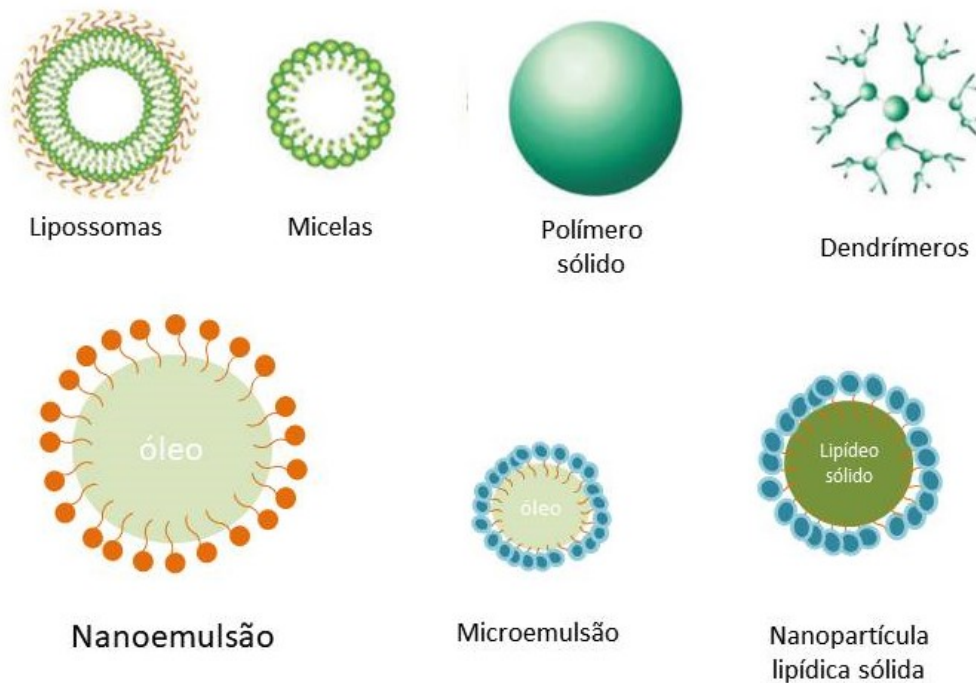
2.6 Sistemas nanocarreadores para liberação de siRNAs

Com o avanço da nanotecnologia, o desenvolvimento de novos biomateriais está em constante crescimento, vantagem que possibilita a elaboração de nanocarreadores focados para cada via de administração, e de acordo com os fármacos e/ou ativos encapsulados (KIM; PARK; SAILOR, 2019).

Devido suas propriedades (descrito no item 2.5) os siRNAs devem ser incorporados a vetores, que devem ser capazes de promover o escape endossomal nas células alvos. Dentre os veículos utilizados para carreamento de siRNAs temos os vetores virais e não virais. Devido as dificuldades em se trabalhar em larga escala com vetores virais, além de problemas citotóxicos, os vetores não virais são considerados mais seguros.

Os vetores não virais para transporte de siRNA (Figura 8) incluem nanopartículas lipídicas, lipossomas, nanopartículas metálicas, nanopartículas inorgânicas, dendrímeros, micelas, entre outros.

Figura 8- Sistemas nanocarreadores de siRNAs



Fonte: Adaptado de KIM; PARK; SAILOR, (2019).

Os lipossomas são os vetores de entregas de genes mais comumente utilizados, possuem capacidade de encapsular o siRNA em vesículas compostas por bicamada fosfolipídica (AGHAMIRI *et al.*, 2021). Nanopartículas feitas de lipídios como micelas e nanopartículas de lipídios sólidos possuem como vantagem a simplicidade de síntese e ampla gama de funções. No entanto, necessitam da utilização de materiais catiônicos adicionais para proporcionar aprisionamento das moléculas de siRNAs evitando vazamentos prematuros (AGHAMIRI *et al.*, 2021; KIM; PARK; SAILOR, 2019). Os polímeros representam o segundo grupo de materiais amplamente utilizados na entrega de siRNAs, sendo os principais

as nanopartículas poliméricas sólidas, dendrímeros e hidrogéis (KIM; PARK; SAILOR, 2019). Os dendrímeros compreendem nanomateriais poliméricos hiper-ramificados, monodispersos e com peso molecular definido. Possuem cavidades que permitem a encapsulação de moléculas de siRNA por meio de interações eletrostáticas, como vantagens apresentam biodegradabilidade, facilidade de síntese e modificações estruturais (ZORZI *et al.*, 2017). Portanto, os veículos de entrega de siRNAs podem exercer a função de proteção dos oligonucleotídeos bem como de superação das barreiras impostas por cada via de administração.

2.4.1 Nanopartículas híbridas

No início da década de 1970, Graham & Van Der Eb (1973) descreveram a utilização de precipitados de fosfato de cálcio (CaP) como reagentes de transfecção de DNA viral (GRAHAM; VAN DER EB, 1973). Os precipitados de CaP podem se ligar e encapsular poliânions/ácidos nucleicos por métodos baratos e protegê-los da degradação enzimática, porém apresentam rápido crescimento de complexos de fosfato de cálcio após sua preparação, resultando em aglomerados (LEVINGSTONE; HERBAJ; DUNNE, 2019). Além de adsorção de ácidos nucleicos, o CaP é um material inorgânico sensível ao pH, o que permite a liberação citosólica de siRNAs em pH endossomal ácido (XU *et al.*, 2016). Devido a liberação em pHs específicos, nanocarreadores constituídos de CaP permitem uma entrega lenta e controlada de fármacos e outras moléculas, apresentando estabilidade no preparo em pH fisiológico (DAN SON; KIM, 2017). Além disso, possuem biocompatibilidade e baixa toxicidade por ser um constituinte de ossos e dentes. Entretanto, o CaP pode levar a formação de agregados de cristais de CaP, que podem limitar sua aplicação *in vivo* (YIN *et al.*, 2019).

A adição de polímeros hidrofílicos como o PEG (polietilenoglicol), um polímero atóxico e não imunogênico, evita o crescimento de cristais de CaP controlando o tamanho deste nanocarreador e reduzindo a imunogenicidade das nanopartículas (MELLO *et al.*, 2017; YIN *et al.*, 2019). Desta forma, nanopartículas híbridas formadas por um núcleo inorgânico de CaP com adição do polímero PEG como revestimento externo, se tornam ótimas opções de nanocarreadores de siRNAs (PITTELLA *et al.*, 2011, 2012).

2.4.2 Nanoemulsões lipídicas

Nanoterapias se fazem úteis em tratamentos oculares uma vez que são capazes de superar barreiras anatômicas e fisiológicas presentes na via ocular. Apesar da via ser de fácil

acesso, o olho apresenta uma série de barreiras como estrutura do olho e drenagem lacrimal, que resultam na absorção de apenas 5% da dose administrada (SINGH *et al.*, 2020). Nanocarreadores lipídicos como as nanoemulsões apresentam compatibilidade ocular aumentada, devido aos seus componentes possuírem matrizes lipídicas que melhoram a solubilização e proteção de compostos hidrofóbicos. São amplamente utilizados como carreadores não invasivos e de baixo custo (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021a).

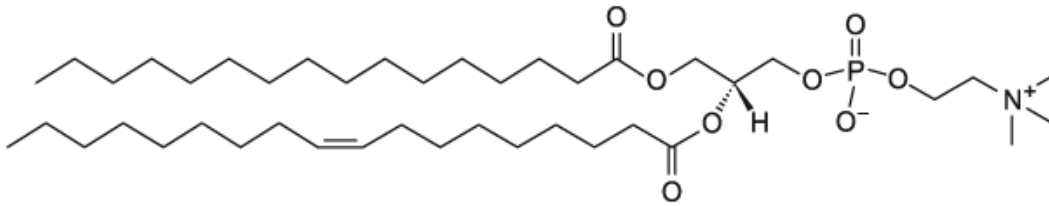
Nanoemulsões óleo/água são dispersões coloidais de um óleo, estabilizadas com um surfactante, que se apresentam como esferas e com tamanhos inferiores a 100 nm. Nanoemulsões podem aumentar a capacidade de atravessar membranas biológicas como a da córnea, além de aumentar o tempo de retenção do fármaco, melhorando a biodisponibilidade ocular (LIU *et al.*, 2020).

A escolha do surfactante nas nanoemulsões é de extrema importância, uma vez que este componente desempenha papel fundamental na irritação ocular, graças a sua capacidade de aumentar o tempo de retenção, vantagem que pode ocasionar efeitos como visão turva ou sensação de corpo estranho, diminuindo e até mesmo impedindo a adesão do paciente (LIU *et al.*, 2020). Recentemente, nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas – LAPEO) encapsulou o fármaco voriconazol em uma nanoemulsão lipídica composta por 70% de triglicerídeos de cadeia média (TCM) e 30% de lecitina de ovo, sendo esta considerada estável por 90 dias e atóxica em culturas de *Acanthamoeba* spp. e células de córnea de coelho (RODRIGUES, 2019).

TCM como o Miglyol 812N, são utilizados em nanocarreadores por suas propriedades, pois são 100 vezes mais solúveis em água do que os triglicerídeos de cadeia longa (TCL) (BRUXEL *et al.*, 2012).

Dentre os materiais amplamente empregados no desenvolvimento de nanoemulsões estão os fosfolípidos, como a L- α -fosfatidilcolina (lecitina) de ovo (Figura 9) que são biocompatíveis e biodegradáveis, sendo compostos principalmente de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, que não apresentam carga em pH fisiológico (MARTINI, 2005). As lecitinas podem ser obtidas de fontes animais como a gema do ovo e vegetais como da soja, são compostas por uma mistura de diferentes fosfolípidos que apresentam benefícios que diminuem eventos adversos e aumento da estabilidade (ZORZI *et al.*, 2017).

Figura 9- Estrutura química da L- α -fosfatidilcolina de ovo



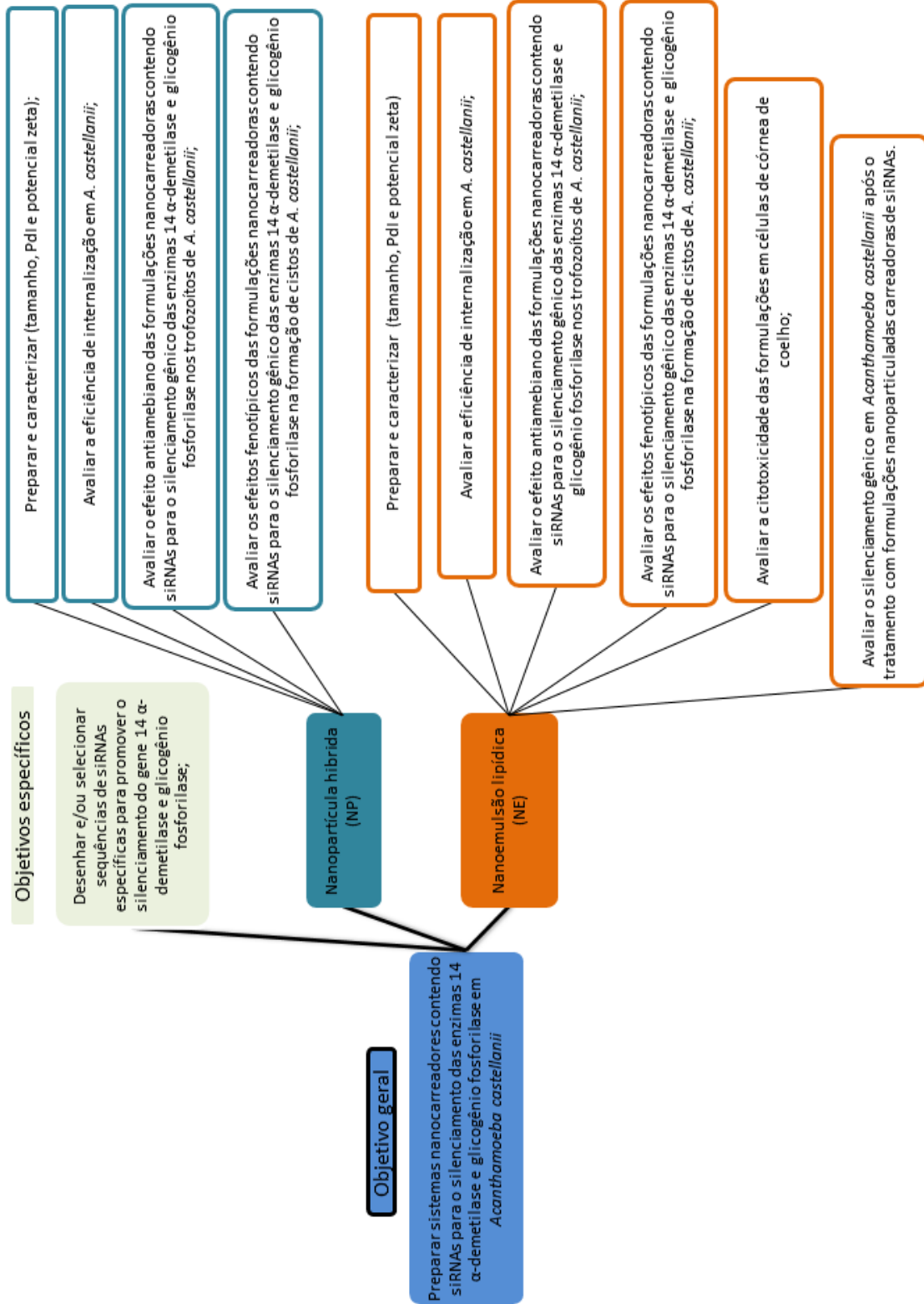
Estrutura química do agente emulsificante L- α -phosphatidylcholine (Egg, Chicken Avanti®). Fonte: A autora.

A utilização de nanoemulsões em ensaios com *Acanthamoeba* spp. é bem limitado. Dentre os trabalhos publicados, o estudo com o extrato vegetal de *Pterocaulon balansae*, que mostrou conter alta proporção de compostos cumarínicos, a atividade foi dependente da dose e tempo de incubação, chegando a reduzir 95% dos trofozoítos após 24 h (PANATIERI *et al.*, 2016a).

O carregamento de moléculas de siRNA utilizando nanoemulsões é pouco utilizado, porém com a aplicação de surfactantes catiônicos possibilitam interações eletrostáticas com as cargas negativas do siRNA (PIRHADI; AMANI, 2020).

Nanoemulsão composta por TCM e lecitina de ovo para encapsulamento do fármaco voriconazol e sua atividade frente a *Acanthamoeba* spp. foi estudada anteriormente por nosso grupo. Os resultados de atividade amebicida indicaram que as formulações carreadoras de voriconazol apresentaram-se ativas frente às formas de *Acanthamoeba* spp., e não irritantes em células de córnea de coelho (RODRIGUES, 2020).

3 OBJETIVOS



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de *Acanthamoeba castellanii*

No presente estudo, foi utilizada a cepa *Acanthamoeba castellanii* T4 (ATCC 50492) para os ensaios de atividade biológica. Os trofozoítos foram mantidos em cultura axênica em fase de crescimento exponencial, por meio de repiques a cada seis dias em meio PYG (2% de protease peptona, 0,2% de extrato de levedura e 1,8% de glicose), suplementado com antibióticos estreptomicina e penicilina G e incubada a 30 °C. Os cistos foram obtidos pela incubação em meio isento de nutrientes (NEM) com pH 8,8 a 9,0 (KCl 0,1 M, Tris amina 0,02 M, MgSO₄ 0,008 M, CaCl₂ 0,0004 M, NaHCO₃ 0,001 M), incubados a 30 °C durante 4 dias, como descrito por NEFF *et al.*, (1964).

4.2 Construção das sequências de siRNAs

Primeiramente, realizou-se a pesquisa de sequências do gene 14 α -demetilase para *A. castellanii* na base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). A sequência de mRNA de *A. castellanii* Neff foi selecionada (GenBank: KP970619.1). Após esta etapa, utilizou-se a ferramenta “Whitehead siRNA Selection Server” (<http://sirna.wi.mit.edu/home.php>) para o desenho das sequências de siRNAs, que permite selecionar o melhor siRNA pela homologia-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Sequências de pequenos RNAs de interferência, direcionadas ao domínio catalítico da 14 α -demetilase, enzima envolvida na biossíntese do ergosterol foram sintetizadas de acordo com critérios propostos por REYNOLDS *et al.*, (2004). Entre os critérios avaliados, destaca-se: baixo conteúdo de Guanina/Citosina (35-60%), garantindo a estabilidade devido às ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, além de evitar repetições de quatro ou mais nucleotídeos e, alvos localizados a 50-100 nucleotídeos pós-códon de início. Foram realizadas análises de homologia buscando pareamento com o genoma humano e de *Acanthamoeba castellanii* utilizando a ferramenta BLAST. Aspectos como energia potencial termodinâmica foram avaliados com a ferramenta Oligoanalyzer®.

As sequências escolhidas para o silenciamento gênico da glicogênio fosforilase foram selecionadas a partir do trabalho de Lorenzo-Morales e colaboradores (LORENZO-MORALES *et al.*, 2005). Como controle negativo de silenciamento, foi utilizada uma sequência não pareável com *Acanthamoeba* spp., desenhada a partir do embaralhamento da sequência para a enzima 14 α -demetilase, denominada de *Scramble* (SCR). Todas as sequências foram sintetizadas por Sigma-Aldrich Brasil e a Tabela 1 Tabela 1 apresenta os duplex de sequências utilizadas no trabalho.

Tabela 1- Oligonucleotídeos de siRNAs

Gene	Sequência (5'-3')	Peso Molecular (g/mol)	Espécie	Referência
14alpha	Senso: GCGACAUCUUCACGAUGAA Antisenso: UUCAUCGUGAAGAUGUCGC	13300	<i>A. castellanii</i>	Autor
Glicogênio fosforilase	Senso: CCGGCUACCGCACCAACAA Antisenso: UUGUUGGUGCGGUAGCCGG	13345	<i>A. castellanii</i>	(LORENZO-MORALES <i>et al.</i> , 2005)
Scramble	Senso: GCAACAUCCGGGAGUAAA Antisenso: UUUAAACUCCCGGAUGUUGC	13300	<i>A. castellanii</i>	Autor

Fonte: A autora.

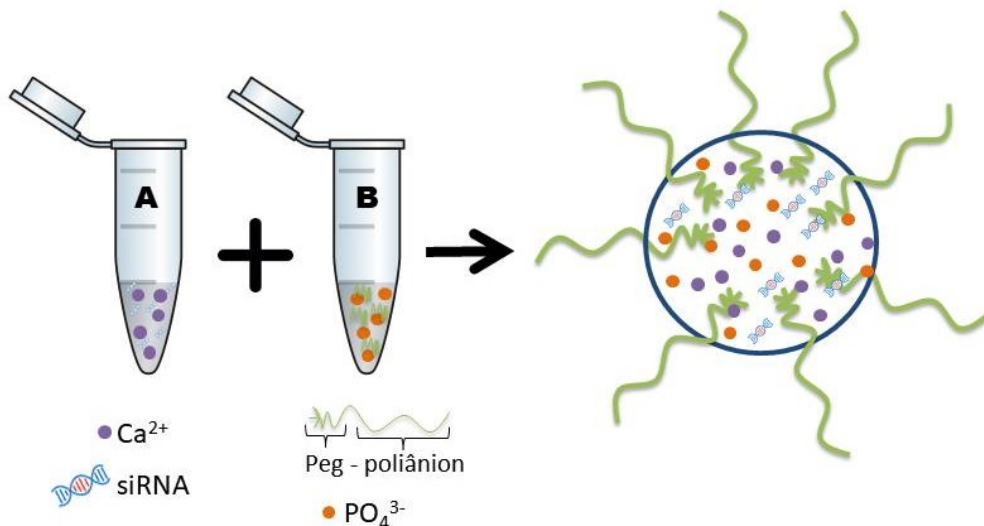
4.3 Preparação e caracterização das formulações nanocarreadoras de siRNAs

4.3.1 Preparação de nanopartículas híbridas

Com a finalidade de otimizar um nanocarreador de siRNAs e avaliação frente a trofozoítos de *A. castellanii*, nanopartículas híbridas foram preparadas de acordo com o protocolo estabelecido por Mello Junior (2017) e a nanoemulsão lipídica conforme descrito por RODRIGUES (2019), com modificações.

Nanopartículas híbridas (NP) foram preparadas em capela de fluxo laminar, com o objetivo de manter a esterilidade das formulações. Uma solução de CaCl_2 (2,5 M), siRNA 15 μM (previamente diluído em tampão Hepes 10 mM, pH 7,4) e TRIS 10 mM (pH 10) (solução A) foi adicionado, na proporção 1:1, a outra solução contendo PEG-GLU (400 μg / mL) e tampão HEPES 50 mM (pH 7,4) contendo Na_3PO_4 (1,5 mM) e NaCl (140 mM) (solução B), representado na Figura 10. O polímero PEG-Poliânion metoxi-poli (etileno glicol) - (L-ácido glutâmico) [PEG-b-poli(GLU)] foi adquirido através da empresa Alamanda Polymers Inc. As nanopartículas foram formadas por auto associação, através da mistura simples e estequiométrica de soluções iônicas aquosas como descrito por PITTELLA. (2012), com modificações, originando as formulações aqui nomeadas: nanopartículas livres de siRNA (NP_Mock), nanopartículas carregadas com siRNA 14 α -demetilase (NP_14alpha), siRNA glicogênio fosforilase (NP_Glico), siRNA Scramble (sequência não pareável em *Acanthamoeba* spp., (NP_SCR), siRNA livre (NK_Glico e NK_14alpha), e siRNA marcado com cianina-5 (NP_Cy5). Para os ensaios de atividade biológica, as formulações de NP foram purificadas utilizando-se ultrafiltros (10 kDa) Amicon® (centrifugação à $4000 \times g$, 10 min, 24 °C) e ressuspensas em solução Tris 10 mM, pH10.

Figura 10- Ilustração esquemática do preparo de nanopartícula híbrida contendo siRNAs



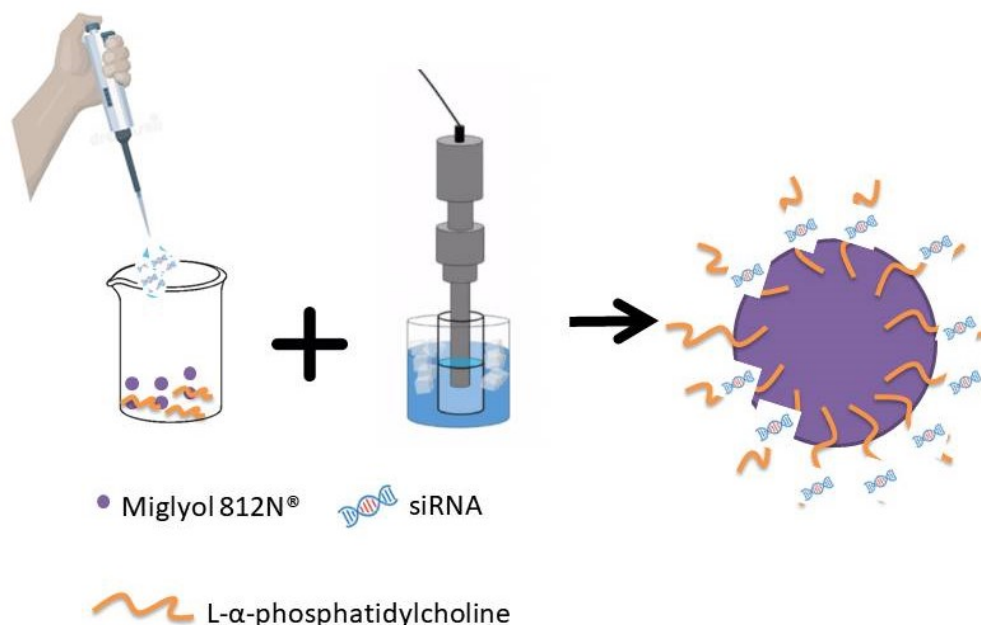
Fonte: Adaptado de PITTELLA et al. (2011).

4.3.2 Preparo da nanoemulsão lipídica

A nanoemulsão lipídica (NE) foi preparada por emulsificação espontânea, utilizando sonda sonicadora do tipo Vibra cell – ultrasonic processor (Sonics & Materials, Inc, EUA),

conforme descrito por RODRIGUES (2019), com modificações. Composta por 70% de triglicerídeos de cadeia média (Miglyol 812N®, Alemanha) como fase oleosa e 30% L- α -fosfatidilcolina (Egg, Chicken Avanti®) agente emulsificante, dissolvidos em clorofórmio-metanol (2:1, v/v), a mistura foi seca em capela de exaustão para remover totalmente os solventes orgânicos. Posteriormente, adicionou-se PBS 1X e a mistura foi sonicada por 20 minutos. O siRNA (Figura 11) foi adicionado na etapa de ressuspensão dos lipídios juntamente com o PBS para incorporação. As dispersões finais foram mantidas a 4 °C, ao abrigo de luz. Foram nomeadas: nanopartículas livres de siRNA (NE_Mock), nanopartículas carregadas com siRNA 14 α -demetilase (NE_14alpha), siRNA glicogênio fosforilase (NE_Glico), siRNA Scramble (sequência não pareável em *Acanthamoeba* spp., NE_SCR), siRNA livre (NK_Glico e NK_14alpha), e siRNA marcado com cianina-5 (NE_Cy5).

Figura 11- Ilustração esquemática do preparo da nanoemulsão lipídica contendo siRNAs



Fonte: a autora.

4.3.3 Caracterização das formulações nanocarreadoras

A caracterização das formulações NP e NE foi realizada pela determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e carga de superfície (potencial zeta), por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS - Dynamic Light Scattering) com feixe de laser HeNe (633 nm), em ângulo de detecção de 173°, utilizando o equipamento Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Para as formulações

de NP, as medidas de tamanho e PDI foram realizadas em condições de armazenamento a 4 °C, nos tempos 0 e 7 dias, em triplicata. Para a NE, as medidas de tamanho e PDI foram realizadas a partir das amostras diluídas na proporção 1:10 em PBS 1X em condições de armazenamento a 4 °C, nos dias 0, 1, 7, 14, 21 e 28 em triplicata. O potencial zeta das formulações foi avaliado no tempo zero e somente para as formulações sem siRNA (NP_Mock e NE_Mock).

4.3.4 Observação da internalização de nanocarreadores em *Acanthamoeba castellanii*

Para avaliar a endocitose das nanopartículas em *A. castellanii*, 10^6 trofozoítos foram incubados em placas com fundo de vidro para microscopia confocal, com as formulações de nanopartículas (NP e NE) carregando siRNAs (siRNA para gene humano, não homólogo a nenhuma sequência da espécie de *Acanthamoeba*) marcado com cianina 5 (NP_Cy5 e NE_Cy5), siRNA livre marcado com Cy5(Naked) e Mock (NP_Mock e NE_Mock), a 30 ° C, por 24 h para NP e 15 h para a NE. Na sequência, as amebas foram incubadas com LysoTrackerGreen DND-26 (Thermo Scientific ®) na concentração de 70 nM, durante 60 minutos. As células foram lavadas com PBS 1X, realizou-se a fixação com paraformaldeído 4% por 15 minutos, seguido de novas lavagens com PBS. Adicionou-se a sonda fluorescente 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 1:2500 (v/v) por 10 minutos, seguido de lavagens e adição de PBS 1X nas placas. A coloração azul demonstra a marcação do núcleo com DAPI, verde a marcação do endossomo\lisossomo com LysoTracker, e em vermelho o siRNA marcado com Cy5. As imagens por microscopia confocal foram obtidas no Laboratório Central de Microscopia da UFSC e no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia, utilizando um microscópio Leica DMI6000 B (Leica Microsystems®), com óleo de imersão e objetiva de 20X.

4.4 Estudo da atividade biológica dos nanocarreadores contendo siRNAs frente a formas de *Acanthamoeba castellanii*

4.4.1 Avaliação da viabilidade de trofozoítos e formação de cistos de *Acanthamoeba castellanii* após incubação com nanopartículas híbridas contendo siRNAs

Aproximadamente 8×10^4 trofozoítos/mL de *A. castellanii* foram inoculados em placas de 96 poços com as formulações NP_Mock, NP_14alpha, NP_Glico, NK_14alpha, NK_Glico e NP_SCR. O meio PYG foi utilizado nos ensaios de avaliação de atividade das NP frente aos trofozoítos durante 48 h de incubação. Para avaliação da formação de cistos, os

trofozoítos foram incubados em meio NEM juntamente com as NP por 96 h. A viabilidade das formas amebianas foi determinada por contagem em hemocítômetro, utilizando o corante de viabilidade azul de tripano (0,4%). As concentrações de siRNAs utilizadas foram de 0,09 μ M e 1 μ M/ poço. Como controle negativo, utilizou-se uma sequência não pareável em *Acanthamoeba* spp. denominada de si_Scramble (NP_SCR) e nanopartículas sem siRNA (NP_Mock). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. Nos tratamentos com concentrações maiores de siRNA, as formulações foram concentradas usando ultrafiltros Amicon®.

4.4.2 Avaliação da viabilidade de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* após incubação com nanoemulsão lipídica contendo siRNAs

A viabilidade dos trofozoítos de *A. castellanii* frente à nanoemulsão carreadora de siRNAs foi determinada pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue® (JHA *et al.*, 2015; MCBRIDE *et al.*, 2005). O volume de 50 μ L de uma suspensão de 16×10^5 trofozoítos/mL de *A. castellanii* foram inoculados em placas de 96 poços com 5 μ L das formulações Mock, NE_14alpha, NE_Glico, NE_SCR, NE_G14. Após 24 h de incubação, foi adicionado do reagente Alamar Blue®, na concentração de 10%, seguido de incubação por 8h em ambiente escuro. A leitura foi realizada em Multileitora Infinite M200 TECAN utilizando um comprimento de onda de 530/615 (excitação/emissão). Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e utilizando a concentração de 0,25 μ M de siRNAs.

4.4.3 Avaliação da inibição do encistamento de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* após incubação com nanoemulsão lipídica contendo siRNAs

Para os ensaios de avaliação da inibição da formação de cistos maduros, aproximadamente 8×10^4 trofozoítos/mL de *A. castellanii* foram inoculados meio NEM em placas de 96 poços com as seguintes formulações: Mock, NE_14alpha, NE_Glico, NE_SCR e os dois siRNAs na formulação NE_G14. Ao final do período de incubação (96 h), cistos maduros viáveis foram quantificados em hemocítômetro, utilizando o corante de viabilidade azul de tripano (0,4%). Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e utilizando a concentração de 0,25 μ M de siRNAs.

4.4.4 Coloração com branco de calcoflúor

A avaliação fenotípica dos cistos formados foi realizada pela marcação da presença de celulose com branco de calcoflúor (Sigma) (MOON *et al.*, 2014). Cistos maduros com

dupla parede exibiram fluorescência azul com maior intensidade, devido à presença de celulose em ambas as paredes, presente em maior quantidade no endocisto. Após o tratamento dos trofozoítos em meio NEM (descrito na seção 4.4.3) com alteração da placa por microtubos, frente às formulações de NE contendo siRNA (NE_Mock, NE_Glico, NE_14alpha e NE_G14). Os microtubos foram centrifugados a 200 g por 5 minutos e o pellet foi ressuspenso na solução de branco de calcoflúor puro e incubado por 20 minutos, seguido de lavagem com PBS. Lâminas de microscopia foram preparadas e as amostras foram observadas em Microscópio Invertido Olympus IX83 disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e imagens digitalizadas foram processadas usando o software Olympus cellSens Imaging.

4.5 Avaliação da citotoxicidade das formulações da nanoemulsão lipídica

Para avaliação da citotoxicidade foi utilizada a linhagem celular de córnea de coelho SIRC (ATCC® – CCL 60). As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² em meio de cultivo DMEM suplementado com 2 mM de glutamina, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após atingir confluência de 95%, as células SIRC foram inoculadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5x10⁵ células/poço por 24 h de incubação. Posteriormente as células foram tratadas com 10 µL das formulações Mock, NE_14alpha, NE_Glico, NE_SCR, NE_G14 e incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 h em contato com o tratamento, retirou-se totalmente o volume dos tratamentos dos poços e 200 µL de MTT 0,5 mg/mL foi adicionado, seguido de 2 h de incubação em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C e da adição de 150 µL DMSO. A leitura foi realizada na Multileitora Infinite M200 TECAN, utilizando um comprimento de onda de 540 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e utilizando a concentração de 0,25 µM de siRNAs. Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem de células viáveis média e erro padrão.

4.6 Avaliação do silenciamento gênico após o tratamento com formulações nanolipídicas carreadoras de siRNA

A avaliação da expressão dos genes alvos relacionados ao processo de encistamento de *A. castellanii* foi realizada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Trofozoítos (5x10⁶ células/microtubos) de *A. castellanii* foram incubados em meio de encistamento (NEM) durante 15h com as

formulações de NE: NE_Mock, NE_SCR, NK_Glico, NE_Glico, NK_14alpha, NE_14alpha, NK_G14 e NE_G14 (MOON *et al.*, 2014).

4.6.1 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído utilizando o reagente fenol-clorofórmio (Tryzol® Invitrogen, CA, USA), conforme instruções do fabricante. Para a avaliação da concentração e pureza do RNA total foram realizadas determinações espectrofotométricas em NanoVue™, GE Healthcare, Reino Unido (A260 e A260/280nm). O RNA total foi ressuspense em água livre de DNase/RNase, quantificado por absorbância a 260 nm e estocado à - 80 °C até o momento da realização da síntese do DNA complementar (cDNA).

4.6.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Após as extrações, o cDNA foi sintetizado através do uso do kit High capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems®, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os cDNAs obtidos foram armazenados à -20° C para posterior análise por PCR quantitativa. Para amplificar os genes alvo, uma solução de 10 µM dos iniciadores específicos (senso e antissenso) foi misturada com Power SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific Inc, CA, EUA). Para glicogênio fosforilase foram utilizadas as sequências de iniciadores AAGCTGGAGGACCTCTACGA (senso) e TGCTTCATCGACAGCTGCGCGTA (antissenso) e para 14 α-demethylase CTGCATGGGCGAGAAGTTTG (senso) e GGTGTACCTGAGAAGGCACG (antissenso).

O gene 18S rDNA foi utilizado como gene de referência, para normalizar os resultados das diferentes amostras (MOON *et al.*, 2012, 2014). Foram utilizados os iniciadores gênero-específico JDP1 (Senso)5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3' e JDP2 (Antissenso)5'- TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA-3'. Para a RT-qPCR, o equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems ®) foi utilizado. As condições de ciclagem térmica estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1- Condições da reação de qPCR

	40 ciclos					Curva de dissociação			
Tempo	2'	15'	15''	30''	38''	15''	1'	15''	∞
T (°C)	50	95	94	57	72	95	60	95	4

4.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram apresentados como médias e erro padrão da média para os ensaios de viabilidade frente a *Acanthamoeba*. Nas análises de tamanho, PDI e citotoxicidade foram expressos como médias e desvio padrão. A análise estatística utilizada foi One-way anova com pós-teste de Tukey's determinada pelo programa GraphPadPrism 5.0 para as análises de tamanho e índice de polidispersão das nanopartículas. Para os ensaios de viabilidade celular frente às células de coelho foi realizada análise estatística por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Nas análises de viabilidade amebiana e RT-qPCR foi utilizado o teste t student. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção e caracterização das formulações nanocarreadoras

As características de tamanho médio e índice de polidispersão (PdI) das formulações de NP e NE foram analisadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS), e os resultados estão apresentados na Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente. De acordo com a análise, a formulação NP_Glico, apresentou diâmetros hidrodinâmicos médios no tempo zero de $75,76 \pm 0,77$ nm e após 7 dias de $196,3 \pm 3,53$ nm. Já a formulação NP_14alpha, apresentou tamanho médio nos tempos zero e após 7 dias de $89,21 \pm 0,36$ nm e $127,6 \pm 1,69$ nm, respectivamente.

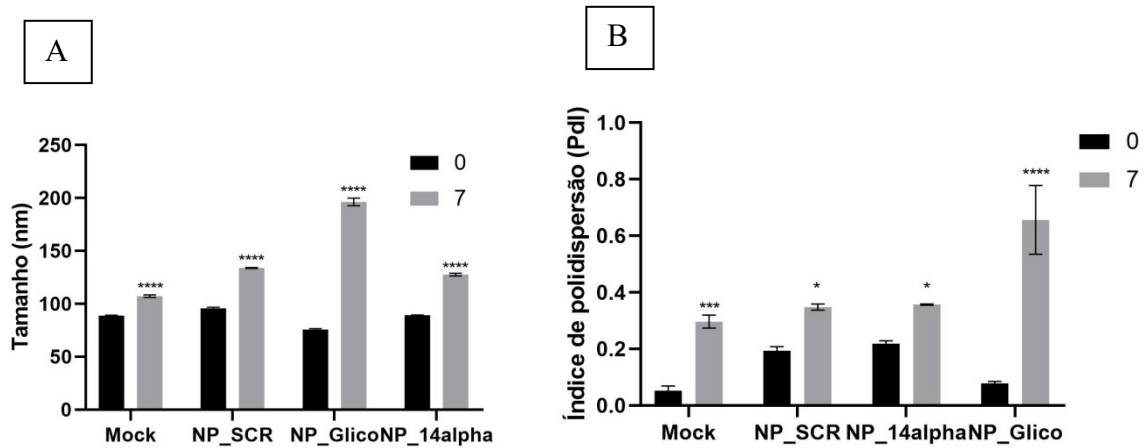
Os valores de PdI encontrados, para NP_Glico foram de $0,078 \pm 0,01$ a $0,656 \pm 0,12$ e NP_14alpha de $0,218 \pm 0,01$ a $0,357 \pm 0,002$, demonstrando a presença de diferentes populações de nanopartículas com diferentes tamanhos nas amostras, uma vez que quanto menor PdI maior será a homogeneidade do sistema. O potencial zeta de NP_Mock apresentou valor negativo no tempo zero de $-0,296$ mV.

Tabela 2 - Avaliação da estabilidade da formulação de nanopartículas híbridas a 4° C.

Formulação	Dias	Tamanho Médio de Partícula (nm)	PdI
NP_Mock	0	$88,88 \pm 0,4$	$0,052 \pm 0,01$
	7	$107,2 \pm 1,15$	$0,296 \pm 0,02$
NP_SCR	0	$95,73 \pm 1,08$	$0,194 \pm 0,01$
	7	$133,9 \pm 0,45$	$0,347 \pm 0,01$
NP_Glico	0	$75,76 \pm 0,77$	$0,078 \pm 0,01$
	7	$196,3 \pm 3,53$	$0,656 \pm 0,12$
NP_14alpha	0	$89,21 \pm 0,36$	$0,218 \pm 0,01$
	7	$127,6 \pm 1,69$	$0,357 \pm 0,002$

Resultados expressos em média \pm desvio padrão (DP), N=3. PdI – índice de polidispersão. Fonte: Própria autora

Figura 12 - Avaliação da estabilidade da formulação de nanopartículas híbridas a 4° C.



Medidas de DLS das formulações de NP. (A) Tamanho das nanopartículas e (B) índice de polidispersão (PDI). As barras apresentadas nos gráficos em preto e cinza representam os resultados obtidos no tempo zero (0) e após 7 dias, respectivamente. Análise representativa de três experimentos independentes. * Diferença significativa por Anova pós-teste de Turkey ($p > 0,05$); ** ($p > 0,002$), *** ($p > 0,0002$) e **** ($p < 0,0001$) quando comparados com os tempos 0. Nanopartículas sem siRNA (NP_Mock), nanopartículas com si Scramble (NP_SCR), nanopartículas com si_glico (NP_Glico) e nanopartículas com siRNA_14alpha (NP_14alpha). Fonte: Própria autora

A nanoemulsão lipídica utilizada foi preparada conforme o estudo de Rodrigues (2019), os parâmetros físico-químicos (Tabela 3) foram analisados durante 28 dias por DLS, as amostras foram diluídas em PBS (1:10). O tamanho médio para NE_Glico variou de $129,1 \pm 0,60$ a $205,3 \pm 22,13$ nm e para NE_14alpha de $107,9 \pm 0,60$ a $126,03 \pm 1,15$ nm. Na tabela 3 e Figura 13A pode-se observar a variação dos tamanhos ao longo dos 28 dias analisados e a diferença quando comparadas com o tempo 0. O potencial zeta de NE_Mock apresentou valor negativo no tempo zero de $-0,369$ mV, próximo a neutralidade.

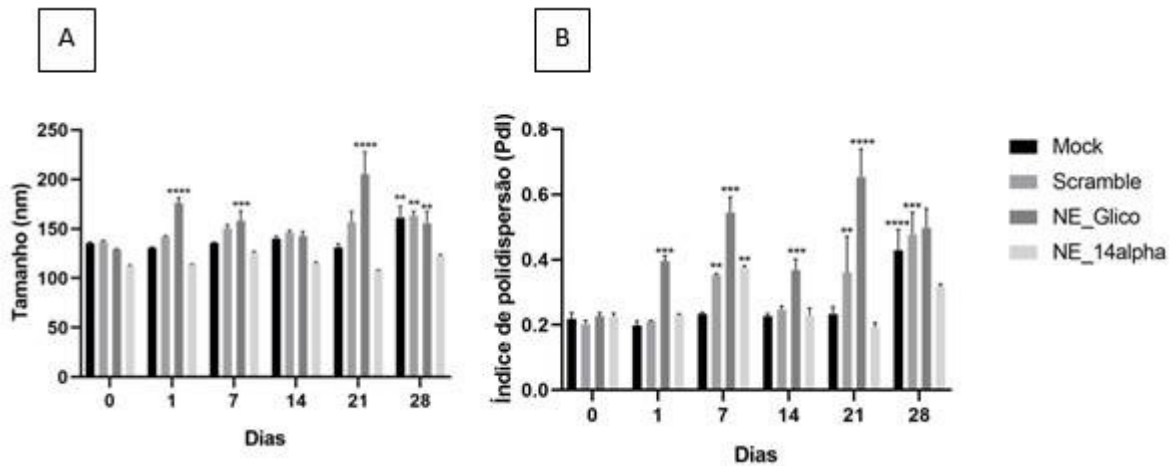
Tabela 3 - Avaliação da estabilidade da formulação da nanoemulsão lipídica a 4 °C.

Formulação	Dias	Tamanho Médio de Partícula (nm)	PdI
Mock	0	$135,5 \pm 1,27$	$0,218 \pm 0,018$
	1	$130,6 \pm 0,92$	$0,198 \pm 0,013$
	7	$135,7 \pm 0,65$	$0,234 \pm 0,004$
	14	$140,2 \pm 2,52$	$0,227 \pm 0,007$
	21	$131,2 \pm 3,78$	$0,233 \pm 0,021$
	28	$161,1 \pm 11,60$	$0,429 \pm 0,063$
NE_SCR	0	$136,9 \pm 1,50$	$0,202 \pm 0,011$
	1	$141,8 \pm 1,09$	$0,210 \pm 0,003$
	7	$150,7 \pm 3,20$	$0,352 \pm 0,004$
	14	$146,1 \pm 2,15$	$0,247 \pm 0,011$
	21	$156,7 \pm 10,92$	$0,360 \pm 0,110$
	28	$163,5 \pm 4,05$	$0,477 \pm 0,067$
NE_Glico	0	$129,1 \pm 0,60$	$0,227 \pm 0,01$
	1	$176,4 \pm 4,87$	$0,396 \pm 0,015$

	7	158,2 ± 9,80	0,544 ± 0,047
	14	142,8 ± 4,41	0,368 ± 0,032
	21	205,3 ± 22,13	0,653 ± 0,085
	28	155,5 ± 12,16	0,498 ± 0,058
NE_14alpha	0	112,1 ± 1,27	0,226 ± 0,009
	1	113,9 ± 0,40	0,230 ± 0,003
	7	126,03 ± 1,15	0,375 ± 0,006
	14	115,13 ± 1,27	0,230 ± 0,021
	21	107,9 ± 0,60	0,193 ± 0,012
	28	122,7 ± 1,09	0,317 ± 0,007

Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP), N=3. PDI – índice de polidispersão. Fonte: Própria autora

Figura 13 - Avaliação da estabilidade da formulação da nanoemulsão lipídica a 4 °C.



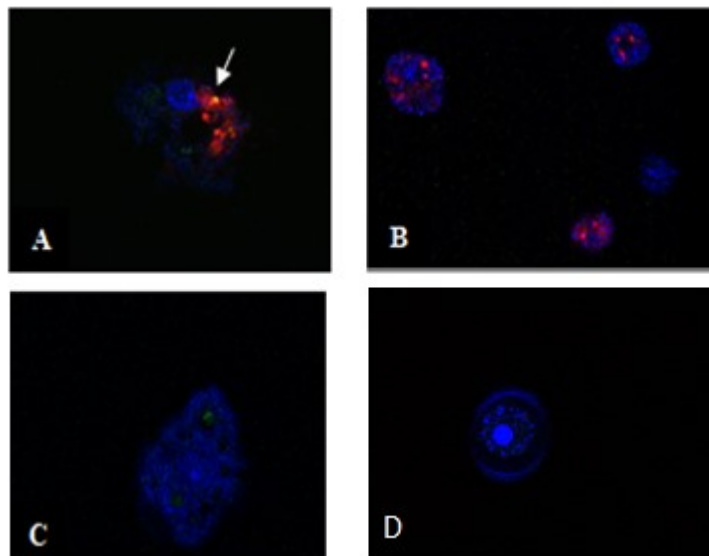
Medidas de DLS das formulações de NE. (A) Tamanho das nanopartículas e (B) índice de polidispersão (PDI). Análise representativa de três experimentos independentes. * Diferença significativa por Anova pós-teste de Turkey ($p > 0,05$); ** ($p > 0,002$), *** ($p > 0,0002$) e **** ($p < 0,0001$) quando comparados com os tempos 0. NE sem siRNA (NE_Mock), NE com si_Scramble (NE_SCR), NE com si_glico (NE_Glico) e NE com si_14alpha (NE_14alpha). Fonte: Própria autora

De acordo com a análise do índice de polidispersão (PDI) (Figura 13 B) houve variação de $0,227 \pm 0,01$ a $0,653 \pm 0,085$ para NE_Glico, e $0,193 \pm 0,012$ a $0,375 \pm 0,006$ para NE_14alpha, respectivamente. Indicando a presença de diferentes populações ao longo dos dias analisados.

5.2 Internalização das formulações nanocarreadoras de siRNAs em *Acanthamoeba castellanii*

Para avaliar a internalização de siRNA em trofozoítos de *A. castellanii* utilizou-se um siRNA marcado com cianina 5 (Cy5), que emite fluorescência em vermelho, incorporado nos nanocarreadores. A marcação do endossoma/lissosoma pelo LysoTrackerGreen foi avaliada pela emissão de fluorescência em verde. A Figura 14, apresenta as imagens obtidas por microscopia confocal após 3 h (Figura 14B) e 24 h de incubação (Figura 14A) com NP contendo siRNA marcado com Cy5 (NP_Cy5) e siRNA_Cy5 sem nanopartícula (Naked).

Figura 14- Análise por microscopia confocal de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* tratados com a formulação de nanopartículas híbridas e siRNA_Cy5.

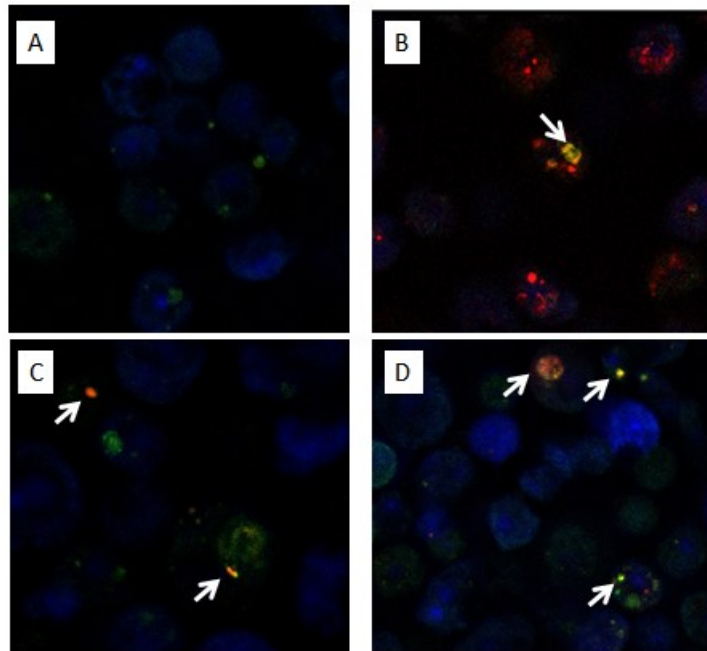


Trofozoítos de *Acanthamoeba* foram analisados após tratamento com NP_Cy5. (A) imagem representativa de células incubadas com NP_Cy5 durante 24 h, em que a seta branca indica a co-localização de NP_Cy5 e endossomo/lisossomo. (B) células incubadas com NP_Cy5 durante 3 h. (C) NP_Mock incubada com as células por 3 h e em (D) células incubadas com siRNA livre (Naked_Cy5) por 24 h. A coloração azul representa a marcação do núcleo com DAPI, verde a marcação do endossomo/lisossomo com LysoTracker, e em vermelho a marcação com o siRNA marcado com Cy5. A seta branca indica a co-localização de NP_Cy5 e endossomo/lisossomo. Fonte: Própria autora.

A Figura 15 apresenta imagens por microscopia confocal após 15 h de incubação com a nanoemulsão lipídica. Em ambas as imagens (Figura 14 e Figura 15) os endossomos/lisossomos são representados em verde, o núcleo em azul e o siRNA_Cy5 em vermelho. A coloração em amarelo representa a co-localização (seta branca) dos pixels vermelho e verde (si_Cy5 e endossomo/lisossomo, respectivamente), sugerindo a eficácia dos

sistemas nanocarreadores avaliados em entregar o siRNA para o interior dos trofozoítos e promover o escape endossomal.

Figura 15 - Análise por microscopia confocal de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* tratados com nanoemulsão lipídica.



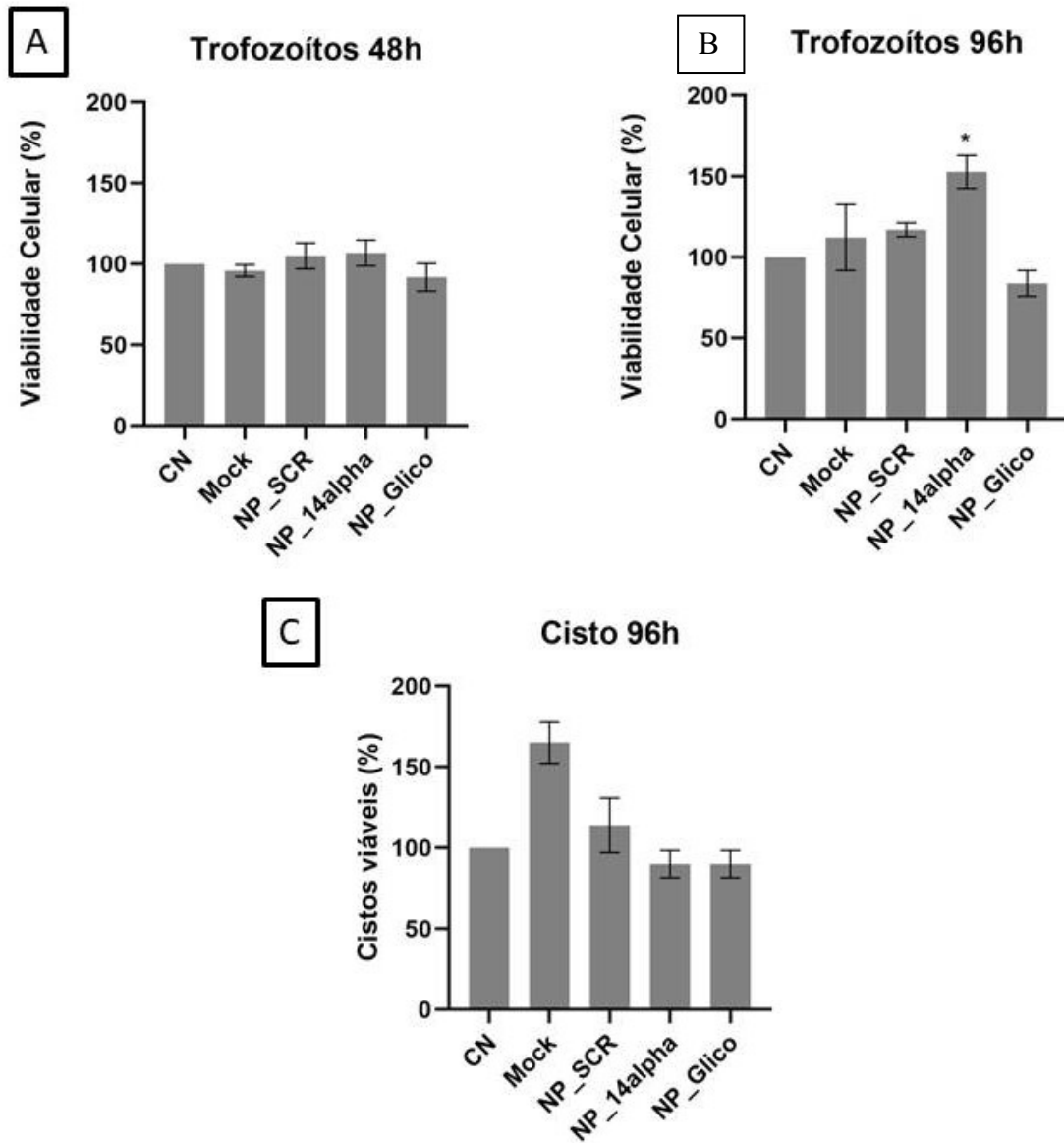
Trofozoítos de *Acanthamoeba* foram analisados após tratamento com NE_Cy5. (A) NE_Mock incubado com as células (B) células incubadas com siRNA livre (Naked_Cy5) (C e D) imagem representativa de células incubadas com NE_Cy5 por 15 h. A coloração azul representa a marcação do núcleo com DAPI, verde a marcação do endossomo\lisossomo com Lysotracker, e em vermelho a marcação com o siRNA marcado com Cy5. A seta branca indica a co-localização de NE_Cy5 e endossomo/lisossomo. Fonte: Própria autora.

5.3 Avaliação da viabilidade de trofozoítos e formação dos cistos de *Acanthamoeba castellanii* após tratamentos com a formulação de nanopartículas híbridas carreadoras de siRNAs

As formas de *A. castellanii* foram analisadas por meio de contagem em hemocítmetro após incubação com as formulações de nanopartículas híbridas contendo siRNAs, afim de avaliar a viabilidade dos trofozoítos e a formação de cistos após tratamentos com os siRNAs alvos. Conforme mostrado na Figura 16 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** A e B, a formulação NP_14alpha não diminuiu a viabilidade dos trofozoítos na concentração de siRNA testada (0,09 μM /poço), nos tempos de 48 h e 96 h de incubação. Observou-se efeito após 96 h de incubação frente aos trofozoítos na formulação NP_Glico, com diminuição da viabilidade em 17%. Os controles utilizados (NP_Mock e NP_SCR) não

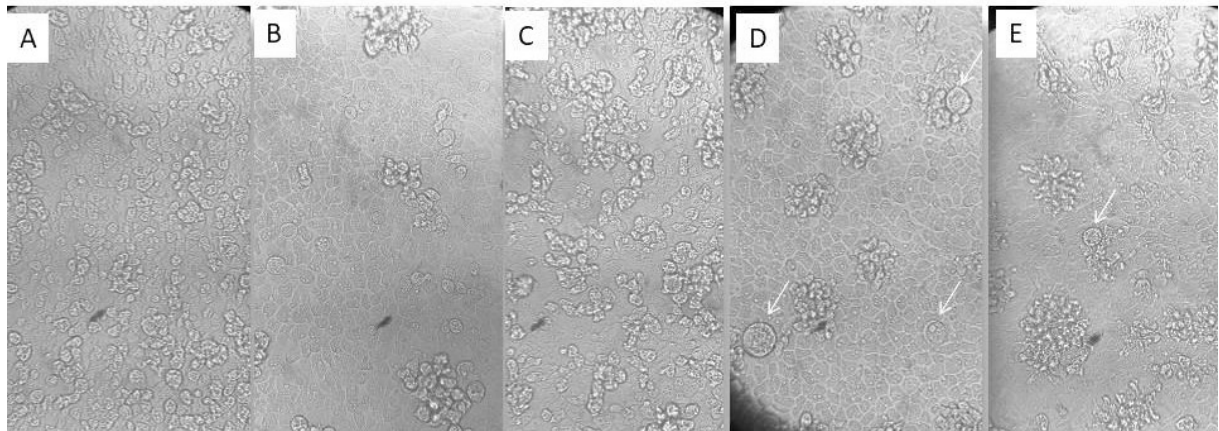
promoveram diminuição na viabilidade celular dos trofozoítos. A morfologia dos trofozoítos foi avaliada em microscópio de luz invertida durante a incubação de 96 h com as formulações de siRNA testadas. As células do protozoário apresentaram alterações morfológicas como alongamento, arredondamento e aumento do tamanho celular com vacuolização, demonstrando estresse celular, porém sem a formação de cistos (Figura 17). Após incubação dos trofozoítos em meio de encistamento NEM com as formulações, foi observado diminuição de 10% na formação de cistos maduros nos tratamentos com NP_14alpha e NP_Glico (Figura 16C).

Figura 16 - Viabilidade dos trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba castellanii* após tratamento com nanopartículas híbridas, na presença e ausência de siRNAs.



Trofozoítos de *A. castellanii* foram incubados no meio PYG (A e B) e no meio NEM para indução do encistamento (C) com as formulações Mock, NP_14alpha, NP_Glico e NP_SCR, durante 48 h e 96 h. Após o tempo de incubação, as células foram contadas em câmara de Fuchs-Rosenthal utilizando o corante de viabilidade azul de tripano (0,4%). Resultados apresentados como média \pm erro padrão da média das triplicatas (n=1). *Valor de $p < 0,05$ comparados com o controle negativo (Teste t de student). CN=controle negativo (células incubadas apenas com meio de cultivo, sem tratamento). Fonte: Própria autora.

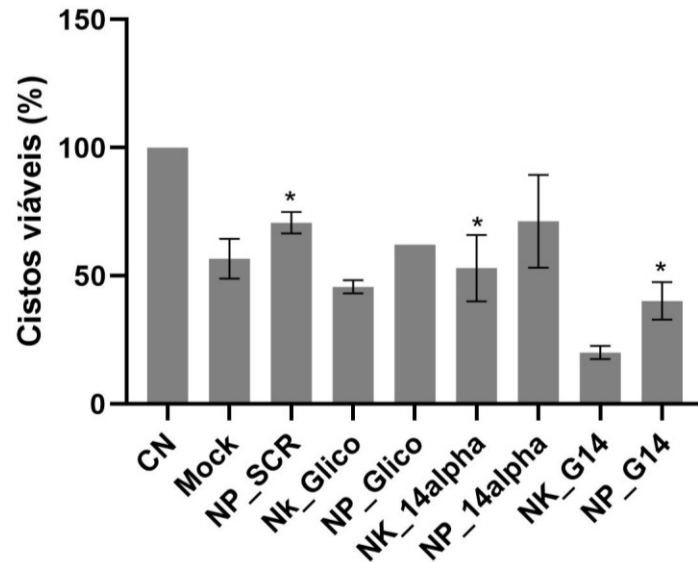
Figura 17- Morfologia dos trofozoítos após incubação com a formulação de nanopartículas híbridas.



Trofozoítos de *Acanthamoeba* após incubação com controle negativo com meio PYG (A), NP_Mock (B) NP_SCR (C), NP_14alpha (D) e NP_Glico (E) após 96 horas, em que a seta branca indica trofozoítos arredondados com aumento celular. Fonte: Própria autora.

Os primeiros resultados com siRNAs na concentração de 0,09 μM demonstraram baixa atividade nos trofozoítos e pouca inibição na formação de cistos maduros, optou-se desta forma em aumentar a concentração de siRNAs nos tratamentos com NP de 0,09 μM para 1 μM , bem como realizar a avaliação da atividade dos siRNAs livres (Naked) e em combinação (G14). A Figura 18 demonstra os resultados dos testes utilizando a concentração de 1 μM /poço de siRNAs. Observou-se diminuição dos cistos viáveis de 55% para NK_Glico e 38% para NP_Glico, já para NK_14alpha e NP_14alpha houve diminuição significativa de 47% e 29%, respectivamente. Quando analisados os siRNAs 14alpha e glico (G14) em combinação, houve diminuição de até 80% de cistos maduros para NK_G14 e 60% para NP_G14. Observou-se também a formação de grandes agregados nos tratamentos com 1 μM de siRNA, expostos na Figura 19, que dificultaram a contagem das células viáveis. Desta forma, optou-se por encerrar os ensaios com este carreador, seguindo somente com a NE.

Figura 18 - Cistos viáveis após tratamento com a formulação de nanopartículas híbridas carreadoras de siRNAs.



Trofozoítos incubados em meio NEM para indução do encistamento com as formulações NP_Mock, NP_14alpha, NP_Glico e NP_SCR na concentração de 1 μ M, durante 96 h. A viabilidade celular foi avaliada por contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal utilizando o corante de viabilidade azul de tripano (0,4%). Resultados apresentados como média e erro padrão da média das triplicatas (n=1). *Valor de $p < 0,05$ comparados com o controle negativo (Teste t de student). CN=controle negativo (células incubadas apenas com meio de cultivo, sem tratamento). Fonte: Própria autora.

Figura 19 - Agregados formados após incubação das células com NP_siRNA na concentração de 1 μ M

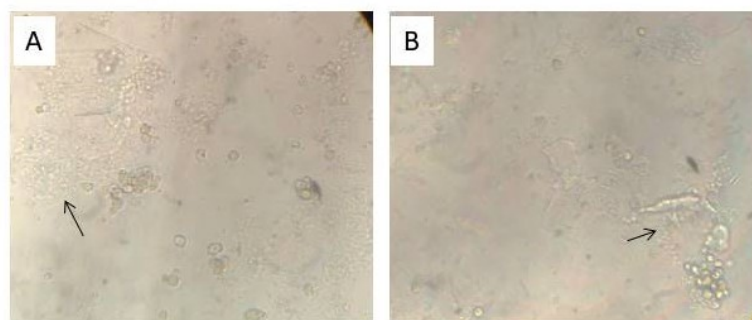
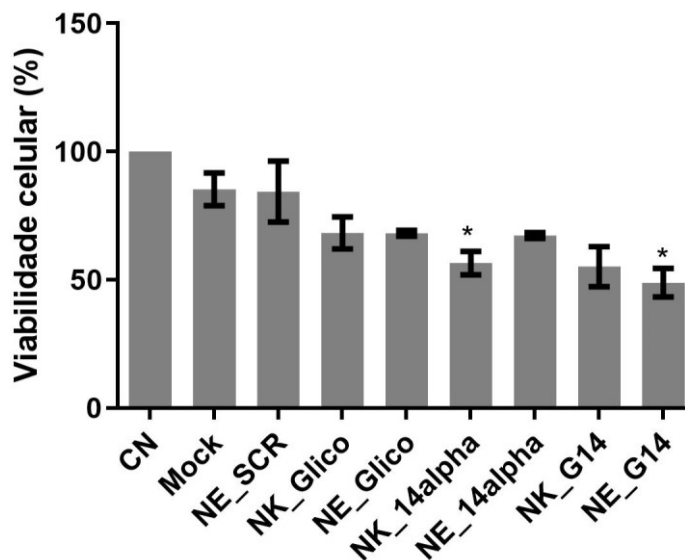


Imagem de microscopia em campo claro após 96 h de incubação com formulações de NP. Seta indicando agregados que impossibilitaram contagem de células. Fonte: Própria autora.

5.4 Avaliação da viabilidade de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* após tratamento com a formulação de nanoemulsão lipídica carreadora de siRNAs

A partir dos resultados apresentados na Figura 20, pode-se observar a diminuição na viabilidade dos trofozoítos tratados com as formulações NE com e sem siRNAs quando comparadas ao controle negativo. Houve diminuição de 32% da viabilidade de trofozoítos para NK_glico e NE_Glico. Para os tratamentos com NK_14alpha e NE_14alpha houve uma diminuição de 57% e 33% nos trofozoítos, respectivamente. Quando os siRNAs Glico e 14alpha (G14) foram avaliados em associação, houve uma diminuição na viabilidade dos trofozoítos de 45% e 51% para NK_G14 e NE_G14.

Figura 20 - Viabilidade dos trofozoítos após tratamento com nanoemulsão lipídica carreadora de siRNAs.



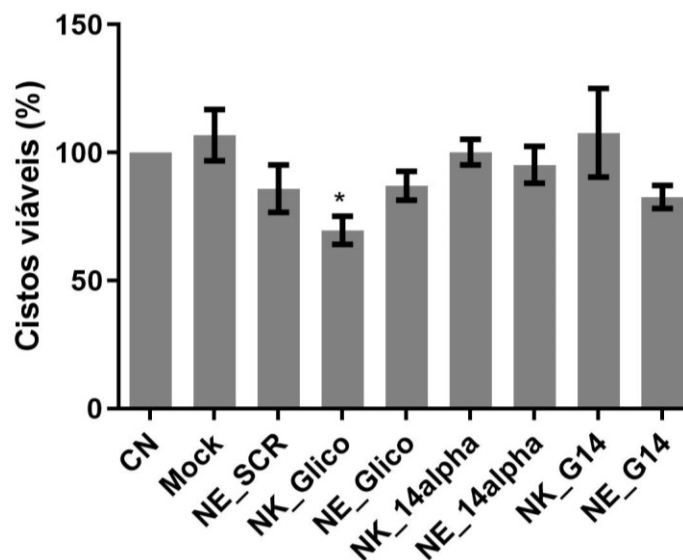
Viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* tratados com as formulações NE e na ausência de siRNAs por 24h. Após o tempo de incubação, a viabilidade foi avaliada pelo método de oxi-redução por Alamar Blue®. CN=controle negativo (células incubadas apenas com meio de cultivo, sem tratamento), nanoemulsão sem siRNA (Mock), formulação da nanoemulsão com si_scramble (NE_SCR), formulação da nanoemulsão com siRNAs glicogênio fosforilase (NE_Glico) e 14 α -demetilase (NE_14alpha), siRNAs livres (NK_Glico e NK_14alpha) e os siRNAs associados (G14). Resultados apresentados como média e erro padrão da média das triplicatas (n=3). *Valor de $p < 0,05$ comparados com o controle negativo (Teste t de student). Fonte: Própria autora.

5.5 Avaliação da inibição da formação de cistos de *Acanthamoeba castellanii* após tratamento com a nanoemulsão lipídica carreadora de siRNAs

Para avaliar a formação de cistos maduros viáveis de *A. castellanii* após tratamento com as formulações da nanoemulsão carreadora de siRNAs, utilizou-se a contagem em

hemocítômetro e o corante de viabilidade Trypan Blue®. Os resultados são apresentados na Figura 21. Pode-se observar que após tratamento com NK_Glico ocorreu diminuição significativa de 30% na formação de cistos maduros, e 13% para NE_Glico. Nos tratamentos com NK_14alpha e NE_14alpha não observou-se diminuição na formação dos cistos maduros em relação ao controle não tratado, e quando utilizados os dois siRNAs em combinação (G14) observou-se diminuição de 18% dos cistos para NE_G14 quando comparado ao controle.

Figura 21- Viabilidade dos cistos após tratamento com nanoemulsão lipídica carreadora de siRNAs.



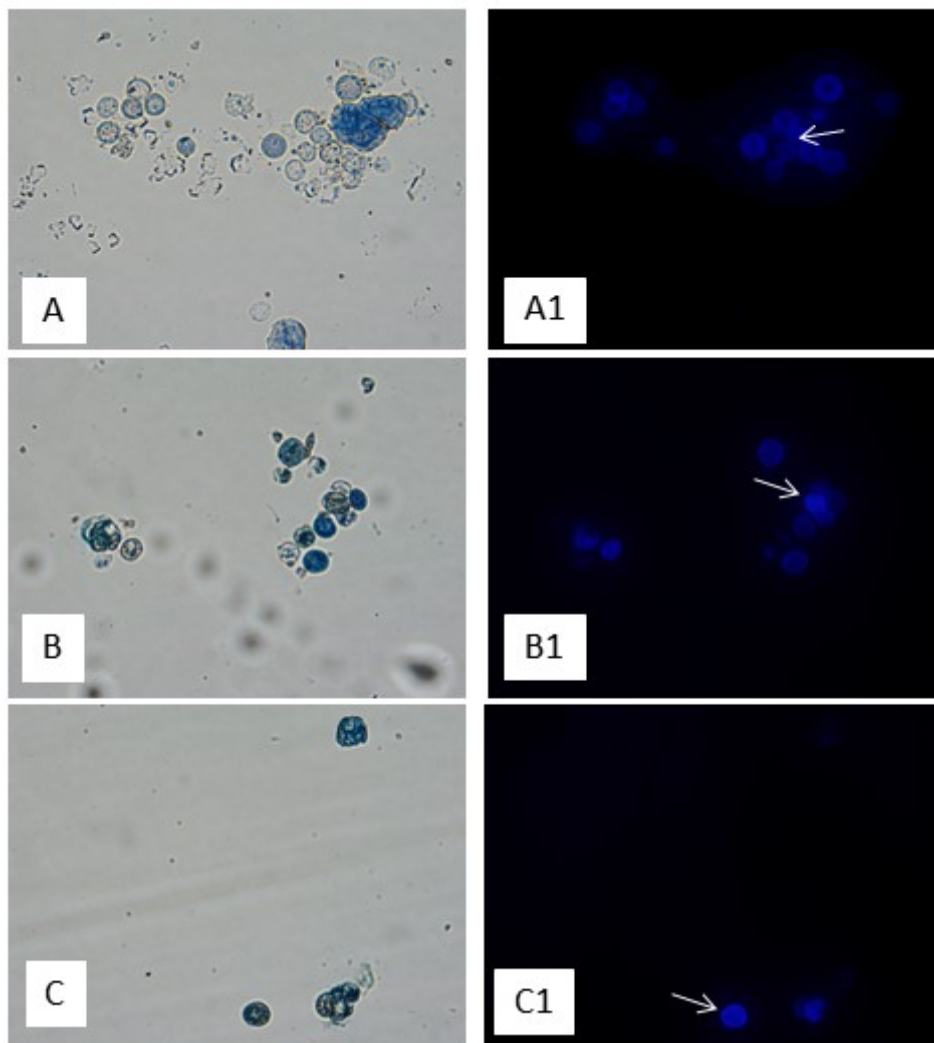
Trofozoítos de *A. castellanii* foram incubados em meio NEM para indução de encistamento (96 h de incubação) com as seguintes formulações: controle negativo (CN), nanoemulsão sem siRNA (Mock), formulação da nanoemulsão com si_scramble (NE_SCR), formulação da nanoemulsão com siRNAs glicogênio fosforilase (NE_Glico) e 14 α -demetilase (NE_14alpha), siRNAs livres (NK_Glico e NK_14alpha) e os siRNAs associados (G14). Após o tempo de incubação, cistos viáveis com parede dupla foram contados em câmara de Fuchs-Rosenthal usando corante de viabilidade azul de tripano (0,4%). *Valor de $p < 0,05$ comparados com o controle negativo (Teste t de student). Resultados apresentados como média e erro padrão da média ($n = 3$). Fonte: Própria autora.

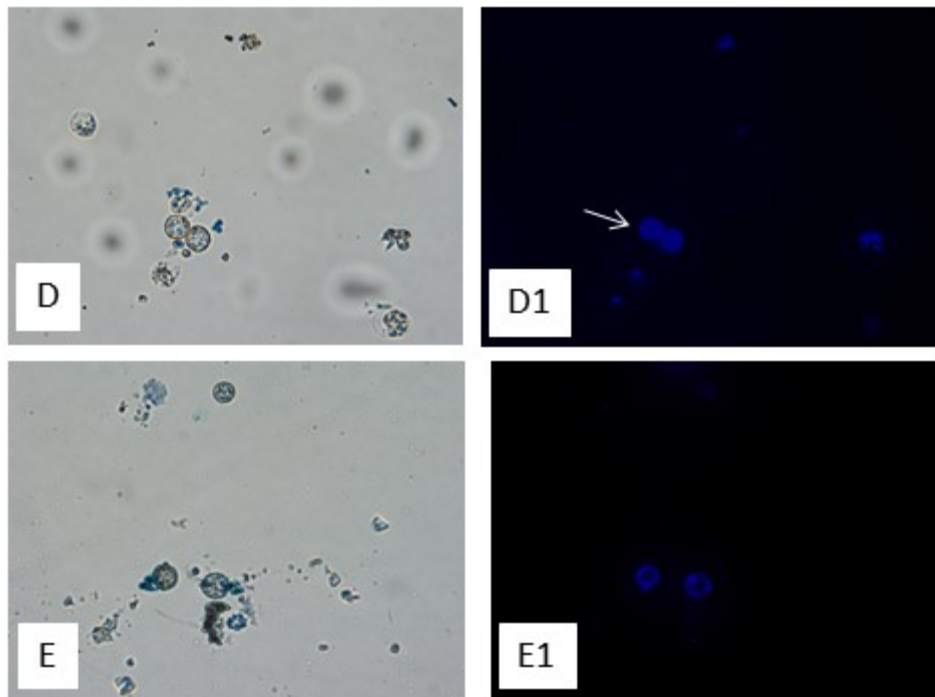
5.6 Coloração dos cistos com calcoflúor white após tratamento com as formulações de nanoemulsão lipídica carreadora de siRNAs

A Figura 22 é representativa da análise por microscopia de fluorescência dos tratamentos com NE com siRNAs (NE_Glico, NE_14alpha e NE_G14) e na ausência de siRNA (controle negativo e NE_Mock) de trofozoítos de *A. castellanii*, incubados em meio de encistamento (NEM) por 96 h. Os cistos aparecem em azul fluorescente no campo escuro. Dois padrões de coloração por fluorescência podem ser observados nos cistos presentes nos diferentes tratamentos. Os cistos maduros apresentaram-se totalmente fluorescentes, isto é,

com maior intensidade de fluorescência por apresentar dupla parede, enquanto os pré-cistos apresentaram apenas uma parede e com menor intensidade de fluorescência. Nas amebas tratadas com as formulações nanocarreadoras de siRNAs (NE_Glico, NE_14alpha e NE_G14), observou-se menor número de cistos e a maioria pré-cistos (cistos de parede única). Pode-se observar que no controle negativo (A) e quando tratado com a Mock (B) houve maior quantidade de cistos maduros e pré-cistos de *A. castellanii*, que possuem a tendência em se aglomerar durante o processo de encistamento. Já nos tratamentos com as formulações contendo siRNAs (Figura 22 C-E), observou-se diminuição no número de cistos maduros. A coloração de calcoflúor não foi observada em trofozoítos.

Figura 22 - Coloração com branco de calcoflúor após 96h de tratamento com as formulações da nanoemulsão carreadoras de siRNAs.



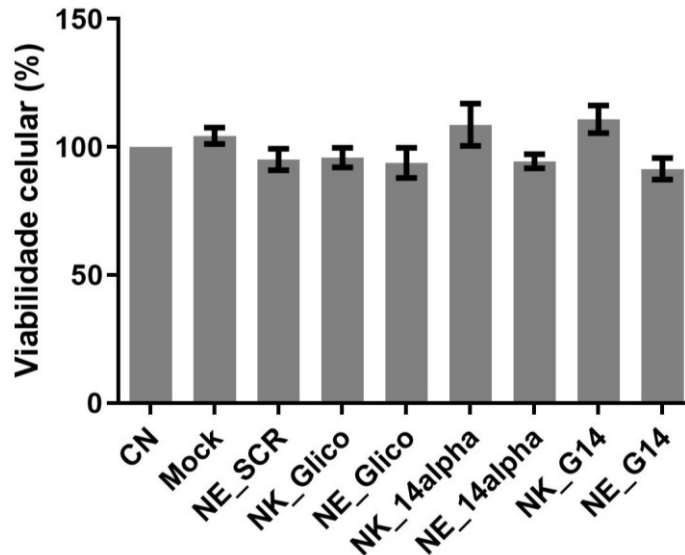


Formação da parede do cisto, detectada por coloração com calcofluor White. Controle negativo (células incubadas apenas com meio de encistamento (A), NP_Mock (B), NE_Glico (C), NE_14alpha (D) e NE_G14 (E). Setas brancas indicam cistos maduros com maior intensidade de fluorência. Imagens obtidas em microscópio invertido Olympus IX83, aumento de 20X. Fonte: Própria autora.

5.7 Citotoxicidade das formulações da nanoemulsão lipídica em células de córnea de coelho

A Figura 23 representa a viabilidade celular da linhagem de células de córnea de coelho SIRC, após exposição às formulações da NE com e sem siRNAs (NE_siRNA, NE_Mock), siRNAs livres (Naked) e na combinação dos siRNAs (G14). As formulações testadas mantiveram a viabilidade celular próxima a 100% (variando entre 91 a 108%), sem diferença em relação ao controle negativo.

Figura 23- Viabilidade de células de córnea de coelho (ATCC® - CCL 60) frente a formulações da nanoemulsão lipídica com e sem siRNA



Avaliação da viabilidade celular da linhagem de células de córnea de coelho (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea) (ATCC® - CCL 60) após incubação com as formulações sem siRNA (NE_Mock), NE_SCR, NE_Glico, NE_14alpha, NK_Glico, NK_14alpha, e NE_G14, durante 24 h. Os resultados correspondem à média \pm desvio padrão da média de dois experimentos independentes. Kruskal-Wallis pós-teste Dunn ($p > 0,05$). CN=controle negativo (células incubadas apenas com meio de cultivo, sem tratamento). Fonte: própria autora.

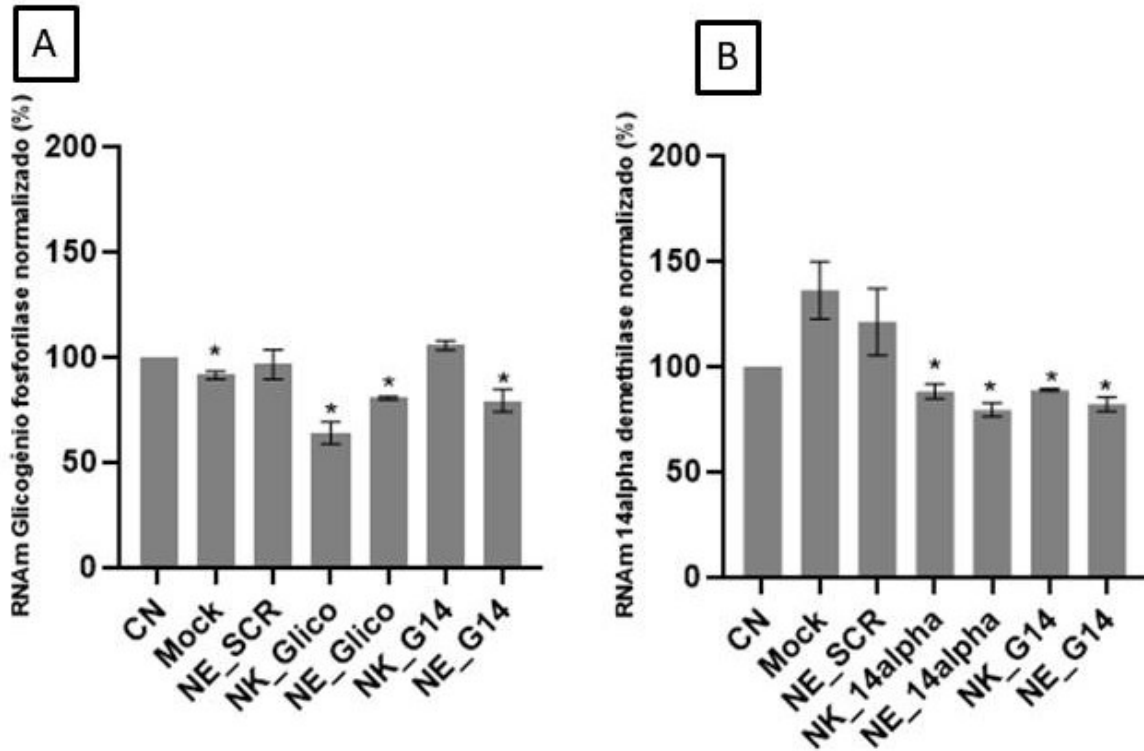
5.8 Avaliação da expressão dos genes glicogênio fosforilase e 14 α -demetilase durante o processo de indução do encistamento após o tratamento com as formulações da nanoemulsão lipídica carreadora de siRNA

Para avaliar o efeito dos siRNAs no silenciamento dos genes alvo relacionados ao processo de encistamento de *A. castellanii*, análises por RT-qPCR permitiram avaliar o nível de expressão dos RNAm da glicogênio fosforilase e 14 α -demetilase após 15 h de tratamento com as formulações de NE carreadoras de siRNAs. Pode-se observar na Figura 24A, que houve redução de aproximadamente 36% da expressão do gene glicogênio fosforilase com o tratamento NK_Glico, e de aproximadamente 20% após incubação com NE_Glico e NE_G14, quando comparados ao grupo controle não tratado.

Para o gene 14 α -demetilase (Figura 24B), após 15 h de tratamento, observou-se redução de 21% da expressão de RNAm com a formulação NE_14alpha, 12% para NK_14alpha, e de 18% para NE_G14, quando comparados ao grupo controle não tratado.

Para ambos os genes alvos, os controles negativos não tratado, Mock e NE_SCR não ocasionaram silenciamento, confirmando a especificidade do fenômeno mediado por siRNAs alvos em *A. castellanii*.

Figura 24 - Análise quantitativa da expressão dos genes glicogênio fosforilase e 14 α -demetilase durante o processo de encistamento após o tratamento com as formulações da nanoemulsão carreadora de siRNAs.



Análise quantitativa da expressão de RNAm da glicogênio fosforilase (A) e 14 α -demetilase (B) em *A. castellanii* por RTqPCR. As células foram incubadas com as formulações por 15 h em meio de encistamento. Controle negativo (CN), branco (Mock) NE_Glico, NE_14alpha e NE_G14. Os resultados foram normalizados pelo gene 18S rDNA. Os resultados correspondem à média \pm erro padrão da média. *Valor de $p < 0,05$ comparados com o controle negativo (Teste t de student). n=3. Fonte: Própria autora.

6 DISCUSSÃO

A diferenciação celular em eucariontes é um processo biológico fundamental, que permite sobrevivência a diversas variações ambientais durante seus ciclos de vida. O protozoário do gênero *Acanthamoeba* é um dos organismos capazes de realizar essa diferenciação, adquirindo a forma cística conforme estímulos externos (BÍNOVÁ; BÍNA; NOHÝNKOVÁ, 2021). A alta resistência das formas císticas de *Acanthamoeba* spp. associada a tratamentos inespecíficos, leva a necessidade pela busca de novas opções terapêuticas seguras e menos tóxicas.

Bloquear mecanismos de autoproteção impedindo o processo de encistamento pode ser uma estratégia para interromper o ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp., uma vez que os trofozoítos são suscetíveis a tratamentos como biguanidas e diamidinas (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020b).

RNAs de interferência são abordagens atuais e opções terapêuticas para o tratamento de de doenças, e/ou validam alvos na descoberta de novos tratamentos. Estudos em *Acanthamoeba* spp. mostram que a utilização desta metodologia para a modulação da atividade de genes como glicogênio fosforilase (LORENZO-MORALES *et al.*, 2008; ZORZI *et al.*, 2019b), proteína Ac-HSP20 (WANG *et al.*, 2020a), Ac CP6 (WANG *et al.*, 2020b), serina protease (MOON *et al.*, 2008), xilose isomerase (AQEEL; SIDDIQUI; KHAN, 2012), celulose sintase (MOON *et al.*, 2015a), proteína quinase C (EK *et al.*, 2012), proteína arginina metiltransferase (MOON *et al.*, 2017), protease de cisteína (AcStefin) (LEE *et al.*, 2013) e na enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA)(MARTÍN-NAVARRO *et al.*, 2013), induziram a diminuição dos cistos, bem como geraram danos as paredes císticas. A combinação de dois siRNAs, um direcionado para a serino protease e outro para a glicogênio fosforilase em *Acanthamoeba*, demonstrou que poderiam afetar a taxa de crescimento e sobrevivência de amebas (LORENZO-MORALES *et al.*, 2010).

No presente trabalho, formulações nanocarreadoras de siRNAs foram otimizadas e aplicadas frente a formas de *A. castellanii* na busca por novas alternativas terapêuticas para a ceratite amebiana. Alguns azóis tem mostrado resultados promissores frente a *Acanthamoeba* spp., atuando na inibição da enzima 14 α -demetilase, inibindo conseqüentemente a produção de ergosterol e acúmulo do substrato lanosterol (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020a; LACERDA; LIRA, 2021b). Nosso grupo de pesquisas vem desenvolvendo estudos de reposicionamento de fármacos antifúngicos como a Anfotericina B (BÜCHELE *et al.*, 2021), que interage com o ergosterol, levando a formação de poros através das membranas lipídicas e

também novas formulações para aplicação tópico ocular de voriconazol (RODRIGUES, 2019), que atua na inibição da enzima 14 α -demetilase envolvida na síntese do ergosterol. Os estudos demonstraram resultados promissores para administração tópico ocular destes fármacos, considerados bons agentes no tratamento da ceratite amebiana.

Sequências de siRNAs para o silenciamento da enzima 14 α -demetilase, foram desenhadas conforme critérios já estabelecidos (REYNOLDS *et al.*, 2004) e sequências de siRNAs já conhecidas para glicogênio fosforilase foram utilizadas (LORENZO-MORALES *et al.*, 2008). Ainda foram realizadas pesquisas de homologia pela análise da similaridade fornecida pela ferramenta BLAST, buscando o pareamento com o genoma humano e de *A. castellanii*, na busca por especificidade para o patógeno, para utilização futura em formulações oftálmicas.

Para que ocorra a transfecção de ácidos nucleicos é importante ter um carreador que internalize no organismo alvo e realize o escape endossomal após a endocitose. Devido à instabilidade dos siRNAs, se faz necessário o uso de vetores para entrega eficiente na célula alvo (SUBHAN; TORCHILIN, 2020). Sistemas de entrega não virais como lipossomas, micelas, emulsões, dendrímeros e nanoemulsões estão sendo amplamente estudados e utilizados, porém, é necessário que esses sistemas possuam boas propriedades de tráfego, alta eficiência e transfecção de siRNA dependendo do local de administração (KIM; PARK; SAILOR, 2019).

Neste estudo, as sequências de siRNA foram incorporadas em duas nanopartículas, sendo a primeira delas uma nanopartícula híbrida (NP) formada por automontagem de compostos orgânicos e inorgânicos e a outra uma nanoemulsão lipídica (NE) preparada pelo método de emulsificação espontânea. Após microscopia confocal foi possível visualizar a encapsulação dos siRNAs em *A. castellanii* para ambas as nanopartículas avaliadas, pela colocação dos pixels vermelho (si_Cy5) e verde (endossoma), resultando na coloração amarela, demonstrando a capacidade de ambas as formulações carregarem e entregarem sequências de siRNAs no endossoma da ameba e permitir o escape endossomal. A presença do siRNA livre (Naked) dentro dos trofozoítos foi observada, isto deve-se ao fato deste protozoário possuir alta capacidade fagocítica, semelhante aos macrófagos (RAYAMAJHEE *et al.*, 2021). Apesar de realizarem o aporte dos siRNAs dispersos no meio, ainda se faz necessário a utilização de nanocarreadores, uma vez que moléculas de siRNA sem proteção são susceptíveis a degradação no organismo por RNAses (HATTAB; GAZZALI; BAKHTIAR, 2021).

As nanopartículas híbridas utilizadas neste trabalho têm como componentes orgânicos e inorgânicos, o fosfato de cálcio (CaP) e o polímero PEG-Poliânion metoxi-poli (etileno glicol) - (L-ácido glutâmico) [PEG-b-poli(GLU)]. Em trabalhos desenvolvidos previamente por Souza (2016), formulações com esse polímero mostraram-se ideais para o carregamento de siRNAs em células de câncer de mama triplo-negativas, por serem considerados biocompatíveis, apresentarem baixa citotoxicidade, estabilidade coloidal, eficiência na entrega de ácidos nucleicos em células e liberação controlada no sítio alvo (REGINA; SOUZA, 2016).

Após incorporação dos siRNAs, as características de tamanho e PDI foram analisadas nas NP após 7 dias de armazenamento em 4 °C. As formulações apresentaram aumento nos diâmetros hidrodinâmicos médios em todas as NP, com tamanhos próximos a 200 nm. Nanopartículas poliméricas possuem tamanho entre 10 a 1000 nm, atualmente são amplamente estudadas como sistemas de liberação ocular, pelas suas vantagens como aumento de aderência a superfície ocular e liberação controlada de fármacos, com potencial uso como colírios para tratamento de doenças da córnea (CHAURASIA *et al.*, 2015). O índice de polidispersão (PDI) apresentado após 7 dias foi superior a 0,3 em todas as formulações, indicando a falta de homogeneidade. Esses valores demonstram falta de estabilidade das amostras no tempo e temperatura avaliados, concluindo que o aumento do tamanho médio das partículas ocorreram durante o armazenamento, o que implica na necessidade de aprimoramento nas técnicas de preparo e armazenagem.

Nanoemulsões são carreadores promissores para tratamentos oftálmicos, pois permitem aumento da solubilidade de fármacos e possuem a capacidade de atingir maior área de superfície de contato, o que resulta em melhora na biodisponibilidade (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021b). A homogeneidade das formulações de nanoemulsão carreando siRNA foi avaliada pelo tamanho e índice de polidispersão (PDI) durante 28 dias. Os valores de PDI obtidos para as formulações de NE com siRNA sofreram alterações significativas no decorrer dos 28 dias avaliados, demonstrando a presença de diferentes populações de partículas. Ainda, para todas as formulações avaliadas, os valores de PDI ultrapassaram 0,3 após 28 dias. Resultados de PDI inferiores a 0,1 ou 0,2 indicam medições adequadas e de boa qualidade da suspensão coloidal (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021b). Com exceção da formulação NE_14alpha, todas as formulações tiveram um aumento significativo no tamanho no decorrer dos 28 dias avaliados. Enquanto partículas de tamanho próximo a 20 nm são eliminadas rapidamente, partículas com tamanho até 200 nm oferecem permeabilidade e

movilidade adequadas através das barreiras oculares (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021a). Em nanoemulsões, o tamanho das partículas depende da tensão interfacial entre a interface óleo-água e da energia livre dos solventes, sendo que tamanhos superiores a 120 nm podem ser benéficos para a via ocular, pois aumentam o tempo de retenção (PANATIERI *et al.*, 2016b).

Os valores de potencial zeta para ambos os nanocarreadores foram na faixa de -0,296 e -0,369 mV, para NP e NE, respectivamente. Valores que revelam cargas superficiais próximas à neutralidade é uma característica vantajosa por minimizar interações entre nanopartículas e ambiente biológico (VERMA; STELLACCI, 2010).

A purificação das nanopartículas (NP) foi necessária para a remoção do excesso de íons livres, diminuindo a formação de agregados ao adicionar a formulação aos meios de cultivo ideais para crescimento da *Acanthamoeba* spp. Após contagem em hemocítmetro, na concentração de 0,09 μM / poço, foi possível observar que nos trofozoítos não houve atividade das NP nos tempos estudados, e para os cistos ocorreu a diminuição de apenas 10% em sua formação após 96 h de incubação com as formulações contendo os siRNAs. Desta forma optou-se por aumentar as concentrações de siRNA para 1 μM / poço. Apesar de apresentar diminuição dos cistos viáveis após 96 h de incubação na concentração de 1 μM , observou-se também a formação de grandes agregados, estes prováveis acúmulo de cristais de CaP (LEIVINGSTONE; HERBAJ; DUNNE, 2019), que dificultaram a contagem das formas amebianas, além de ser necessário a utilização de grandes quantidades de siRNA para se chegar a concentração de 1 μM , desta forma optou-se por não dar continuidade aos testes com o nanocarreador híbrido.

O ensaio Alamar Blue® foi utilizado para avaliar quantitativamente a viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* quando inoculados com nanoemulsão lipídica (NE) contendo siRNA (NE_Glico; NE_14alpha), siRNAs livres (NK_Glico e NK_14alpha) e sem siRNA (NE_Mock), além do possível efeito sinérgico dos siRNAs 14alpha e Glico (NE_G14). A partir dos resultados observou-se diminuição do número de trofozoítos após incubação de 24 h em todos os tratamentos, o que sugere efeito de inibição dos siRNAs nos trofozoítos do protozoário. Além disso, maior atividade antiamebiana foi identificada no tratamento com NE_14alpha, possivelmente pela presença de esteróis como o ergosterol nas membranas deste protozoário quando em trofozoíto, refletindo na diminuição do número de trofozoítos por fragilizar a membrana (THOMSON *et al.*, 2017). Fármacos azólicos são amplamente utilizados por via tópica ocular, o cetoconazol sistêmico e o fluconazol oral vem sendo

utilizado e sendo eficazes em tratamentos de ceratite amebiana (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020a). Atualmente nosso grupo demonstrou a atividade do fármaco voriconazol, que atua na inibição da desmetilação da enzima 14 α -lanosterol, interferindo na síntese de ergosterol, quando utilizado em cepas de *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) e o isolado clínico regional AM T4 (RODRIGUES, 2019). Resultado semelhante ao estudo de IOVIENO *et al.*, (2014), onde o voriconazol demonstrou atividade anti-cisticida.

O siRNA livre não é capaz de atravessar as membranas celulares através da difusão passiva, devido ao seu peso molecular e cargas negativas dos grupamentos fosfatos (SUBHAN; TORCHILIN, 2020). Entretanto nos resultados da formação de cistos, após incubação das formulações de NE com trofozoítos de *Acanthamoeba* em meio NEM, houve diminuição na formação dos cistos quando tratados com NK_Glico (30%), resultado relacionado possivelmente a capacidade fagocítica deste protozoário, fagocitando majoritariamente os siRNAs livres. Sabe-se que pode ocorrer a entrega direta de siRNA em trofozoítos, como no estudo de Lorenzo e colaboradores (2005), que os tratamentos com siRNA livre, usando a técnica de imersão, silenciou efetivamente a expressão de genes endógenos. *Acanthamoeba* spp. também são relacionadas como uma possível fonte de reserva de material genético, tal como plasmídeos de resistência e a inserção para o interior da ameba pode ocorrer durante o processo fagocítico (BERTELLI; GREUB, 2012; SAISONKORH *et al.*, 2010).

O efeito do silenciamento no processo de encistamento de *A. castellanii* em meio de indução de encistamento, demonstrado pelas análises de expressão dos níveis de RNAm (Seção 5.8 – Figura 24A e B) confirmam a transfecção dos siRNAs para as formulações NE_Glico e NE_G14. O efeito do silenciamento nas NE ocasionaram a diminuição da formação de cistos maduros (como observado nos resultados apresentados na Figura 18 e Figura 21) e levaram a diminuição da viabilidade dos trofozoítos (Figura 20). No presente estudo, observou-se efeito parcial de silenciamento para os genes alvo, dada a natureza do efeito de RNA de interferência, uma vez que a síntese do RNAm não é afetada (REGINA; SOUZA, 2016).

O alvo de silenciamento para a enzima 14 α -demetilase é inédito e os resultados permitiram observar a interferência do silenciamento na diminuição da viabilidade dos trofozoítos e formação de cistos maduros, como também a diminuição dos níveis de expressão de RNAm, permitindo validar o alvo como promissor na aplicação para terapia gênica

antiamebiana, que poderão ser promissoras em associação com fármacos para potencializar o efeito amebicida, inibir a formação de cistos maduros e diminuir a viabilidade dos trofozoítos ou mesmo tornar ambas as formas mais suscetíveis a ação dos fármacos.

Faber e colaboradores (2017), utilizaram lipossomas como nanocarreador de siRNAs nas concentrações de 0,5 μ M a 1,5 μ M para o silenciamento da glicogênio fosforilase e observaram inibição de até 66% do encistamento. No processo de indução do encistamento, ocorre a diminuição do metabolismo do protozoário, desta forma se utilizadas maiores concentrações de siRNA do que 0,25 μ M que foi a concentração avaliada neste trabalho, bem como aumento do tempo de incubação, o efeito da diminuição na formação dos cistos poderá ser observado referente as formulações de nanoemulsão lipídica contendo siRNAs para os alvos utilizados no presente estudo.

Os resultados de estudo fenotípico com coloração por branco de calcoflúor, demonstraram a presença de celulose nos cistos, em maior abundância nos cistos maduros e permitiram demonstrar a inibição da formação de cistos maduros nos tratamentos contendo os siRNAs para silenciamento da glicogênio fosforilase e 14 α -demetilase (GARAJOVÁ *et al.*, 2019b; MOON *et al.*, 2014). No controle negativo somente com meio de indução de encistamento (NEM) e com a nanoemulsão sem siRNA (NE_Mock), maior número de cistos maduros e pré-cistos foram observados e a presença de agregados de cistos de *A. castellanii* (Figura 22), característica comum deste protozoário quando em condições desfavoráveis, considerado um pré-requisito para o encistamento. Este comportamento acontece em outros protozoários como a *Entamoeba histolytica*, e é mediado pela ligação de lectinas de superfície celular terminadas em galactose (Gal), chamadas de aglutininas, estas se ligam a receptores em células vizinhas (SCHAAP; SCHILDE, 2018).

A exposição de células SIRC às formulações de NE não alteraram a viabilidade das células. Assim, os tratamentos utilizados mostraram-se não citotóxico quando incubados por 24 h com células da córnea de coelho, tempo de tratamento maior do que o utilizado nos testes de silenciamento gênico em *A. castellanii*. A avaliação da toxicidade celular se faz necessária em estudos de transfecção, para determinar a faixa de concentrações que podem ser utilizadas sem agressão celular, estando descrito que faixas com até 70% de viabilidade celular são aceitáveis para vetores de transferência gênica (HUNG *et al.*, 2005).

Os resultados demonstram a capacidade da nanoemulsão lipídica de entregar o siRNA no interior dos trofozoítos, além de promover o silenciamento gênico. Sabe-se que nanocarreadores apresentam-se como uma plataforma de entrega de siRNA promissoras e

seguros, pois em meios biológicos, como a superfície da córnea, as moléculas de RNA são instáveis pela presença de numerosas ribonucleases, o que acarreta na baixa absorção celular do siRNA, ineficiente liberação no citoplasma, sem direcionamento para células específicas (BURNETT; ROSSI, 2012; ZORZI *et al.*, 2017).

As formulações de nanoemulsão lipídica carreando siRNAs, apresentaram atividades antitrofozoíto, e não induziram toxicidade em células de córnea de coelho, sendo considerados sistemas promissores para futuras aplicações tópico ocular.

7 CONCLUSÃO

Ambos os sistemas nanoparticulados carreadores de siRNAs testados (NP e NE), mostraram-se capazes de entregar os ácidos nucleicos em trofozoítos de *A. castellanii*.

As formulações de nanopartículas híbridas estudadas apresentaram perda da estabilidade ao longo de 7 dias. As características físico-químicas da nanoemulsão lipídica mostraram-se estáveis durante 21 dias. Ambos nanocarreadores apresentaram tamanho de partícula considerados aceitáveis para aplicações oculares.

Nos tempos avaliados, a nanopartícula híbrida carreando siRNAs nas concentrações menores, não apresentou atividade frente aos trofozoítos e não impediu a formação dos cistos após 96 h. As NP apresentaram diminuição na formação dos cistos na concentração de 1 μ M, porém houve formação de precipitados que impossibilitaram a continuação dos testes de viabilidade com as formulações de NP, além de inviabilizarem seu uso para aplicações oculares uma vez que podem causar irritação ocular.

Os resultados de viabilidade de trofozoítos com a NE, demonstraram que as sequências de siRNA 14 α -demetilase e glicogênio fosforilase promoveram a diminuição da viabilidade no tempo de incubação avaliado, com destaque para as sequências da 14 α -demetilase desenhadas no estudo, que obtiveram maior atividade, demonstrando a atuação desta enzima na formação das membranas do protozoário.

Os resultados de estudo fenotípico com coloração por branco de calcoflúor, demonstraram a inibição da formação de cistos maduros nos tratamentos contendo os siRNAs para silenciamento da glicogênio fosforilase e 14 α -demetilase.

As formulações de NE contendo siRNA não induziram diminuição significativa na formação dos cistos nas concentrações testadas, necessitando de ampliação da faixa de concentração e/ou reaplicações dos tratamentos. Já para siRNAs livres para silenciamento da glicogênio fosforilase, observou-se diminuição da formação de cistos maduros, resultado associado a alta capacidade fagocítica do protozoário, permitindo a entrada de siRNA no interior do trofozoíto.

A partir das análises de expressão gênica foi possível observar o silenciamento dos genes estudados, o que corrobora com os resultados encontrados nas atividades de viabilidade anti-acantamebianas. Estes resultados demonstram que os alvos estão envolvidos na formação das membranas de *A. castellanii*, porém, se faz necessária à ampliação dos tempos e condições de cultivo, ou ainda a reaplicação dos sistemas em diferentes tempos.

As sequencias alvo 14 α -demetilase descritas no presente estudo são inéditas, e a partir dos resultados foi possível observar o efeito do silenciamento gênico na diminuição da viabilidade dos trofozoítos e formação de cistos, validando o alvo como promissor na aplicação para terapia gênica antiamebiana,

As formulações de NE carreadoras de siRNAs não demonstraram citotoxicidade quando incubadas com as células de córnea de coelho, resultado promissor para potencial uso do nanocarreador na terapia gênica da via tópico ocular.

Desta forma, os resultados confirmam a hipótese de que a enzima 14 α -demetilase está amplamente presente em células de *Acanthamoeba* spp. e seu silenciamento se faz uma alternativa para novas abordagens terapêuticas no tratamento da ceratite amebiana. Confirmam ainda que os sistemas preparados foram capazes de entregar de forma eficaz os siRNAs em diferentes tempos estudados, tornando-se uma ferramenta em potencial para terapia gênica ocular em associação com fármacos no tratamento da ceratite amebiana.

8 PERSPECTIVAS

- Realizar o perfil de incorporação dos nanocarreadores de siRNAs;
- Avaliar o silenciamento gênico, em diferentes tempos de incubação e concentração de siRNAs;
- Analisar a ultraestrutura das formas amebianas após tratamentos com as formulações da nanoemulsão carreadoras de siRNAs;
- Realizar estudos *in vivo* da toxicidade ocular das formulações da nanoemulsão;
- Realizar estudos das formulações da nanoemulsão carreadora de siRNAs em modelo murino de ceratite por *Acanthamoeba* spp.

REFERÊNCIAS

- ABDELLAH, Zahra *et al.* Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature** **2004 431:7011**, [S. l.], v. 431, n. 7011, p. 931–945, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature03001>. Acesso em: 7 set. 2021.
- AGHAMIRI, Shahin *et al.* Nonviral siRNA delivery systems for pancreatic cancer therapy. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/BIT.27869>. Acesso em: 7 set. 2021.
- AGUILAR-DÍAZ, Hugo *et al.* Cyst and encystment in protozoan parasites: Optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? **Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 27, n. 10, p. 450–458, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.06.003>
- ALKHARASHI, Majed *et al.* Medical interventions for acanthamoeba keratitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [S. l.], v. 2015, n. 2, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010792.pub2>
- ANWAR, Ayaz; KHAN, Naveed Ahmed; SIDDIQUI, Ruqaiyyah. Combating Acanthamoeba spp . cysts : what are the options ? **Parasiters & Vectors**, [S. l.], p. 4–6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2572-z>
- AQEEL, Yousuf; SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHAN, Naveed Ahmed. Silencing of xylose isomerase and cellulose synthase by siRNA inhibits encystation in Acanthamoeba castellanii. **Parasitology Research** **2012 112:3**, [S. l.], v. 112, n. 3, p. 1221–1227, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00436-012-3254-6>. Acesso em: 26 ago. 2021.
- AYKUR, Mehmet; DAGCI, Hande. Evaluation of molecular characterization and phylogeny for quantification of Acanthamoeba and Naegleria fowleri in various water sources, Turkey. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 8, p. e0256659, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0256659>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- B, Bowers; ED, Korn. Cytochemical identification of phosphatase activity in the contractile vacuole of Acanthamoeba castellanii. **The Journal of cell biology**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 784–791, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/JCB.59.3.784>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- BÍNOVÁ, Eva; BÍNA, David; NOHÝNKOVÁ, Eva. DNA content in Acanthamoeba during two stress defense reactions: Encystation, pseudocyst formation and cell cycle. **European Journal of Protistology**, [S. l.], v. 77, p. 125745, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EJOP.2020.125745>
- BOCACCI, Francisco *et al.* Ceratite por *Acanthamoeba*: Relato de casos no Rio Grande do Sul. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, [S. l.], v. 60, n. 3, p. 268–276, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0004-2749.19970059>. Acesso em: 6 set. 2021.
- BOUHERAOUA, N. *et al.* **Kératites ambiennes**. [S. l.]: Elsevier Masson SAS, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2014.05.004>
- BOWERS, B.; KORN, E. D. The fine structure of Acanthamoeba castellanii. I. The trophozoite. **The Journal of cell biology**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 95–111, 1968. Disponível em:

<https://doi.org/10.1083/jcb.39.1.95>

BOWERS, B.; KORN, E. D. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. **The Journal of cell biology**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 786–805, 1969. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.41.3.786>

BRONDFIELD, Max N. *et al.* Disseminated *Acanthamoeba* infection in a heart transplant recipient treated successfully with a miltefosine-containing regimen: Case report and review of the literature. **Transplant Infectious Disease**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. e12661, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tid.12661>. Acesso em: 12 ago. 2020.

BRUXEL, Fernanda *et al.* Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, [S. l.], v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900023>

BUCHELE, Maria Luiza Carneiro *et al.* Contact lens-related polymicrobial keratitis: *Acanthamoeba* spp. genotype T4 and *Candida albicans*. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 117, n. 11, p. 3431–3436, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6037-x>. Acesso em: 23 fev. 2021.

BÜCHELE, Maria Luiza Carneiro *et al.* Super aggregated amphotericin B with a thermoreversible in situ gelling ophthalmic system for amoebic keratitis treatment. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 224, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106144>. Acesso em: 2 nov. 2021.

BURNETT, John C.; ROSSI, John J. RNA-based Therapeutics- Current Progress and Future Prospects. **Chemistry & biology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 60, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2011.12.008>. Acesso em: 8 set. 2021.

CARNT, Nicole; STAPLETON, Fiona. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: a review. **Ophthalmic and Physiological Optics**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 77–92, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/opo.12271>. Acesso em: 4 ago. 2020.

CARRIJO-CARVALHO, Linda Christian *et al.* **Therapeutic agents and biocides for ocular infections by free-living amoebae of *Acanthamoeba* genus**. [S. l.]: Elsevier USA, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2016.10.009>

CASTRILLÓN, Juan C.; OROZCO, Lina P. ***Acanthamoeba* spp. as opportunistic pathogens parasites**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000200005>

CHAN, Li-Li *et al.* Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 117, n. 1, p. 23, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2010.09.004>. Acesso em: 6 set. 2021.

CHAURASIA, Shyam S. *et al.* Nanomedicine Approaches for Corneal Diseases. **Journal of Functional Biomaterials**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 277, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/JFB6020277>. Acesso em: 31 ago. 2021.

CIRELLI, Cecília *et al.* Extracellular protease profile of *Acanthamoeba* after prolonged axenic culture and after interaction with MDCK cells. **Parasitology Research 2019 119:2**, [S.

l.], v. 119, n. 2, p. 659–666, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00436-019-06562-W>. Acesso em: 30 ago. 2021.

COPE, Jennifer R. *et al.* Acanthamoeba Keratitis among Rigid Gas Permeable Contact Lens Wearers, United States, 2005–2011. **Ophthalmology**, [*S. l.*], v. 123, n. 7, p. 1435, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.OPHTHA.2016.03.039>. Acesso em: 29 ago. 2021.

CORSARO, Daniele *et al.* Update on Acanthamoeba jacobsoni genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. **Parasitology Research** **2017** **116**:4, [*S. l.*], v. 116, n. 4, p. 1273–1284, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00436-017-5406-1>. Acesso em: 6 set. 2021.

DAN SON, Kyoung; KIM, Young Jin. Anticancer activity of drug-loaded calcium phosphate nanocomposites against human osteosarcoma. **Biomaterials Research**, [*S. l.*], v. 21, n. 1, p. 13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40824-017-0099-1>. Acesso em: 2 abr. 2020.

DHURANDHAR, Deven *et al.* Gene therapy in retinal diseases: A review. **Indian Journal of Ophthalmology**, [*S. l.*], v. 69, n. 9, p. 2257, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.4103/IJO.IJO_3117_20. Acesso em: 7 set. 2021.

DOS SANTOS, Denise Leal *et al.* Acanthamoeba keratitis in Porto Alegre (southern Brazil): 28 cases and risk factors. **Parasitology Research**, [*S. l.*], v. 117, n. 3, p. 747–750, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5745-y>. Acesso em: 4 ago. 2020.

DUXFIELD, Linda *et al.* Ocular delivery systems for topical application of anti-infective agents. <http://dx.doi.org/10.3109/03639045.2015.1070171>, [*S. l.*], v. 42, n. 1, p. 1–11, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1070171>. Acesso em: 6 set. 2021.

EK, Moon *et al.* Protein kinase C signaling molecules regulate encystation of Acanthamoeba. **Experimental parasitology**, [*S. l.*], v. 132, n. 4, p. 524–529, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2012.07.008>. Acesso em: 26 ago. 2021.

ELSHEIKHA, Hany M.; SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHAN, Naveed Ahmed. Drug discovery against acanthamoeba infections: Present knowledge and unmet needs. **Pathogens**, [*S. l.*], v. 9, n. 5, 2020 a. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens9050405>. Acesso em: 4 ago. 2020.

ELSHEIKHA, Hany M.; SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHAN, Naveed Ahmed. Drug Discovery against Acanthamoeba Infections: Present Knowledge and Unmet Needs. **Pathogens**, [*S. l.*], v. 9, n. 5, 2020 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9050405>. Acesso em: 26 ago. 2021.

FABER, Kathrin *et al.* siRNA-loaded liposomes: Inhibition of encystment of Acanthamoeba and toxicity on the eye surface. **Chemical Biology & Drug Design**, [*S. l.*], v. 90, n. 3, p. 406–416, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/CBDD.12958>. Acesso em: 3 set. 2021.

FANSELOW, Nicholas *et al.* Acanthamoeba Keratitis, Pathology, Diagnosis and Treatment. **Pathogens**, [*S. l.*], v. 10, n. 3, p. 1–11, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10030323>. Acesso em: 29 ago. 2021.

FANSELOW, Nicholas *et al.* Acanthamoeba Keratitis, Pathology, Diagnosis and Treatment. **Pathogens** 2021, Vol. 10, Page 323, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 323, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10030323>. Acesso em: 3 ago. 2021.

FIRE, Andrew *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** 1998 391:6669, [S. l.], v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35888>. Acesso em: 29 ago. 2021.

GARAJOVÁ, Mária *et al.* Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for *Acanthamoeba* cyst wall architecture. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 4466, 2019 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41084-6>

GARAJOVÁ, Mária *et al.* Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for *Acanthamoeba* cyst wall architecture. **Scientific Reports** 2019 9:1, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–21, 2019 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41084-6>. Acesso em: 31 ago. 2021.

GONÇALVES, Diego de Souza *et al.* Extracellular vesicles and vesicle-free secretome of the protozoa *Acanthamoeba castellanii* under homeostasis and nutritional stress and their damaging potential to host cells. **Virulence**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 818, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1451184>. Acesso em: 31 ago. 2021.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Felipe M. *et al.* Lipid-Based Nanocarriers for Ophthalmic Administration: Towards Experimental Design Implementation. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, n. 4, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13040447>. Acesso em: 30 ago. 2021.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Felipe M. *et al.* Lipid-Based Nanocarriers for Ophthalmic Administration: Towards Experimental Design Implementation. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, n. 4, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13040447>. Acesso em: 27 ago. 2021.

GRAHAM, F. L.; VAN DER EB, A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 456–467, 1973. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(73\)90341-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(73)90341-3)

GUEUDRY, Julie *et al.* Evaluation of voriconazole anti-*Acanthamoeba* polyphaga in vitro activity, rat cornea penetration and efficacy against experimental rat *Acanthamoeba* keratitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** **Antimicrobi**, [S. l.], v. 73, p. 1895–1898, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dky094>. Acesso em: 4 ago. 2020.

GUZMÁN-TÉLLEZ, Paula *et al.* Lectins as virulence factors in *Entamoeba histolytica* and free-living amoebae. **Microbiology**, [S. l.], v. 15, n. 10, p. 919–936, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/FMB-2019-0275>. Acesso em: 27 ago. 2021.

HATTAB, Dima; GAZZALI, Amirah Mohd; BAKHTIAR, Athirah. Clinical Advances of siRNA-Based Nanotherapeutics for Cancer Treatment. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, n. 7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13071009>. Acesso em: 29 ago. 2021.

HEASELGRAVE, Wayne *et al.* Inactivation of *Acanthamoeba* spp. and other ocular

pathogens by application of cold atmospheric gas plasma. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 82, n. 10, p. 3143–3148, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.03863-15>. Acesso em: 29 ago. 2021.

HUNG, Chi Feng *et al.* Physicochemical characterization and gene transfection efficiency of lipid emulsions with various co-emulsifiers. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 289, n. 1–2, p. 197–208, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2004.11.008>

IOVIENO, Alfonso *et al.* Cysticidal Activity of Antifungals against Different Genotypes of *Acanthamoeba*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 58, n. 9, p. 5626, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.02635-14>. Acesso em: 26 ago. 2021.

JHA, Bijay Kumar *et al.* Tigecycline inhibits proliferation of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology Research** 2015 114:3, [S. l.], v. 114, n. 3, p. 1189–1195, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00436-014-4302-1>. Acesso em: 25 ago. 2021.

KALRA, Sonali K. *et al.* *Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 208, p. 107788, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2019.107788>

KANWAR, Jagat R. *et al.* Aptamer-based therapeutics of the past, present and future: from the perspective of eye-related diseases. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 19, n. 9, p. 1309–1321, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2014.02.009>

KHAN, Naveed Ahmed. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 564–595, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2006.00023.X>. Acesso em: 27 ago. 2021.

KIM, Byungji; PARK, Ji-Ho; SAILOR, Michael J. Rekindling RNAi Therapy: Materials Design Requirements for In Vivo siRNA Delivery. **Advanced Materials**, [S. l.], v. 31, n. 49, p. 1903637, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adma.201903637>. Acesso em: 26 ago. 2020.

KLIESCIKOVA, Jarmila; KULDA, Jaroslav; NOHYNKOVA, Eva. Stress-Induced Pseudocyst Formation - A Newly Identified Mechanism of Protection against Organic Solvents in *Acanthamoebae* of the T4 Genotype. **Protist**, [S. l.], v. 162, n. 1, p. 58–69, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PROTIS.2010.03.006>

KOFMAN, Aaron; GUARNER, Jeannette. Free Living Amoebic Infections: Review. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.00228-21>. Acesso em: 29 ago. 2021.

KOFMAN, Aaron; GUARNER, Jeannette. Free Living Amoebic Infections: Review. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.00228-21>. Acesso em: 2 ago. 2021.

KRÓL-TURMIŃSKA, Katarzyna; OLENDER, Alina. Human infections caused by free-living amoebae. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 254–260, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5604/12321966.1233568>. Acesso em: 2

ago. 2021.

LACERDA, Ana Gomes de; LIRA, Madalena. Acanthamoeba keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. **Ophthalmic and Physiological Optics**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 116–135, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/OPO.12752>. Acesso em: 3 ago. 2021.

LACERDA, Ana Gomes de; LIRA, Madalena. Acanthamoeba keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. **Ophthalmic and Physiological Optics**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 116–135, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/OPO.12752>. Acesso em: 29 ago. 2021.

LANDER, Eric S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature** **2001** **409:6822**, [S. l.], v. 409, n. 6822, p. 860–921, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35057062>. Acesso em: 7 set. 2021.

LASS, Anna *et al.* Detection of Acanthamoeba spp. in water samples collected from natural water reservoirs, sewages, and pharmaceutical factory drains using LAMP and PCR in China. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 584–585, p. 489–494, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.046>

LEE, Jung Yub *et al.* Cysteine protease inhibitor (AcStefin) is required for complete cyst formation of Acanthamoeba. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 567–574, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00308-12>

LEE, Yu-Ran *et al.* Essential Role for an M17 Leucine Aminopeptidase in Encystation of Acanthamoeba castellanii. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. e0129884, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129884>. Acesso em: 2 abr. 2020.

LEVINGSTONE, Tanya J.; HERBAJ, Simona; DUNNE, Nicholas J. Calcium Phosphate Nanoparticles for Therapeutic Applications in Bone Regeneration. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 9, n. 11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/NANO9111570>. Acesso em: 27 ago. 2021.

LIU, Yu-Chi *et al.* Nanotechnology for the Treatment of Allergic Conjunctival Diseases. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 1–21, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PH13110351>. Acesso em: 30 ago. 2021.

LLOYD, David. Encystment in Acanthamoeba castellanii: A review. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 145, n. S, p. S20–S27, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.026>

LORENZO-MORALES, Jacob *et al.* RNA interference (RNAi) for the silencing of extracellular serine proteases genes in Acanthamoeba: Molecular analysis and effect on pathogenicity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S. l.], v. 144, n. 1, p. 10–15, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.07.001>

LORENZO-MORALES, Jacob *et al.* Glycogen phosphorylase in Acanthamoeba spp.: Determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 509–517, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00316-07>

LORENZO-MORALES, Jacob *et al.* Therapeutic potential of a combination of two gene-specific small interfering RNAs against clinical strains of *Acanthamoeba*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 54, n. 12, p. 5151–5155, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00329-10>

LORENZO-MORALES, Jacob *et al.* **Acanthamoeba keratitis: An emerging disease gathering importance worldwide?**. [S. l.]: Elsevier Current Trends, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.01.006>

LORENZO-MORALES, Jacob; KHAN, Naveed A.; WALOCHNIK, Julia. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, [S. l.], v. 22, p. 10, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/PARASITE/2015010>

MARCIANO-CABRAL, Francine; CABRAL, Guy. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 273–307, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.273-307.2003>

MARTÍN-NAVARRO, Carmen María *et al.* Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase and application of statins as a novel effective therapeutic approach against *Acanthamoeba* infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 375–381, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.01426-12>

MARTINI, Érico. **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química**. 2005. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MAYCOCK, Nicholas J. R.; JAYASWAL, Rakesh. Update on *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. **Cornea**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 713–720, 2016 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000804>

MAYCOCK, Nicholas J. R.; JAYASWAL, Rakesh. Update on *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. **Cornea**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 713–720, 2016 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000804>. Acesso em: 29 ago. 2021.

MCBRIDE, James *et al.* Development of Colorimetric Microtiter Plate Assay for Assessment of Antimicrobials against *Acanthamoeba*. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 629, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.629-634.2005>. Acesso em: 25 ago. 2021.

MELLO, Leônidas João de *et al.* Knockdown of antiapoptotic genes in breast cancer cells by siRNA loaded into hybrid nanoparticles. **Nanotechnology**, [S. l.], v. 28, n. 17, p. 175101, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1361-6528/AA6283>. Acesso em: 30 ago. 2021.

MELLO JUNIOR, Leônidas João de. **SILENCIAMENTO DOS GENES ANTIAPOPTÓTICOS BCL-2 E BCL-xL POR RNA DE INTERFERÊNCIA CARREADO POR NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS EM CÂNCER DE MAMA** *Educational Psychology Journal*. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://doi.org/DOI:>

MOON, Eun-Kyung *et al.* Characterization of a Serine Proteinase Mediating Encystation of *Acanthamoeba*. **Eukaryotic Cell**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. 1513, 2008. Disponível em:

<https://doi.org/10.1128/EC.00068-08>. Acesso em: 26 ago. 2021.

MOON, Eun-Kyung *et al.* Identification and Characterization of Protein Arginine Methyltransferase 1 in *Acanthamoeba castellanii*. **The Korean Journal of Parasitology**, [S. l.], v. 55, n. 2, p. 109, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3347/KJP.2017.55.2.109>. Acesso em: 26 ago. 2021.

MOON, Eun-Kyung; KONG, Hyun-Hee. Short-Cut Pathway to Synthesize Cellulose of Encysting *Acanthamoeba*. **The Korean Journal of Parasitology**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 361, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3347/KJP.2012.50.4.361>. Acesso em: 31 ago. 2021.

MOON, Eun Kyung *et al.* Cysteine protease involving in autophagosomal degradation of mitochondria during encystation of *Acanthamoeba*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S. l.], v. 185, n. 2, p. 121–126, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.07.008>

MOON, Eun Kyung *et al.* Down-regulation of cellulose synthase inhibits the formation of endocysts in *Acanthamoeba*. **Korean Journal of Parasitology**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 131–135, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.2.131>

MOON, Eun Kyung *et al.* Potential value of cellulose synthesis inhibitors combined with PHMB in the treatment of *acanthamoeba keratitis*. **Cornea**, [S. l.], v. 34, n. 12, p. 1593–1598, 2015 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000642>. Acesso em: 26 ago. 2021.

MOON, Eun Kyung *et al.* Autophagy inhibitors as a potential antiamebic treatment for *Acanthamoeba keratitis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 59, n. 7, p. 4020–4025, 2015 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.05165-14>

MOSHIRFAR, Majid; THOMSON, Andrew C.; RONQUILLO, Yasmyne. Corneal Endothelial Transplantation. **StatPearls**, [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562265/>. Acesso em: 6 set. 2021.

NEFF, R. J. *et al.* Chapter 4 Induction of Synchronous Encystment (Differentiation) in *Acanthamoeba* sp. **Methods in Cell Biology**, [S. l.], v. 1, n. C, p. 55–83, 1964. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)62086-5](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)62086-5)

NG, Eugene W. M.; ADAMIS, Anthony P. Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration. **Canadian Journal of Ophthalmology**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 352–368, 2005. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0008-4182\(05\)80078-X](https://doi.org/10.1016/S0008-4182(05)80078-X)

OBEID, Wilson Nahmatallah *et al.* Ceratite bilateral por *Acanthamoeba*: relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, [S. l.], v. 66, n. 6, p. 876–880, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-27492003000700025>. Acesso em: 6 set. 2021.

OLIVEIRA, Bárbara de Alencar *et al.* Vetores virais para uso em terapia gênica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 57–66, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S2176-62232018000200008>. Acesso em: 7 set. 2021.

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

Three Species. **The Journal of Protozoology**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 709–724, 1967. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb02066.x>. Acesso em: 31 mar. 2020.

PALUSINSKA-SZYSZ, Marta *et al.* Identification of Unusual Phospholipid Fatty Acyl Compositions of *Acanthamoeba castellanii*. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 101243, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0101243>. Acesso em: 31 ago. 2021.

PANATIERI, Lua Ferreira *et al.* Nanoemulsions Containing a Coumarin-Rich Extract from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) for the Treatment of Ocular *Acanthamoeba Keratitis*. **AAPS PharmSciTech** 2016 18:3, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 721–728, 2016 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/S12249-016-0550-Y>. Acesso em: 7 set. 2021.

PANATIERI, Lua Ferreira *et al.* Nanoemulsions Containing a Coumarin-Rich Extract from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) for the Treatment of Ocular *Acanthamoeba Keratitis*. **AAPS PharmSciTech** 2016 18:3, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 721–728, 2016 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/S12249-016-0550-Y>. Acesso em: 8 set. 2021.

PINTO, Larissa Fagundes *et al.* The role of *Acanthamoeba* spp. in biofilm communities: a systematic review. **Parasitology Research** 2021 120:8, [S. l.], v. 120, n. 8, p. 2717–2729, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00436-021-07240-6>. Acesso em: 27 ago. 2021.

PIRHADI, Somayeh; AMANI, Amir. Molecular dynamics simulation of siRNA loading into a nanoemulsion as a potential carrier. **Journal of Molecular Modeling** 2020 26:8, [S. l.], v. 26, n. 8, p. 1–6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00894-020-04471-9>. Acesso em: 7 set. 2021.

PITTELLA, Frederico *et al.* Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. **Biomaterials**, [S. l.], v. 32, n. 11, p. 3106–3114, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.057>

PITTELLA, Frederico *et al.* Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 161, n. 3, p. 868–874, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.05.005>

PUTAPORNTIP, Chaturong *et al.* Analysis of *Acanthamoeba* genotypes from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 *Acanthamoeba bangkokensis* sp. nov. **Scientific Reports** 2021 11:1, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96690-0>. Acesso em: 29 ago. 2021.

QVARNSTROM, Yvonne *et al.* Molecular Confirmation of *Sappinia pedata* as a Causative Agent of Amoebic Encephalitis. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 199, n. 8, p. 1139–1142, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/597473>. Acesso em: 27 ago. 2021.

RAYAMAJHEE, Binod *et al.* A Systematic Review of Intracellular Microorganisms within *Acanthamoeba* to Understand Potential Impact for Infection. **Pathogens** 2021, Vol. 10, Page 225, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 225, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10020225>. Acesso em: 30 ago. 2021.

REGINA, Gabriela; SOUZA, Rosa. DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS PARA TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA : SILENCIAMENTO DE GENES-CHAVE NA SOBREVIVÊNCIA Florianópolis Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca. *[S. l.]*, 2016.

REYNOLDS, Angela *et al.* Rational siRNA design for RNA interference. **Nature Biotechnology**, *[S. l.]*, v. 22, n. 3, p. 326–330, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt936>

RICE, Christopher A. *et al.* Discovery of repurposing drug candidates for the treatment of diseases caused by pathogenic free-living amoebae. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, *[S. l.]*, v. 14, n. 9, p. e0008353, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0008353>. Acesso em: 29 ago. 2021.

RODRIGUES, Barbara Czerniak. DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO VORICONAZOL PARA TRATAMENTO TÓPICO OCULAR DA CERATITE AMEBIANA. *[S. l.: s. n.]*. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

SAEED, Ayman *et al.* Risk factors, microbiological findings, and clinical outcomes in cases of microbial keratitis admitted to a tertiary referral center in Ireland. **Cornea**, *[S. l.]*, v. 28, n. 3, p. 285–292, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/ICO.0B013E3181877A52>. Acesso em: 6 set. 2021.

SAHU, Bhubanananda; CHUG, Isha; KHANNA, Hemant. The Ocular Gene Delivery Landscape. **Biomolecules**, *[S. l.]*, v. 11, n. 8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/BIOM11081135>. Acesso em: 7 set. 2021.

SCHAAP, Pauline; SCHILDE, Christina. Encystation: the most prevalent and underinvestigated differentiation pathway of eukaryotes. **Microbiology**, *[S. l.]*, v. 164, n. 5, p. 727–739, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/MIC.0.000653>. Acesso em: 27 ago. 2021.

SCHNEIDER-FUTSCHIK, Elena K.; REYES-ORTEGA, Felisa. Advantages and Disadvantages of Using Magnetic Nanoparticles for the Treatment of Complicated Ocular Disorders. **Pharmaceutics**, *[S. l.]*, v. 13, n. 8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13081157>. Acesso em: 6 set. 2021.

SEAL, D. V. Acanthamoeba keratitis update—incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. **Eye** **2003** **17:8**, *[S. l.]*, v. 17, n. 8, p. 893–905, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6700563>. Acesso em: 6 set. 2021.

SETTEN, Ryan L.; ROSSI, John J.; HAN, Si ping. **The current state and future directions of RNAi-based therapeutics**. *[S. l.]*: Nature Publishing Group, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>. Acesso em: 4 ago. 2020.

SIDDIQUI, Ruqaiyyah *et al.* Biology and pathogenesis of Naegleria fowleri. **Acta Tropica**, *[S. l.]*, v. 164, p. 375–394, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.009>

- SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHAN, Naveed Ahmed. **Biology and pathogenesis of Acanthamoeba**. [S. l.]: BioMed Central, 2012 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-6>
- SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHAN, Naveed Ahmed. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. **Parasites & Vectors**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 6, 2012 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-6>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHAN, Naveed Ahmed. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. **Parasites and Vectors**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 6, 2012 c. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-6>. Acesso em: 12 ago. 2020.
- SINGH, Mahendra *et al.* Therapeutic nanoemulsions in ophthalmic drug administration: Concept in formulations and characterization techniques for ocular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 328, p. 895–916, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.10.025>
- SMITH, Frank R.; KORN, Edward D. 7-Dehydrostigmasterol and ergosterol: the major sterols of an amoeba. **Journal of lipid Research**, [S. l.], v. 9, n. June, p. 412–422, 1968.
- SOMANI, Shaan N.; RONQUILLO, Yasmyne; MOSHIRFAR, Majid. Acanthamoeba Keratitis. **StatPearls**, [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549863/>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- SRIRAM, Rama *et al.* Survival of Acanthamoeba cysts after desiccation for more than 20 years. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 46, n. 12, p. 4045–4048, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.01903-08>. Acesso em: 11 ago. 2020.
- STAPLETON, Fiona. The Epidemiology of Infectious Keratitis. **The Ocular Surface**, [S. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JTOS.2021.08.007>. Acesso em: 27 ago. 2021.
- STOTHARD, Diane R. *et al.* The evolutionary history of the genus Acanthamoeba and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 45–54, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb05068.x>
- SUBHAN, Md Abdus; TORCHILIN, V. P. siRNA based drug design, quality, delivery and clinical translation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [S. l.], v. 29, p. 102239, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2020.102239>
- SUPE, Shibani; UPADHYA, Archana; SINGH, Kavita. Role of small interfering RNA (siRNA) in targeting ocular neovascularization: A review. **Experimental Eye Research**, [S. l.], v. 202, p. 108329, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EXER.2020.108329>
- TATIPARTI, Katyayani *et al.* siRNA Delivery Strategies: A Comprehensive Review of Recent Developments. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 7, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/NANO7040077>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- THOMSON, Scott *et al.* Characterisation of sterol biosynthesis and validation of 14 α -demethylase as a drug target in Acanthamoeba. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–9,

2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07495-z>

TRABELSI, H. *et al.* Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. **Pathologie Biologie**, [S. l.], v. 60, n. 6, p. 399–405, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.002>

VISVESVARA, Govinda S. Infections with free-living amebae. *In: Handbook of Clinical Neurology*. Atlanta: Elsevier B.V., 2013. v. 114p. 153–168. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00010-8>. Acesso em: 31 mar. 2020.

VISVESVARA, Govinda S.; MOURA, Hercules; SCHUSTER, Frederick L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 1–26, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x>

WANG, Ningning *et al.* Ac-HSP20 Is Associated With the Infectivity and Encystation of *Acanthamoeba castellanii*. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, p. 595080, 2020 a. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.595080>. Acesso em: 26 ago. 2021.

WANG, Yi *et al.* Gene therapy strategies for rare monogenic disorders with nuclear or mitochondrial gene mutations. **Biomaterials**, [S. l.], v. 277, p. 121108, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2021.121108>. Acesso em: 7 set. 2021.

WANG, Zhixin *et al.* Identification and biochemical characterisation of *Acanthamoeba castellanii* cysteine protease 3. **Parasites & Vectors**, [S. l.], v. 13, n. 1, 2020 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04474-8>. Acesso em: 26 ago. 2021.

WHITEHEAD, Kathryn A.; LANGER, Robert; ANDERSON, Daniel G. **Knocking down barriers: Advances in siRNA delivery**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd3182>

WOPEREIS, Débora Borgert *et al.* Free-living amoebae and their relationship to air quality in hospital environments: Characterization of *Acanthamoeba* spp. obtained from air-conditioning systems. **Parasitology**, [S. l.], v. 147, n. 7, p. 782–790, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182020000487>. Acesso em: 29 jun. 2020.

XU, Xiaochun *et al.* Calcium phosphate nanoparticles-based systems for siRNA delivery. **Regenerative Biomaterials**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 187, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/RB/RBW010>. Acesso em: 29 ago. 2021.

YIN, Yue *et al.* Effective systemic siRNA delivery using dual-layer protected long-circulating nanohydrogel containing an inorganic core. **Biomaterials Science**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. 3297–3306, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C9BM00369J>. Acesso em: 30 ago. 2021.

ZORZI, Giovanni K. *et al.* Biomateriais para formulações de base nanotecnológica visando terapia genética ocular. **Química Nova**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 74–84, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160151>

ZORZI, Giovanni K. *et al.* Box Behnken design of siRNA-loaded liposomes for the treatment of a murine model of ocular keratitis caused by *Acanthamoeba*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 173, n. June 2018, p. 725–732, 2019 a. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.044>

ZORZI, Giovanni K. *et al.* Box Behnken design of siRNA-loaded liposomes for the treatment of a murine model of ocular keratitis caused by *Acanthamoeba*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [*S. l.*], v. 173, p. 725–732, 2019 b. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.10.044>