

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

Cynara Oliveira Possamai

Classificação morfológica e genotípica e correlação
entre propriedades fisiológicas e citopatogênicas de
isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba*

Vitória
2018

Cynara Oliveira Possamai

Classificação morfológica e genotípica e correlação
entre propriedades fisiológicas e citopatogênicas de
isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Doenças Infecciosas. Área de concentração: Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Aloísio Falqueto
Coorientadora: Profa. Dra. Cinthia Furst
Leroy Gomes Bueloni

Vitória
2018

Cynara Oliveira Possamai

Classificação morfológica e genotípica e correlação entre propriedades fisiológicas e citopatogênicas de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Doenças Infecciosas. Área de concentração: Parasitologia.

Aprovada em:

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Aloísio Falqueto

Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Dra. Blima Fux

Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Interno

Dra. Sarah Santos Gonçalves

Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Interno

Dr. Gustavo Rocha Leite

Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Externo

Dra. Raquel Spinassé Dettogni

Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Externo



“Crux sacra sit mihi lux”

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.
Em especial:

A Deus, a quem dedico todas as vitórias alcançadas no decorrer deste Doutorado.

Ao meu noivo, Fabricio, pelo companheirismo incondicional. Graças a você, eu nunca estive sozinha.

Aos meus pais, Elimario e Rita, e irmãos, Diego, Cris e Wander, pelo carinho e compreensão de sempre. Agradeço especialmente à minha irmã, Cris, por toda ajuda providencial nos momentos de dificuldade.

À minha cunhada, Fabiana, e a minha sogra, Laudicéia. Pelo apoio e toda ajuda desde a preparação para o Doutorado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cinthia Furst, que desde a graduação abriu as portas de seu laboratório para mim, me proporcionando tantas oportunidades e ensinamentos, do estágio à docência. Obrigada por estimular sempre o meu crescimento ético e profissional e pelo incentivo nos momentos de incertezas. E, acima de tudo, pela amizade em tantos bons momentos, a serem guardados com muito carinho.

À Dra. Ana Carolina Covre Loss, ou Carol, por sua inestimável colaboração na área de filogenética.

À Dra. Adriana Oliveira Costa, que contribuiu com seus conhecimentos de forma muito importante na elaboração, execução e finalização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Aloísio Falqueto, pela oportunidade de cursar o Doutorado e pelos valiosos ensinamentos ao longo desses anos.

Ao amigo Diógenes. Além de todo empenho e competência emprestados para a concretização desta pesquisa, sua valiosa e agradável companhia tornaram os dias melhores.

A Juliana Rodrigues, que participou com muita dedicação do início deste trabalho. Obrigada também pela companhia, amizade e por toda ajuda dispensada.

Aos colegas do Laboratório de Protozoologia. Especialmente a Débora e Guilherme, pela colaboração e incentivo em várias etapas deste trabalho.

Aos amigos Dani, Luciana e Steveen, que nunca mediram esforços e se empenharam, da melhor maneira possível, para que eu pudesse concluir este trabalho. Por todo carinho, paciência e disponibilidade, muito obrigada!

A Julyana B. e Maria Augusta, pelas aventuras laboratoriais e internacionais. E pela leveza de uma amizade forte e muito importante, que chegou para o bem.

Também às amigas que não participaram diretamente da concretização deste projeto, mas que se fizeram presentes em muitos momentos de alegria e paz: Aline, Camila, Carol, Flávia, Janine, Jéssica, Natália e Raquel.

Aos membros da comissão examinadora deste trabalho: Dra. Blima Fux, Dr. Gustavo Rocha Leite, Dra. Raquel Spinassé Dettogni e Dra. Sarah Santos Gonçalves. Agradeço a atenção e o valioso auxílio no aperfeiçoamento desta tese. E a suplente: Dra. Kênia Valéria dos Santos.

À toda equipe médica do Setor de Oftalmologia do HUCAM, pela parceria e confiança. Faço um agradecimento especial ao Dr. Abraão Garcia Mendes, pela brilhante contribuição neste e em outros projetos do laboratório. Seu conhecimento é admirável.

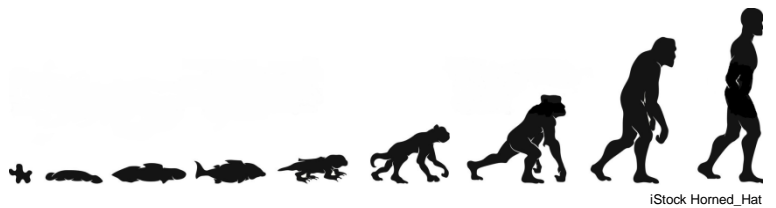
Aos Laboratórios: LABIOM (Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares), LHMI (Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica) e NGACB (Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade), pelo suporte técnico indispensável para a realização deste estudo. E aos seus responsáveis respectivos, Natércia Carvalhal Alves, Danielle Lessa Junger e Juliana de Freitas Justino.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas (PPGDI) e ao seu coordenador, Dr. Moises Palaci, pelas oportunidades oferecidas e pelo auxílio financeiro disponibilizado para participação em cursos e congressos. Agradeço especialmente a Thamires Vettorazzi de Moura, por toda competência e disponibilidade à frente da secretaria do Programa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pelo financiamento deste projeto e pela bolsa de estudos concedida.

“De ameba e macaco todos têm um pouco”

ESTADÃO, 2008



RESUMO

Amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* podem eventualmente sobreviver como parasitas, causando infecções graves no homem e em outros animais. Algumas características biológicas e fisiológicas têm sido relacionadas ao nível de patogenicidade das cepas, o que permite inferir sobre o potencial patogênico do gênero. O objetivo deste estudo foi classificar isolados de *Acanthamoeba* obtidos no Brasil, avaliar suas propriedades de patogenicidade e discutir os resultados com base na origem dos mesmos. Um total de 39 isolados obtidos de casos de ceratite amebiana (n=16) e de amostras ambientais (n=23) foram classificados em grupos morfológicos (I, II, III) e genotipados (T1-T20) pelo sequenciamento dos fragmentos ASA.S1 e GTSA.B1 do gene 18S rDNA. Para a caracterização, foram utilizados os ensaios de termotolerância, osmotolerância e de citopatogenicidade em células MDCK. Os resultados dos isolados clínicos e ambientais foram comparados pelo teste do χ^2 ($p < 0,05$). A classificação foi realizada como segue: grupo I (T17, T18); grupo II (T1, T3, T4, T11); e grupo III (T5, T15), com predominância do genótipo T4 (22/39). Os isolados clínicos foram identificados como T3 (1/16), T4 (14/16) e T5 (1/16). A maioria dos isolados (38/39) cresceu a 37 °C, mas a tolerância a 40 °C foi mais observada entre os isolados ambientais. A tolerância a 1 M de manitol foi infrequente (4/39), sendo que três desses isolados são de origem clínica. Não houve diferença significativa entre os números de isolados clínicos e ambientais com tolerância a 40 °C ($p = 0,06$), a 1 M de manitol ($p = 0,14$) e com a capacidade de causar efeito citopático ($p = 0,59$). E foi observada uma correspondência variável dessas propriedades entre os diferentes genótipos. Este estudo identifica, pela primeira vez, os genótipos T1, T15 e T18 no Brasil. Além disso, demonstra que há pouca correlação entre a origem clínica dos isolados e os testes fisiológicos de tolerância e citopatogenicidade, o que comprova que alguns parâmetros *in vitro* não refletem necessariamente uma maior propensão de *Acanthamoeba* para causar doenças.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*. Isolados de ceratite. Termotolerância. Osmotolerância. Efeito citopático. Brasil.

ABSTRACT

Free living amoeba of the genus *Acanthamoeba* can eventually act as parasites, causing severe infections in humans and other animals. Some biological and physiological characteristics have been related to the grade of pathogenicity of strains, allowing inferences about the pathogenic potential of the genera. The main goal of this study was to classify isolates of *Acanthamoeba* obtained in Brazil, evaluate properties associated with their pathogenicity and discuss the results in association with the origin of the isolates. A total of 39 *Acanthamoeba* isolates obtained from amoebic keratitis cases (n=16) and environmental sources (n=23) were classified into morphological groups (I, II, III) and genotyped (T1-T20) by sequencing the 18S rDNA fragments ASA.S1 and GTSA.B1. Samples were also tested regarding their thermotolerance, osmotolerance and cytopathogenicity in MDCK cells. Comparisons of clinical and environment isolates were performed by χ^2 test ($p < 0,05$). Isolates were classified as follows: group I (T17, T18); group II (T1, T3, T4, T11); and group III (T5, T15), with the predominance of genotype T4 (22/39). Clinical isolates were genotyped as T3 (1/16), T4 (14/16) and T5 (1/16). The majority of isolates (38/39) were able to grow at 37 °C, but tolerance to 40 °C was more frequent among environmental samples. The tolerance to 1 M mannitol was infrequent (4/39), with three of these corresponding to clinical samples. There was no significant difference between the numbers of clinical and environmental isolates that presented tolerance to 40 °C ($p = 0,06$), to 1 M mannitol ($p = 0,14$) and ability to cause cytopathic effects ($p = 0,59$). Variable correspondence of these properties was observed among distinct genotypes. This study identified, for the first time, the genotypes T1, T15 and T18 in Brazil. It also indicated a weak association between the clinical origin of the isolates and physiological tolerance tests and cytopathogenicity, demonstrating that some in vitro parameters do not necessarily reflect a higher propensity of *Acanthamoeba* to cause disease.

Keywords: *Acanthamoeba*. Keratitis isolates. Thermotolerance. Osmotolerance. Cytopathic effect. Brazil.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 - Principais características do trofozoíto (A) e do cisto (B) de <i>Acanthamoeba</i> . A : citoplasma granuloso; acant - acantapódios típicos; VC - vacúolos contráteis evidentes; nuc - nucléolo proeminente. Barra: 8 µm. B : parede dupla: ect - ectocisto; end - endocisto; ost - ostíolo. Barra: 10 µm.....	18
Quadro 1 - Classificação morfológica de <i>Acanthamoeba</i> proposta por Pussard e Pons (1977).....	19
Quadro 2 - Correspondência entre grupos morfológicos e genótipos de <i>Acanthamoeba</i>	20
Figura 2 - Fatores que contribuem para patogenicidade de <i>Acanthamoeba</i>	24
Figura 3 - Principais eventos em cascata que ocorrem na patogenia da ceratite por <i>Acanthamoeba</i> . 1 : trofozoítos aderidos a glicoproteínas ricas em manose da superfície epitelial da córnea por meio de receptores de manose (MBP); 2 : Liberação de fatores citopáticos e fagocitose, com destruição do epitélio; 3 : trofozoítos atravessam a membrana de Bowman e alcançam o estroma, onde diferentes tipos de proteases são secretadas, degradando-o.....	25
Figura 4 - Microscopia de contraste de fase de cistos clonados cultivados em ágar soja de isolados clínicos e ambientais de <i>Acanthamoeba</i> . As imagens mostram as características típicas de cada grupo morfológico (A-F) e variações entre cistos de um mesmo isolado clonado (A e B; G e H). A, B : grupo I (isolado Tmnus3); C, D : grupo II (isolados Krt2.AAO e S10, respectivamente); E, F : grupo III (isolados A3P4 e R1A, respectivamente); G, H : grupo II (isolados S10 e R2P5-1, respectivamente). Barra: 10µm.....	40
Figura 5 - Tamanho dos amplificadores de <i>Acanthamoeba</i> dos grupos morfológicos I, II e III obtidos por PCR do gene 18S rDNA e visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. A : fragmentos ASA.S1 - 1 : marcador de 100 pb; 2 : grupo I (isolado Mor1); 3 : grupo II (isolado P8II); 4 : grupo III (isolado R1A). B : fragmentos GTSA.B1 - 1 : marcador de 1 Kb; 2 : grupo I (isolado SoA4); 3 : grupo II (isolado Krt13.MOV); 4 : grupo III (isolado A3P4).....	42
Figura 6 - Árvore filogenética de <i>neighbor-joining</i> gerada com sequências ASA.S1 do gene 18S rDNA de isolados clínicos e ambientais de <i>Acanthamoeba</i> obtidos no Brasil. Os números nas ramificações indicam o suporte estatístico dos clados, como segue: repetições de <i>bootstrap</i> ≥ 60 para <i>neighbor-joining</i> / ≥ 60 para <i>maximum likelihood</i> / probabilidade posterior ≥ 0,95 para <i>bayesian inference</i> . "-": sem suporte estatístico. "NA": não se aplica - relação filogenética não estabelecida na referida análise. Genótipos estão representados com seus respectivos números de acesso ao <i>GenBank</i> e isolados genotipados neste estudo estão destacados em negrito. Como grupo externo foi utilizada a sequência JX524850 de <i>Balamuthia mandrillaris</i>	43,44
Figura 7 - Árvore filogenética de <i>neighbor-joining</i> gerada com sequências GTSA.B1 do gene 18S rDNA de isolados clínicos e ambientais de <i>Acanthamoeba</i> obtidos no Brasil. Os números nas ramificações indicam o suporte estatístico dos clados, como segue: repetições de <i>bootstrap</i> ≥ 60 para <i>neighbor-joining</i> / ≥ 60 para <i>maximum likelihood</i> / probabilidade posterior ≥ 0,95 para <i>bayesian inference</i> . "-": sem suporte estatístico. "NA": não se aplica - relação filogenética não estabelecida na referida análise. Genótipos estão representados com seus respectivos números de acesso ao <i>GenBank</i> , grupos morfológicos estão indicados como proposto por Corsaro e outros (2017) e isolados genotipados neste estudo estão destacados em negrito. Como grupo externo foi utilizada a sequência JX524850 de <i>Balamuthia mandrillaris</i>	45
Figura 8 - Aspecto macroscópico do efeito citopático (EC) de isolados clínicos de <i>Acanthamoeba</i> em monocamada de células MDCK. O grau de destruição celular após coloração com cristal violeta foi avaliado como: A , controle negativo; B (+), EC com até 10% de destruição da monocamada causado por Krt14.MRMF; C, D : (++) , EC com 10 a 50% de destruição causado por Krt10.RLC e Krt13.MOV, respectivamente; E, F : (+++), EC com 50 a 100% de destruição causado por Krt16.PEN e Krt11.DSL, respectivamente.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem, localização geográfica, classificação morfológica e genotipagem de isolados clínicos e ambientais de <i>Acanthamoeba</i> obtidos no Brasil durante os anos de 2010 a 2017. A classificação genotípica foi realizada a partir dos fragmentos ASA.S1 e GTSA.B1 do gene 18S rDNA.....	41
Tabela 2 - Resultados dos ensaios de termotolerância, osmotolerância e de efeito citopático de isolados clínicos e ambientais de <i>Acanthamoeba</i> com seus respectivos genótipos.....	47,48
Tabela 3 - Quantidade total e por grupo/genótipo de isolados clínicos e ambientais de <i>Acanthamoeba</i> tolerantes a 37 °C, 40 °C e 1 M de manitol e com capacidade de causar efeito citopático (EC); e correlação entre tolerância aos ensaios fisiológicos e EC.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AICc - critério de informação Akaike corrigido (*corrected Akaike information criterion*)

ASA.S1 - *Acanthamoeba-specific amplimer S1*

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - adenosina trifosfato (*adenosine triphosphate*)

AVL - amebas de vida livre

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA - albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)

CA - ceratite amebiana

CCAP - *Culture Collection of Algae and Protozoa*

CHO - células do ovário de hamster (*chinese hamster ovary*)

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DNA - ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*)

dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfato (*deoxyribonucleotide triphosphate*)

EAG - encefalite amebiana granulomatosa

EC - efeito citopático

EDTA - ácido etilendiaminotretacético (*ethylenediamine tetraacetic acid*)

GTSA.B1 - *genotype-specific amplimer B1*

HUCAM - Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes

Kb - kilobases

LC - lentes de contato

MBP - proteína ligadora de manose (*manose-binding protein*)

MDCK - células do epitélio renal de cachorro (*Madin-Darby canine kidney*)

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NJ - *neighbor-joining*

NN - ágar não nutriente

pb - pares de base

PBS - solução tampão fosfato salina (*phosphate-buffered saline*)

PCR - reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

pH - potencial hidrogeniônico

PSA - penicilina, estreptomicina e anfotericina B

PVC - policloreto de vinil (*polyvinyl chloride*)

PVPP - polivinilpolipirrolidona

PYG - proteose, extrato de levedura e glicose (*proteose, yeast extract and glucose*)

q.s.p - quantidade suficiente para

rDNA - DNA ribossômico (*ribosomal DNA*)

RNA - ácido ribonucléico (*ribonucleic acid*)

SDS - dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

SNC - sistema nervoso central

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

UV- ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 <u>Ciclo de vida, morfologia e distribuição ambiental de <i>Acanthamoeba</i></u>	17
2.2 <u>Classificação morfológica e molecular</u>	19
2.3 <u>O potencial patogênico</u>	22
2.3.1 Infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i>	22
2.3.2 Patogenia da ceratite amebiana.....	23
2.3.3 Determinação do potencial patogênico.....	27
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 <u>Objetivo geral</u>	30
3.2 <u>Objetivos específicos</u>	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 <u>Isolados de <i>Acanthamoeba</i></u>	31
4.1.1 Isolados clínicos.....	31
4.1.2 Isolados ambientais.....	32
4.2 <u>Cultivo dos isolados</u>	32
4.2.1 Clonagem.....	32
4.2.2 Axenização.....	33
4.3 <u>Classificação morfológica</u>	34
4.4 <u>Classificação genotípica</u>	34
4.4.1 Extração de DNA.....	34
4.4.2 PCR do gene 18S rDNA.....	34
4.4.3 Sequenciamento e genotipagem.....	35
4.5 <u>Ensaio fisiológicos</u>	37
4.6 <u>Ensaio de efeito citopático</u>	37
4.7 <u>Análise estatística</u>	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 <u>Classificação morfológica</u>	40
5.2 <u>Classificação genotípica</u>	42
5.3 <u>Ensaio fisiológicos</u>	46
5.4 <u>Ensaio de efeito citopático</u>	46
5.5 <u>Análise dos resultados</u>	46
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS.....	70

1 INTRODUÇÃO

Amebas pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* compreendem protozoários de vida livre cujos habitats naturais são o solo e a água doce, onde sobrevivem como fagotróficos predadores de microorganismos, principalmente de bactérias (GONZÁLEZ-ROBLES et al., 2009; KHAN, 2006; PAGE, 1983). No entanto, sob determinadas condições, essas amebas conseguem sobreviver como parasitas, fagocitando células e invadindo tecidos, causando infecções no homem e em outros animais. Por este motivo, são denominadas de amebas de vida livre (AVL) potencialmente patogênicas (PAGE, 1988; SIDDIQUI; KHAN, 2012; VISVESVARA; SCHUSTER, 2008).

Dois tipos principais de doenças são causados por *Acanthamoeba*: uma infecção oportunista e fatal do sistema nervoso central (SNC) chamada de encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e a ceratite amebiana (CA), uma infecção da córnea grave e de difícil tratamento que acomete indivíduos saudáveis, tendo como principal fator de risco o uso de lentes de contato (LC) (BLOCH; SCHUSTER, 2005; CHEW et al., 2011; WALOCHNIK et al., 2015).

O gênero *Acanthamoeba* é facilmente identificado por meio das características morfológicas de seus trofozoítos, que apresentam acantapódios, e de seus cistos, que apresentam parede dupla (COSTA et al., 2010; MARTÍN-PÉREZ et al., 2017; QVARNSTROM et al., 2013). As diferenças na morfologia dos cistos foram anteriormente utilizadas para descrição de mais de 20 espécies de *Acanthamoeba*, mas a alta variabilidade intraespecífica dos mesmos levou à adoção de um sistema mais simples baseado em grupos morfológicos (I, II e III) para a classificação do gênero (PAGE, 1988; PUSSARD; PONS, 1977). Posteriormente, estudos envolvendo o sequenciamento do gene 18S rDNA (*ribosomal DNA*) permitiram correlacionar parcialmente os grupos morfológicos com 20 genótipos distintos (CORSARO et al., 2015, 2017; FUERST et al. 2015).

Ainda não se sabe quais os fatores determinam, de fato, o potencial patogênico de *Acanthamoeba*, mas já foi demonstrado que algumas propriedades morfológicas, bioquímicas e fisiológicas exercem papel importante nos mecanismos pelos quais *Acanthamoeba* é capaz de acessar um número limitado de hospedeiros

susceptíveis, escapar da resposta imunológica e da ação terapêutica e causar infecção (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; KHAN, 2006). Dentre essas propriedades, o crescimento em temperaturas e osmolaridades elevadas, a velocidade de encistamento, a taxa de crescimento, entre outras, possibilitariam uma adaptação da ameba a condições ambientais adversas, conferindo resistência à mesma. Enquanto que a capacidade de adesão e fagocitose de diversos tipos de células e a atividade proteolítica atuariam como importantes fatores citopatogênicos (KOEHLER et al., 2009; ROCHA-AZEVEDO; COSTA e SILVA-FILHO, 2007; SIDDIQUI; KHAN, 2012;).

Acanthamoeba está presente em uma grande variedade de habitats, por isso, vários estudos adotam as abordagens acima citadas para caracterizar isolados ambientais de *Acanthamoeba* e inferir o potencial de risco dessas amebas para a saúde (CABELLO-VÍLCHEZ et al., 2014; NAGYOVÁ et al., 2010a; NYAYATI et al., 2017). No entanto, já foi demonstrado que isolados de *Acanthamoeba* termotolerantes não são necessariamente patogênicos, e que isolados clínicos podem não tolerar condições de alta osmolaridade, indicando que propriedades fisiológicas nem sempre apresentam uma correlação direta com patogenicidade (HAJIALILO et al., 2016; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004).

Quase não há informação sobre caracterização e avaliação da patogenicidade de *Acanthamoeba* no Brasil, principalmente de isolados clínicos. Neste contexto, este trabalho se propôs a identificar os grupos morfológicos e os genótipos de isolados de *Acanthamoeba* obtidos do raspado de córnea de pacientes com CA atendidos no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) em Vitória, Espírito Santo (ES), e de isolados provenientes de diversos tipos de amostras ambientais do ES e de outros estados do Brasil; e avaliá-los por parâmetros fisiológicos e citopatogênicos pré-estabelecidos para discutir a correlação entre a origem dos isolados (clínica ou ambiental) e os resultados dos testes de patogenicidade. Dessa forma, contribuir com informações sobre isolados brasileiros e sobre a importância dessas propriedades biológicas para a determinação do potencial patogênico de *Acanthamoeba*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ciclo de vida, morfologia e distribuição ambiental de *Acanthamoeba*

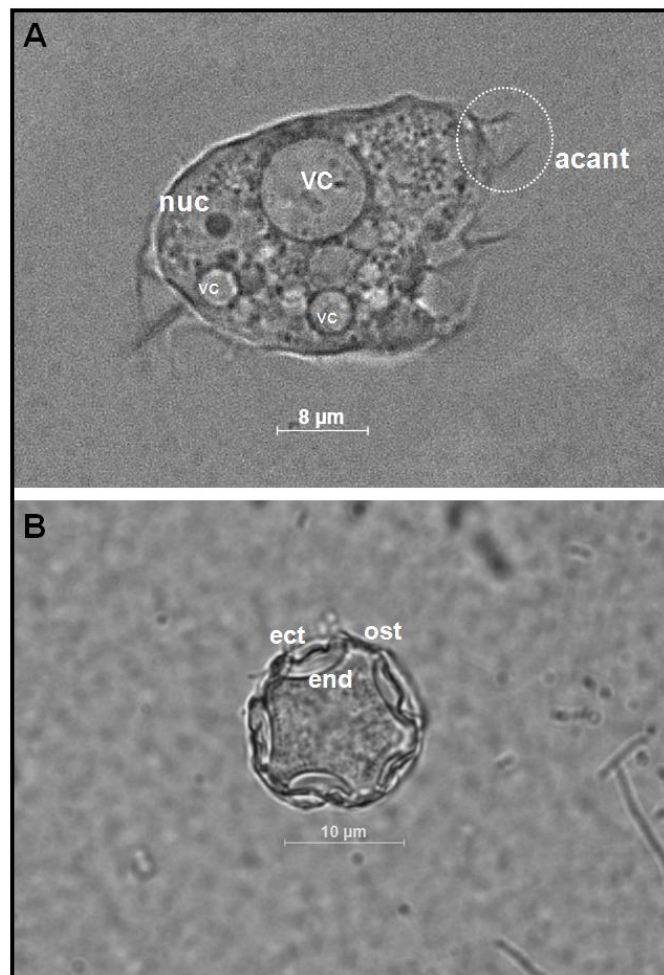
O gênero *Acanthamoeba* apresenta em seu ciclo de vida uma fase trofozoítica, que é a forma vegetativa da ameba, e uma fase cística, que representa a forma de resistência da mesma (Figura 1) (CHÁVEZ-MUNGUÍA et al., 2005; FOUQUE et al., 2012; VISVESVARA et al., 2007b).

O tamanho dos trofozoítos varia de 15 a 125 µm, dependendo da cepa analisada. Caracterizam-se principalmente pela presença de projeções na membrana plasmática que se apresentam sob a forma de espinhos superficiais, denominados acantapódios (Figura 1) (QVARNSTROM et al., 2013; VISVESVARA et al., 2007b). Essas estruturas são importantes para locomoção, captura de alimento e adesão a superfícies. O citoplasma é granuloso e apresenta um ou mais vacúolos contráteis evidentes (Figura 1) (KHAN, 2006; PRESTON et al., 2001). São aeróbicos e se alimentam de bactérias, algas e leveduras por fagocitose; e de matéria orgânica líquida por pinocitose (GONZÁLEZ-ROBLES et al., 2009; KHAN, 2006; LLOYD et al., 1983; SMITH et al., 2010). A reprodução é assexuada e ocorre por divisão binária (VISVESVARA et al., 2007b; VISVESVARA; SCHUSTER, 2008). Geralmente, trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* apresentam somente um núcleo, com um grande e denso nucléolo central (Figura 1) (CORSARO et al., 2015; FOUQUE et al., 2012; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

Os cistos variam de 10 a 35 µm de diâmetro e apresentam parede dupla formada por um endocisto (parede interna) e por um ectocisto (parede externa) (Figura 1). De forma geral, o endocisto é mais espesso e contém celulose, podendo se apresentar de diversas formas, que variam de esférica a estrelada; enquanto que o ectocisto é fino e enrugado, sendo composto principalmente por proteínas (Figura 1) (QVARNSTROM et al., 2013; VISVESVARA et al., 2007b). A parede dupla dos cistos de *Acanthamoeba* se caracteriza pela presença de junções esparsas entre o endo e o ectocisto que variam em número de acordo com a cepa analisada. Essas junções são denominadas poros ou ostíolos e cada um deles é obturado por um opérculo, estrutura que possibilita a liberação do trofozoíto durante o processo de desencistamento, que ocorre quando as condições do meio são favoráveis (Figura 1)

(CHÁVEZ-MUNGUÍA et al., 2005; PUSSARD; PONS, 1977; QVARNSTROM et al., 2013). Em contrapartida, o encistamento ocorre sob condições ambientais adversas, como falta de nutrientes, dessecação e mudanças de pH, temperatura e osmolaridade (CHAGLA; GRIFFITHS, 1974; KHAN, 2006; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

Figura 1 - Principais características do trofozoíto (A) e do cisto (B) de *Acanthamoeba*. **A**: citoplasma granuloso; **acant** - acantapódios típicos; **VC** - vacúolos contráteis evidentes; **nuc** - nucléolo proeminente. Barra: 8 μ m. **B**: parede dupla: **ect** - ectocisto; **end** - endocisto; **ost** - ostíolo. Barra: 10 μ m.



Fonte: Arquivo fotográfico da Coleção de *Acanthamoeba* do Laboratório de Protozoologia da UFES.



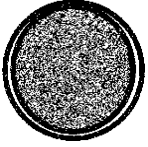
Dentre as AVL, o gênero *Acanthamoeba* é o mais encontrado no ambiente, constituindo talvez o grupo de protozoários de vida livre mais abundante na natureza (PAGE, 1988). Já foi demonstrado o isolamento de *Acanthamoeba* de praticamente todos os ambientes naturais e artificiais, como solo; água doce de rios e lagos; água

do mar, areia, sedimento do oceano e de áreas salobras; de ambientes domésticos e de hospitais, como poeira, água potável e piscina; entre outros, o que reflete a alta capacidade de adaptação dessas amebas a diferentes tipos de condições ambientais (KILIC et al., 2004; NAGYOVÁ et al., 2010a; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

2.2 Classificação morfológica e molecular

Devido às características morfológicas típicas de seus cistos e trofozoítos, o gênero *Acanthamoeba* pode ser facilmente identificado em amostras clínicas e ambientais (COSTA et al., 2010; MARTÍN-PÉREZ et al., 2017; QVARNSTROM et al., 2013). E com base em diferenças como tamanho dos cistos e formato do endo e do ectocisto, isolados de *Acanthamoeba* podem ser divididos em três grupos morfológicos: I, II e III (PUSSARD; PONS, 1977), como mostra o Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação morfológica de *Acanthamoeba* proposta por Pussard e Pons (1977).

Grupo	Aspecto morfológico	Descrição
I		Representa os mais raros e maiores cistos do gênero, com diâmetro entre 18 e 35 μm . Os braços do endocisto são bem separados um do outro, o que confere ao cisto um aspecto estrelado. O ectocisto é circular e liso ou levemente ondulado (COSTA et al., 2010; QVARNSTROM et al., 2013).
II		É o grupo mais comum, que inclui a maioria dos isolados clínicos e ambientais. Os cistos têm diâmetro médio entre 12 de 20 μm . O endocisto varia de oval a poligonal, com braços pouco separados entre si. O ectocisto é ondulado e irregular (CHAN et al., 2011; CORSARO et al., 2015; DUARTE et al., 2013).
III		Compreende cistos de reconhecimento difícil, que normalmente têm diâmetro médio inferior aos demais grupos (~10 μm). O endocisto é oval ou levemente angular. O ectocisto é fino, liso ou fracamente ondulado e justaposto ao endocisto, pouco evidente (MAGNET et al., 2014; NAGYOVÁ et al., 2010b; VISVESVARA et al., 2007a).

Em contrapartida, a identificação de espécies de *Acanthamoeba* em cada grupo morfológico sempre foi problemática. Além da dificuldade inerente à utilização de parâmetros morfológicos para distinguir cistos muito semelhantes entre si, a maioria das espécies de *Acanthamoeba* foi descrita a partir de um único isolado. Sendo assim, pouca foi a contribuição com informações sobre variações intraespecíficas e interespecíficas entre isolados e sobre a influência de fatores externos na morfologia de cistos e trofozoítos, o que resultou em um sistema confuso de classificação (CHAN et al., 2011; NAGYOVÁ et al., 2010b; STRATFORD; GRIFFITHS, 1978). Ainda assim, mais de 20 espécies de *Acanthamoeba* foram descritas ao longo dos anos com base apenas nas características morfológicas de seus cistos (CORSARO et al., 2017; FUERST et al., 2015; PAGE, 1988).

Atualmente, o sistema subgenérico mais aceito de classificação de *Acanthamoeba* é molecular e se baseia no sequenciamento do gene 18S rDNA e no agrupamento dos isolados em tipos sequenciais ou genótipos, quando há, pelo menos, 5% de divergência entre as sequências completas do gene (BOOTON et al., 2005; GAST et al., 1996; STOTHARD et al., 1998). Até o momento, 20 genótipos já foram identificados (T1 a T20) (CORSARO et al., 2017; FUERST et al., 2015). Essas análises corroboram em parte com a classificação morfológica de Pussard e Pons (1977) (Quadro 2), mas apresentam pouca correlação com as espécies descritas de *Acanthamoeba* (CORSARO et al., 2015, 2017; STOTHARD et al., 1998).

Quadro 2 - Correspondência entre grupos morfológicos e genótipos de *Acanthamoeba*.

Grupos morfológicos	Genótipos
I	T7, T8, T9, T17, T18
II	T3, T11, T13, T16
III	T5, T10, T12, T14, T15
II e III	T1, T4, T2/T6, T19, T20

Fonte: CORSARO et al., 2015; FUERST et al., 2015; NIYYATI et al., 2017.

Dados moleculares indicam que todos os genótipos já descritos apresentam origem monofilética, assim como alguns agrupamentos específicos de genótipos. Por

exemplo, o grupo formado por T7/T8/T9/T17/T18, que representa todos os isolados pertencentes ao grupo morfológico I (Quadro 2), é monofilético e também o grupo irmão de todas as demais linhagens do gênero. Outros grupos monofiléticos bem estabelecidos são T3/T4/T11, T2/T6, T10/T12/T14 e T13/T16. Esses grupos possuem sequências nucleotídicas muito similares que, dependendo do fragmento do gene 18S rDNA sob análise, são difíceis de serem diferenciadas (CORSARO et al., 2017; FUERST et al., 2015; RISLER et al., 2013).

O genótipo T4 é o que representa o maior número de isolados clínicos e ambientais, bem como o que apresenta a maior diversidade genética nas regiões variáveis do gene 18S rDNA, com representantes dos grupos morfológicos II e III (Quadro 2) (CORSARO et al., 2017; FUERST, 2014; RISLER et al., 2013). Entretanto, esses isolados não possuem diferenças genéticas suficientes para serem tratados como espécies diferentes. Por isso, muitas espécies de *Acanthamoeba* descritas pelo sistema binominal de classificação no passado e identificadas recentemente como pertencentes ao genótipo T4, representam, na verdade, uma única espécie ou um tipo de cepa, denominada “complexo de espécies *A. castellani*” ou “complexo rDNA T4” (BOOTON et al., 2005; CORSARO et al., 2017; STOTHARD et al., 1998).

Porém, existem genótipos menos diversos geneticamente e que agrupam de forma fidedigna espécies morfológicamente descritas. Como é o caso dos genótipos T5 e T15 do grupo morfológico III (Quadro 2), que correspondem a *Acanthamoeba lenticulata* e *Acanthamoeba jacobsi*, respectivamente (CORSARO et al., 2017; DI CAVE et al., 2009; HEWETT et al., 2003). Dados filogenéticos sugerem que os ancestrais dos grupos morfológicos I e III divergiram do ancestral comum na linha evolutiva de *Acanthamoeba*, e que o grupo III forma um clado parafilético em relação ao grupo II (CORSARO et al., 2017; FUERST, 2014; HEWETT et al., 2003; NUPRASERT et al., 2010).

Diante desses dados, a classificação mais aceita atualmente é aquela que utiliza a identificação de genótipos (T1 a T20) associada ao agrupamento morfológico clássico (grupos I, II e III) (Quadro 2) (CORSARO et al., 2015; QVARNSTROM et al., 2013).

2.3 O potencial patogênico

2.3.1 Infecções causadas por *Acanthamoeba*

Dentre os vários tipos de infecções causadas por *Acanthamoeba* (pele, pulmões, fígado e ossos), a EAG é a mais rara e fatal, enquanto que a CA é a mais comum, sendo, por isso, consideradas as doenças mais importantes causadas por esses protozoários (VISVESVARA, 2010; WALOCHNIK et al., 2015).

A EAG é uma infecção oportunista, crônica e progressiva do SNC, na maioria das vezes fatal. Presume-se que *Acanthamoeba* acesse o SNC por via hematogênica, após o estabelecimento de infecções primárias na pele e no trato respiratório de indivíduos imunologicamente comprometidos, como doentes crônicos (DUARTE et al., 2006; LACKNER et al., 2010; VISVESVARA; SCHUSTER, 2008).

Sendo esta uma infecção secundária, o modo como ocorre a patogenia da doença e a atuação do sistema imunológico não são totalmente esclarecidos. Os sinais e sintomas mais comuns são: dor de cabeça, febre, alterações do comportamento, náusea, vômitos, convulsões e hemiparesia. Os casos mais graves evoluem para lesões necróticas hemorrágicas, irritação das meninges e edema cerebral, com diminuição gradativa da consciência e coma. Ou seja, a EAG apresenta um aspecto clínico muito semelhante aos de outras encefalites, o que dificulta o diagnóstico (SALAMEH et al., 2015; SEIJO MARTINEZ et al., 2000; ZAMORA et al., 2014).

Amostras do líquido cérebro-espinhal e do tecido cerebral são utilizadas para o diagnóstico da EAG, que é realizado principalmente por meio de exames histopatológicos, pelo isolamento de *Acanthamoeba* em cultura e por PCR. Em determinadas situações, a biópsia da pele e dos pulmões também é utilizada (ROCHA-AZEVEDO et al., 2009; WALOCHNIK et al., 2015; ZAMORA et al., 2014). Já foram descritos casos de EAG causada por cepas de genótipos T1, T2, T4, T10, T12 e T18 (BEHERA et al., 2016; MACIVER et al., 2013; NUPRASERT et al., 2010; QVARNSTROM et al., 2013; WALOCHNIK et al., 2008).

Ao contrário do que acontece na EAG, a CA afeta indivíduos imunocompetentes, a maioria deles usuários de LC (85 a 90% dos casos). Por ser uma infecção crônica,

progressiva e de difícil tratamento da córnea, é comum o comprometimento da visão de forma irreversível (LORENZO-MORALES et al., 2015; WALOCHNIK et al., 2015; YAMAZOE et al., 2012).

O uso de LC representa o principal fator de risco para CA pois, além delas atuarem como carreadoras das amebas em situações de higiene inadequada, provocam microtraumatismos epiteliais, que facilitam a adesão de *Acanthamoeba* à córnea (SEAL, 2003; VAN KLINK et al., 1992; GATTI et al., 2010). A crescente população de usuários de LC, inclusive, tem aumentando significativamente a incidência de casos de CA no mundo (RADFORD et al, 2002; WALOCHNIK et al., 2015; ZHONG et al., 2017)

Os sinais e sintomas principais da CA são: vermelhidão, lacrimejamento excessivo, dor intensa (desproporcional ao tamanho das lesões), fotofobia, ptose e edema de pálpebra e hiperemia conjuntival. Os casos mais graves incluem: ulcerações da córnea, formação de infiltrado perineural radial, perda da acuidade visual, invasão do estroma com formação de um infiltrado em anel e opacidade de córnea. O aspecto clínico da CA se assemelha muito aos da ceratite fúngica e viral, o que dificulta o diagnóstico (MASCARENHAS et al., 2014; YAMAZOE et al., 2012; ZHONG et al., 2017)

O diagnóstico da CA é feito por isolamento de *Acanthamoeba* em cultura e PCR, comumente realizados a partir de material obtido por raspagem das lesões. O sucesso do prognóstico acontece quando o diagnóstico é realizado na fase inicial da infecção e o tratamento adequado é estabelecido precocemente (LALITHA et al., 2012; LORENZO-MORALES et al., 2015; ZHONG et al., 2017). Já foram descritos casos de CA causada por cepas de genótipos T2, T3, T4, T5, T6, T7, T9, T10, T11, T15 e T16 (HAJIALILO et al., 2016; MACIVER et al., 2013; TAWFEEK et al., 2016).

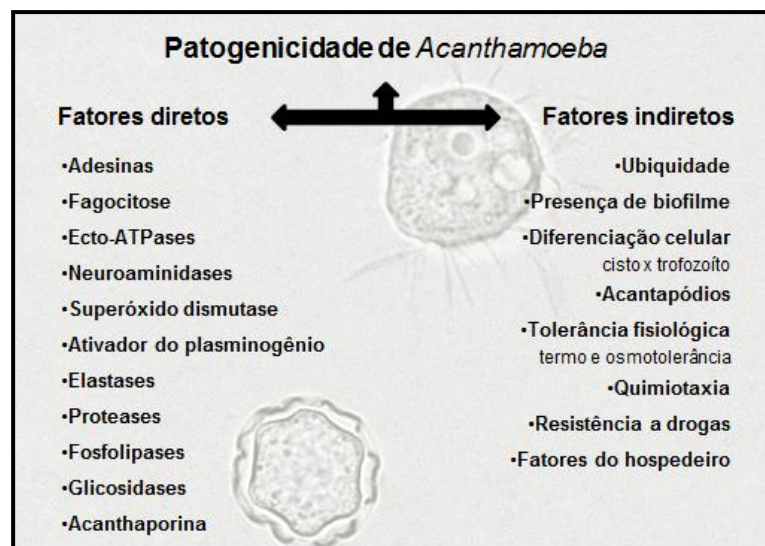
2.3.2 Patogenia da ceratite amebiana

A ampla distribuição de *Acanthamoeba* no ambiente faz com que a exposição humana a esses organismos seja inevitável. É comum o isolamento de *Acanthamoeba* da cavidade nasal de indivíduos saudáveis, por exemplo (BADENOCH et al., 1988; CABELLO-VÍLCHEZ et al., 2014). E já foi demonstrado que a maioria da

população saudável apresenta anticorpos específicos contra *Acanthamoeba*. Tudo isso evidencia a raridade com que infecções sintomáticas causadas por *Acanthamoeba* ocorrem (CHAPPELL et al., 2001; NEELAM; NIEDERKORN, 2017; WALOCHNIK et al., 2001).

Há uma multiplicidade de fatores envolvidos no desenvolvimento da CA. Esses podem estar relacionados com o hospedeiro, com a ameba e com o ambiente, e contribuem de forma direta e indireta na patogenicidade de *Acanthamoeba* (KHAN, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2015; WALOCHNIK et al., 2001), como resume a Figura 2.

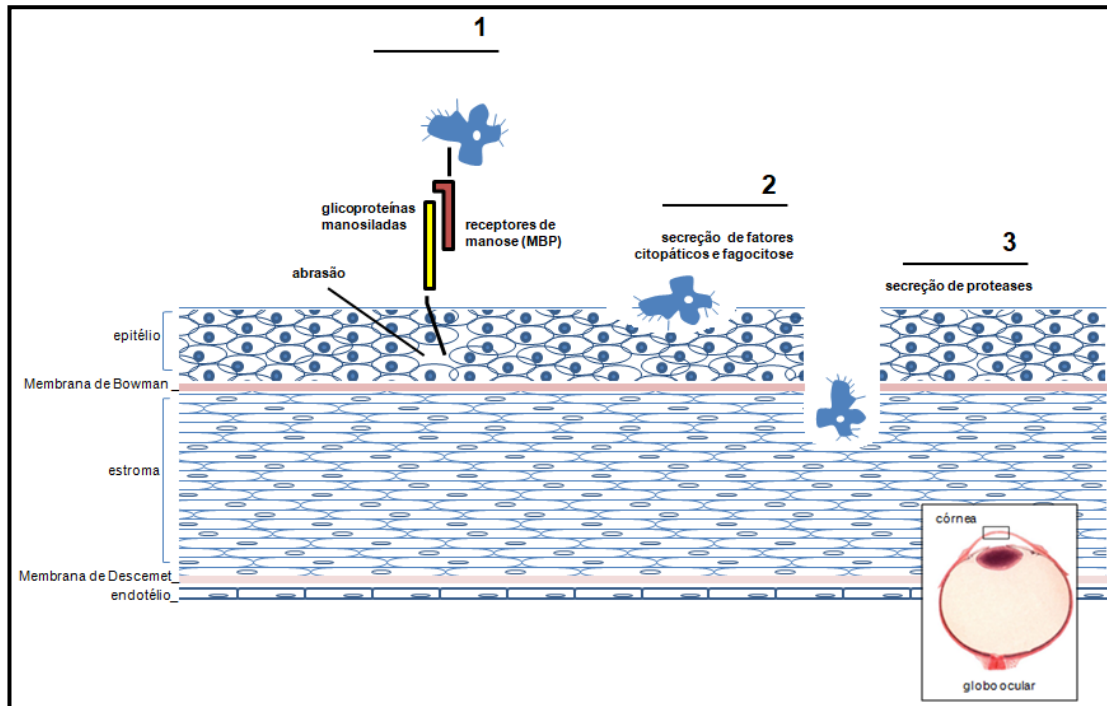
Figura 2 - Fatores que contribuem para patogenicidade de *Acanthamoeba*.



Fonte: LORENZO-MORALES et al., 2015.

O primeiro passo no estabelecimento do processo infeccioso da CA é a capacidade que os trofozoítos possuem de aderir às células do epitélio da córnea, onde ficam restritos inicialmente e causam pequenas lesões. Essa interação ameba/hospedeiro é necessária para que uma série de eventos em cascata ocorra, o que permite que *Acanthamoeba* atravessasse várias barreiras biológicas e alcance o tecido estromal (Figura 3). Por isso, a capacidade de adesão ao epitélio é um dos fatores que vai determinar o grau de patogenicidade de diferentes isolados de *Acanthamoeba* (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2013; VAN KLINK et al., 1992).

Figura 3 - Principais eventos em cascata que ocorrem na patogenia da ceratite por *Acanthamoeba*. **1:** trofozoítos aderidos a glicoproteínas ricas em manose da superfície epitelial da córnea por meio de receptores de manose (MBP); **2:** Liberação de fatores citopáticos e fagocitose, com destruição do epitélio; **3:** trofozoítos atravessam a membrana de Bowman e alcançam o estroma, onde diferentes tipos de proteases são secretadas, degradando-o.



Fonte: CLARKE; NIEDERKORN, 2006; <https://www.pinterest.co.uk/pin/94364554668846971/>.

Duas características dos trofozoítos de *Acanthamoeba* parecem contribuir de forma importante para adesão ao tecido do hospedeiro. São elas: o número de acantapódios e a presença de lectinas transmembranares com afinidade pela manose, denominadas MBP (*Manose-Binding Protein*). Já foi demonstrado que isolados patogênicos apresentam mais acantapódios em sua superfície e exibem níveis altos de MBP quando comparados a isolados não patogênicos (GARATE et al., 2004, 2005, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2013). Isso porque os acantapódios são as estruturas morfológicas responsáveis por modular a ligação da ameba a diferentes tipos de substratos, enquanto que as MBP se ligam às glicoproteínas ricas em manose do epitélio da córnea (Figura 3) (LEHER et al., 1998; LORENZO-MORALES et al., 2015; YANG et al., 1997).

Relacionado aos hospedeiros, um importante fator de risco seria uma maior expressão dessas glicoproteínas manosiladas no epitélio. Já foi demonstrado que a abrasão e os microtraumatismos causados pelo uso contínuo de LC aumentam a

exposição dessas glicoproteínas na superfície da córnea (JAISON et al., 1998). Por isso, o uso de LC é o principal fator predisponente para o desenvolvimento da CA: além do potencial que possuem de carrear a ameba, também são capazes de danificar a integridade epitelial e promover mudanças na expressão dos componentes de membrana da célula do hospedeiro. Dessa forma, a adesão dos trofozoítos à córnea é facilitada, o que é crucial na patogenia da ceratite por *Acanthamoeba* (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2013; PANJWANI et al., 1997).

Subsequente à adesão inicial via MBP, *Acanthamoeba* libera diferentes tipos de fatores citopáticos e enzimas proteolíticas, como ATPases, neuroaminidases, superóxido dismutases, elastases, proteases, fosfolipases e glicosidases, que agem como toxinas para o epitélio da córnea, destruindo-o (Figuras 2 e 3). Os trofozoítos têm acesso, então, à membrana de Bowman e ao estroma da córnea, a partir dos quais a infecção progride e surgem as lesões características da CA (Figura 3) (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2015; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

O efeito citopático (EC) do epitélio e do estroma pode ser induzido por três tipos de mecanismos: apoptose, citólise e fagocitose das células. A morte celular por apoptose e a citólise direta são ativadas por diferentes cascatas de sinalização intracelulares que, de um modo geral, formam poros e aumentam a permeabilidade da membrana celular e mitocondrial; alteram a pressão osmótica, interferindo principalmente na concentração de Ca^{++} dentro da célula; interrompem o ciclo celular; alteram a estrutura do citoesqueleto; e comprometem a morfologia da célula (CASTRILLÓN; OROZCO, 2013; LORENZO-MORALES et al., 2013, 2015).

A fagocitose, por sua vez, ocorre por intermédio de estruturas chamadas de amebostomas, também conhecidas como *sucker structures* ou *food cups*, que se formam na superfície da ameba. Essas estruturas variam consideravelmente de forma e tamanho, de acordo com a natureza do alimento a ser fagocitado, e estão envolvidas no processo pelo qual *Acanthamoeba* adquire pequenas porções do conteúdo citoplasmático da célula alvo e provoca sua destruição (ABED et al., 2013; GONZÁLEZ-ROBLES et al., 2009; OMAÑA-MOLINA et al., 2013).

Dentre as enzimas secretadas por *Acanthamoeba*, se destacam as proteases. Alguns estudos já demonstraram que inibidores de proteases são capazes de diminuir o potencial patogênico de *Acanthamoeba*; e que alguns isolados secretam mais proteases que outros (KOESHLER et al., 2009; LEHER et al., 1998; LORENZO-MORALES et al., 2015). Essas enzimas possuem, entre outras características, capacidade de degradar o colágeno tipo I, principal componente do estroma da córnea (MITRO et al., 1994).

Embora já tenham sido identificadas serinoproteases, cisteínoproteases e metaloproteases sendo secretadas por *Acanthamoeba*, dados da literatura indicam que as serinoproteases são as mais importantes. Além de serem as mais abundantes, estão envolvidas em vários processos durante a patogenia da CA: do dano celular, induzindo a apoptose, ao dano tecidual, degradando o colágeno. Além de participar da evasão da resposta imune do hospedeiro (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; KHAN et al., 2000; LEHER et al., 1998).

2.3.3 Determinação do potencial patogênico

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar características biológicas que sejam intrínsecas de cepas capazes de causar infecção, a fim de segregar *Acanthamoeba* em isolados patogênicos e não patogênicos. E, assim, identificar os principais processos envolvidos na patogenia das doenças causadas por *Acanthamoeba*, o que é primordial para que novas estratégias terapêuticas sejam desenvolvidas (DE JONCKHEERE, 1980; ROCHA-AZEVEDO; COSTA e SILVA-FILHO, 2007; WALOCHNIK et al., 2000a).

Testes de patogenicidade para *Acanthamoeba* podem ser realizados com cultivo monoxênico ou axênico. Cultivo monoxênico é aquele desenvolvido em meio de cultura sólido não nutriente. Nesse tipo de cultivo, além das amebas, estão presentes somente bactérias, utilizadas como substrato alimentar. Cultivo axênico ou puro, por sua vez, é aquele desenvolvido em meio de cultura enriquecido com nutrientes essenciais para *Acanthamoeba*, livres, portanto, de bactérias e de qualquer outro microorganismo (SCHUSTER, 2002).

Diferentes tipos de testes já foram propostos, sendo que os mais utilizados são os de termotolerância e osmotolerância, realizados *in vitro* com cultivos monoxênicos de *Acanthamoeba* (CHAN et al., 2011; KHAN et al., 2002; MAGLIANO et al., 2009).

A relação entre temperatura e patogenicidade de *Acanthamoeba* existe pois se pressupõe que, para sobreviver como parasita, a ameba deve se manter viável, pelo menos, a temperatura média do corpo humano, que é de 37 °C (GRIFFIN, 1972; LORENZO-MORALES et al., 2015; WALOCHNIK et al., 2000a). Já a resistência a temperaturas mais elevadas, como 40 °C e 42 °C, seria uma característica de cepas mais virulentas e causadoras de danos cerebrais, capazes de resistir à febre (DE JONCKHEERE, 1980; GRIFFIN, 1972; LORENZO-MORALES et al., 2015).

Já a relação entre resistência à variação molar do meio e patogenicidade de *Acanthamoeba* foi proposta pois este seria um indicativo de que determinada cepa é capaz de se adaptar e crescer sob condições ambientais adversas, como aquelas encontradas durante o estabelecimento de uma infecção em diferentes tipos de tecidos (KHAN et al., 2001). De fato, esses autores não só propuseram que isolados patogênicos de *Acanthamoeba* seriam capazes de se desenvolver a 1 M de manitol, mas também demonstraram que a osmotolerância coincidia com a capacidade dos isolados de causar EC *in vitro*, o que reforçou a validade do teste como um marcador do potencial patogênico de *Acanthamoeba*.

Os testes realizados com cultivos axênicos de *Acanthamoeba* são: taxa de crescimento, velocidade de encistamento/desencistamento, capacidade de adesão a substratos inertes e biológicos (KOEHSLER et al., 2009; ROCHA-AZEVEDO; COSTA e SILVA-FILHO, 2007), EC em diferentes tipos de culturas celulares e análise da secreção de proteases (CHÁVEZ-MUNGUÍA et al., 2016; KHAN et al., 2000; MAGLIANO et al., 2009; TAKAOKA-SUGIHARA et al., 2012), sendo estes dois últimos os mais utilizados. A sobrevivência em cultivo axênico em si, já é considerada por alguns autores como uma característica da patogenicidade de *Acanthamoeba*, dada a capacidade de adaptação a condições ambientais incomuns (ROCHA-AZEVEDO; COSTA e SILVA-FILHO, 2007).

A habilidade de *Acanthamoeba* destruir uma monocamada de células humanas, como células do epitélio da córnea; e de outros animais, como células do epitélio renal de cachorro (MDCK - *Madin-Darby canine kidney*) e do ovário de hamster

(CHO - *Chinese hamster ovary*); e produzir o que se denomina de EC *in vitro*, é o ensaio mais utilizado com culturas puras de *Acanthamoeba* para determinação do potencial patogênico. Esse teste simula eventos relacionados à patogênica das infecções causadas por *Acanthamoeba*, que são: adesão, apoptose, citólise e fagocitose das células, além da secreção de proteases. Um isolado pode ser considerado não patogênico, pouco ou muito patogênico de acordo com a extensão da destruição observada nas culturas celulares (GONZÁLEZ-ROBLES et al., 2014; CURSONS; BROWN, 1978; KILIC et al., 2004).

Sabe-se que qualquer isolado de *Acanthamoeba* secreta proteases de forma constitutiva, entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado a importância da secreção aumentada das serinoproteases para a patogenicidade de *Acanthamoeba*, pois as mesmas são capazes de degradar diversos tipos de proteínas do hospedeiro (LEHER et al., 1999; CAO et al., 1998). Sendo assim, os testes de patogenicidade que comprovam uma atividade proteolítica diferenciada, demonstram, na verdade, um maior potencial de determinados isolados de *Acanthamoeba* para invasão e disseminação tecidual no decorso de uma infecção (KHAN et al., 2000; MAGLIANO et al., 2009; ROCHA-AZEVEDO; COSTA e SILVA-FILHO, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Classificar isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* por meio de suas características morfológicas e genótípicas; avaliá-los por parâmetros fisiológicos e citopatogênicos; e investigar a correlação entre a origem dos isolados e os resultados dos testes de patogenicidade.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar os grupos morfológicos dos cistos de isolados de *Acanthamoeba* obtidos do raspado de córnea de pacientes atendidos no HUCAM e de isolados provenientes de diferentes tipos de amostras ambientais do Brasil;
- Identificar os genótipos dos isolados por sequenciamento dos fragmentos ASA.S1 e GTSA.B1 do gene 18S rDNA;
- Confirmar a genotipagem por reconstruções filogenéticas;
- Avaliar os isolados por parâmetros fisiológicos de termotolerância e osmotolerância;
- Avaliar o potencial dos isolados de causar efeito citopático em culturas de células MDCK;
- Verificar se há relação entre a origem dos isolados (clínica ou ambiental) e os resultados dos ensaios de termo e osmotolerância e de efeito citopático.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolados de *Acanthamoeba*

Foram selecionados para este estudo 39 isolados da coleção de *Acanthamoeba* do Laboratório de Protozoologia do Departamento de Patologia da UFES (Vitória, ES), obtidos entre os anos de 2010 e 2017.

4.1.1 Isolados clínicos

Neste período, dentre 58 casos de pacientes com suspeita de CA atendidos no Setor de Oftalmologia do HUCAM, 16 foram confirmados em cultura, como descrito abaixo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Registros: 005/07 e CAAE 33983514.7.0000.5060/parecer 827.222) do Centro de Ciências da Saúde da UFES e todos os pacientes concordaram em participar do mesmo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Amostras clínicas foram coletadas por raspagens das lesões na córnea, que foram imediatamente esgotadas em placas de Petri contendo meio ágar soja (ANEXO A, Quadro 1). As placas foram acrescidas de 200 µL de uma solução de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) (ANEXO A, Quadros 2 e 3) e incubadas a 30 °C. Para investigar a presença de *Acanthamoeba* nas placas, as leituras foram realizadas por até 40 dias. Até o 15º dia de incubação, as placas foram examinadas diariamente: nos cinco primeiros dias, as leituras foram feitas em microscópio invertido (aumentos de 200 e 400×); nos demais, as culturas foram examinadas alternadamente em microscópio óptico (lâminas em aumentos de 200 e 400×) e em microscópio invertido. Do 16º ao 40º dia de incubação, as placas foram lidas em intervalos de quatro dias.

Todos os isolados clínicos de *Acanthamoeba* obtidos (n=16), um para cada caso diagnosticado de CA, foram selecionados para este trabalho (Tabela 1).

4.1.2 Isolados ambientais

Foram selecionados 23 isolados ambientais de *Acanthamoeba*. O método de escolha foi baseado no tipo de ambiente a partir do qual as coletas foram realizadas (descritas abaixo) e nas características morfológicas dos cistos dos isolados, de modo que uma seleção prévia dos três grupos morfológicos de Pussard e Pons (1977) fosse feita. Os isolados são provenientes dos estados do Espírito Santo, Amazonas, Paraná e Rio de Janeiro; e foram obtidos a partir de amostras de solo, poeira residencial, biofilme de torneira de água potável; e água de rio, mar, piscina, esgoto e estuário (Tabela 1).

Amostras sólidas (solo, poeira e biofilme) foram coletadas com *swab* seco e imediatamente esgotadas em placas de Petri contendo meio ágar soja. Amostras líquidas (água) foram coletadas com tubo cônico de 50 mL, concentradas por sedimentação espontânea (48 horas) e semeadas (~1 mL do sedimento) em ágar soja. As placas receberam a adição de 200 µL da solução de *E. coli* e foram incubadas a 30 °C. As leituras foram realizadas por até 15 dias: até o quarto dia de incubação, as placas foram examinadas em microscópio invertido (aumentos de 200 e 400×); No quinto, décimo e 15º dia de incubação, as culturas foram lidas em microscópio óptico (lâminas em aumentos de 200 e 400×).

Todas as placas positivas para *Acanthamoeba* obtidas ao longo desses anos foram armazenadas na coleção citada acima.

4.2 Cultivo dos isolados

4.2.1 Clonagem

Isolados obtidos de um único cisto ou trofozoíto foram gerados a partir dos isolados originais pelo método da clonagem por diluição, realizado com modificações do protocolo de Costa e outros (2010). Este procedimento foi adotado pois a presença de mais de uma linhagem de *Acanthamoeba* no isolado pode comprometer sua classificação e caracterização (BOOTON et al., 2002; CHAN et al., 2011; PAGE, 1988).

Os isolados foram suspensos em 0,5 mL de salina de Page (ANEXO A, Quadro 4) e quantificados em câmara de Neubauer. Por diluição, a concentração foi ajustada de modo que houvesse uma ameba/5 µL da suspensão de um isolado. Este volume foi aplicado em poços de fundo chato de uma placa de 96 poços até que fosse confirmada, por microscopia invertida (aumento de 400×), a diluição desejada. O conteúdo do poço de interesse foi homogeneizado em 30 µL de salina de Page e transferido para uma área delimitada em placa de Petri com ágar soja. Sobre essa área foram adicionados 20 µL da solução de *E. coli*.

As placas foram incubadas a 30 °C e lidas a cada dois dias em microscópio invertido (aumentos de 200 e 400×) por até dez dias. As áreas positivas para *Acanthamoeba* foram raspadas com alça bacteriológica e transferidas individualmente para novas placas de cultivo, a partir das quais esse processo foi repetido mais duas vezes, para garantir a obtenção de clones.

4.2.2 Axenização

Os isolados foram axenizados em meio PYG (*proteose, yeast extract and glucose*) (ANEXO A, Quadro 5). Cistos maduros (com mais de 72 horas de cultivo) foram recuperados da placa em 15 mL de salina de Page e lavados três vezes por centrifugação a 450 xg por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso (~2 mL) e a ele foram adicionados 1.250 µg/mL de enrofloxacina.

A solução foi mantida em temperatura ambiente por 24 horas e foi centrifugada mais três vezes em salina de Page (450 xg por 10 minutos). O sedimento (~0,5 mL) foi inoculado em garrafa de cultivo de 25 cm² contendo 5 mL de PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal e 10 µg/mL de enrofloxacina. As garrafas foram incubadas a 30 °C e examinadas diariamente em microscópio invertido (aumentos de 200 e 400×) para controle de contaminantes e verificação do crescimento satisfatório de trofozoítos. O meio foi substituído sempre que necessário e no caso de culturas com alto índice de contaminação, a concentração do antibiótico foi aumentada para até 250 µg/mL.

4.3 Classificação morfológica

Os cistos dos isolados mantidos em ágar soja foram analisados quanto à forma endo e do ectocisto e classificados nos grupos morfológicos I, II e III de Pussard e Pons (1977). Os cistos foram avaliados por microscopia óptica de contraste de fase em microscópio *DM2500* da Leica® (aumento de 1.000×).

4.4 Classificação genotípica

4.4.1 Extração de DNA

Isolados cultivados em ágar soja e PYG foram submetidos à extração de DNA por meio de um protocolo modificado de lise alcalina (COSTA et al., 2017; VIANNA et al., 2009).

Trofozoítos em crescimento ativo ($\sim 10^6$) foram suspensos em 15 mL de salina de Page e lavados três vezes por centrifugação a 450 xg por 10 minutos. O sedimento foi ressuspendido (~ 1 mL) em tubo cônico de 1,5 mL e centrifugado a 6.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os demais procedimentos seguiram o protocolo proposto originalmente, com as seguintes modificações: o PVPP (polivinilpolipirrolidona) não foi utilizado e foi incluída uma etapa de tratamento com 10 μ L de proteinase K (20 mg/mL) em banho-maria a 55 °C por 90 minutos, após a incubação com o tampão de lise (ANEXO B). O DNA extraído foi quantificado em *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific®) e armazenado a -20 °C.

4.4.2 PCR do gene 18S rDNA

Dois pares de *primers* foram utilizados para a amplificação por PCR de fragmentos do gene 18S rDNA de *Acanthamoeba*: JDP1 e JDP2, *primers* gênero-específicos que amplificam a região ASA.S1 (*Acanthamoeba-specific amplicon S1*), para a identificação genotípica dos isolados monoxênicos mantidos em ágar soja; e CRN5 e 1137, *primers* eucarioto-específicos que amplificam a região GTSA.B1 (*genotype-specific amplicon B1*), para a confirmação dos genótipos dos isolados axênicos cultivados em PYG (SCHROEDER et al., 2001).

Na reação com JDP1 e JDP2 foram utilizados: tampão de reação 1× (10×) (*Platinum Taq* Invitrogen®), 4 mM de MgCl₂ (50 mM) (*Platinum Taq* Invitrogen®), 0,2 mM de dNTPs (10 mM) (GE Healthcare®), 1,5 µg/µL de BSA (*bovine serum albumin*) (10 mg/mL), 0,5 µM de cada primer (25 µM) (Invitrogen®), 0,6 U de Taq DNA polimerase (5 U/µL) (*Platinum Taq* Invitrogen®) e 30 ng de DNA, em um volume final de 50 µL. A PCR foi realizada em um termociclador 2720 da Applied Biosystems®, programado para uma desnaturação inicial a 94 °C por 7 min, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C durante 2 min e uma extensão final a 72 °C por 10 min.

Na reação com CRN5 e 1137 foram utilizados: tampão de reação 1× (10×) (*Platinum Taq* Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl₂ (50 mM) (*Platinum Taq* Invitrogen®), 0,2 mM de dNTPs (10 mM) (GE Healthcare®), 1,5 µg/µL de BSA (10 mg/mL), 0,4 µM de cada primer (25 µM) (Invitrogen®), 2,5 U de Taq DNA polimerase (5 U/µL) (*Platinum Taq* Invitrogen®) e 30 ng de DNA, em um volume final de 50 µL. O termociclador 2720 da Applied Biosystems® foi programado para uma desnaturação inicial a 95 °C por 7 min, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C durante 2 min e uma extensão final a 72 °C por 7 min.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (0,4 µg/mL) por meio do transluminador de luz UV *MiniBIS Pro* da DNR Bio-Imaging Systems®. Como marcador de peso molecular, foi utilizado DNA *ladder* de 100 pb (Promega®) para ASA.S1 e de 1 Kb (Promega®) para GTSA.B1.

4.4.3 Sequenciamento e genotipagem

Os fragmentos de amplificação da PCR foram purificados com *ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup* (Affymetrix®), marcados com o *kit BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems®) e precipitados com EDTA/NaOAc/Etanol (ANEXO C). Para gerar sequências consenso, ASA.S1 foi sequenciado com os mesmos *primers* da PCR, JDP1 e JDP2; e GTSA.B1 foi sequenciado com os *primers* CRN5, 1137, 373, 570C, 892 e 892C, como descrito por Schroeder e outros (2001). O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático *ABI 3500* da Applied Biosystems®.

As sequências foram editadas com o programa Geneious 6.1.8 (Biomatters Ltd) e utilizadas para a determinação prévia dos genótipos por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (KATO et al., 2017) no *GenBank/NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*).

Para as reconstruções filogenéticas, foram incluídas sequências referência de todos os genótipos de *Acanthamoeba* e uma sequência de *Balamuthia mandrillaris* como grupo externo, como proposto pelo banco de dados da Ohio State University (<http://u.osu.edu/acanthamoeba/files/2017/01/almost-complete-list-2017-1towsdd.pdf>) e realizado por Corsaro e outros (2015). No total, foram utilizadas 104 sequências de ASA.S1 e 83 sequências de GTSA.B1. As sequências foram alinhadas pelo método Q-INS-i da plataforma online do programa MAFFT 7.0 (ALTSCHUL et al., 1990), que considera a estrutura secundária do RNA. Os *introns* foram removidos e os alinhamentos finais incluíram 427 pb para ASA.S1 e 2.261 pb para GTSA.B1.

O melhores modelos de evolução molecular foram estimados pelo jModelTest2 (DARRIBA et al., 2012), sob o critério de informação Akaike corrigido (AICc), como segue: HKY+G para ASA.S1 e GTR+G para GTSA.B1. Os modelos que estimaram uma proporção de sítios invariáveis (parâmetro "+I") foram desconsiderados, devido a sua correlação com o parâmetro gamma (+G) (MAYROSE et al., 2005; STAMATAKIS, 2006).

Análises filogenéticas foram conduzidas utilizando os critérios de otimização de distância com *neighbor-joining* (NJ), máxima verossimilhança e inferência bayesiana. NJ foi realizado em Geneious 6.1.8, com 500 repetições de *bootstrap*; ML em Treefinder (JOB et al., 2004), com 1.000 replicações de *bootstrap*; e BI em MrBayes, com 10^6 gerações para ASA.S1 e 3×10^7 gerações para GTSA.B1, com amostragem de uma árvore a cada 500 gerações e descarte das primeiras 25% em ambos os conjuntos de dados.

4.5 Ensaio fisiológicos

Ensaio fisiológicos de tolerância foram realizados com modificações dos protocolos propostos por Khan e outros (2001). Para isso, isolados mantidos em ágar soja foram transferidos e cultivados em ágar não nutriente (NN) (ANEXO A, Quadro 6).

Para facilitar a execução e análise dos ensaios, placas de Petri com NN foram demarcadas externamente em suas bases com um círculo central de 1 cm de diâmetro, a partir do qual três círculos concêntricos espaçados em 1 cm foram desenhados. E em cada placa, 30 µL da solução de *E. coli* foram adicionados e espalhados de forma uniforme sobre o ágar.

Para avaliar a termotolerância dos isolados, trofozoítos em crescimento ativo foram suspensos em 1 mL de salina de Page e contabilizados em câmara de Neubauer, de modo que 10^3 deles fossem diluídos em 10 µL de salina. Este volume foi aplicado e preencheu completamente o círculo central das placas demarcadas, que foram incubadas a 30 °C, 37 °C e 40 °C, em triplicata. No sétimo dia de incubação, o crescimento foi avaliado em microscópio invertido (aumentos de 200 e 400×) pela expansão dos trofozoítos sobre os círculos concêntricos a partir do círculo central, como segue: (-), indicando ausência de crescimento; (+), crescimento de até 1 cm; (++) , crescimento de 1 a 2 cm; e (+++) , crescimento acima de 2 cm.

Para os ensaios de osmotolerância, sob as mesmas condições metodológicas e de análise, 10^3 trofozoítos foram inoculados em ágar NN com 1 M de manitol e incubados a 30 °C.

4.6 Ensaio de efeito citopático

Foram utilizadas culturas de células MDCK (ATCC® CCL-34™) para determinar a capacidade dos isolados de *Acanthamoeba* de causar EC *in vitro* (CHÁVEZ-MUNGUÍA et al., 2016; GONZÁLEZ-ROBLES et al., 2014; OMAÑA-MOLINA et al., 2013). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* com 1 g de glicose e 1 g de L-glutamina-Sigma-Aldrich®) suplementado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico PSA (penicilina, estreptomicina e anfotericina B) (ANEXO A, Quadro 7); e foram

mantidas em monocamadas em garrafas de cultivo de 75 cm², incubadas a 37 °C sob um teor de CO₂ a 5%. O meio de cultivo foi substituído em intervalos de 48 horas.

Para os ensaios, as células foram tripsinizadas com 2 mL de solução de tripsina a 0,25% (Sigma-Aldrich®), ressuspendidas em 30 mL de DMEM e contadas em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada de modo a se obter 2 × 10⁵ células/mL de DMEM. Em uma placa para cultura de 24 poços, este volume foi aplicado por poço e observado em microscópio invertido (aumentos de 100 e 200×) até formação da monocamada confluenta de células (~24 horas a 37 °C e 5% de CO₂). Depois disso, o meio sobrenadante foi descartado, para que trofozoítos axênicos de *Acanthamoeba* fossem plaqueados sobre a monocamada, em uma proporção célula/ameba de 1:1.

Para obter os 2 × 10⁵ trofozoítos necessários para os ensaios, foi realizada a quantificação em câmara de Neubauer de culturas em crescimento ativo mantidas em PYG. Para eliminar qualquer vestígio do meio de cultivo, os trofozoítos foram lavados três vezes por centrifugação em salina de Page (450 xg por 10 minutos) e diluídos em 1 mL de DMEM, volume este que foi aplicado aos poços.

Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada isolado e incubados por cinco dias (CURSONS; BROWN, 1978; NAGYOVÁ et al., 2010b; QVARNSTROM et al., 2013). Poços sem trofozoítos, com somente células MDCK em meio DMEM, foram utilizados como controle negativo. Para a leitura das placas, o sobrenadante foi descartado e cada poço foi lavado gentilmente com 1 mL de PBS (*phosphate-buffered saline*) (ANEXO A, Quadro 8). As células remanescentes foram coradas com 1 mL de cristal violeta por 7 minutos e analisadas macroscopicamente.

Os resultados do EC foram definidos como: (-), indicando ausência de destruição da monocamada; (+), indicando EC com até 10% de destruição; (++) , EC com 10 a 50% de destruição; e (+++) , EC com 50 a 100% de destruição.

4.7 Análise estatística

Pelo teste do χ^2 , a quantidade de isolados clínicos que foram tolerantes aos ensaios fisiológicos (40 °C e 1 M manitol) e causaram EC foi comparada com a quantidade de isolados ambientais com os mesmos resultados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Classificação morfológica

Os isolados de *Acanthamoeba* foram classificados nos grupos morfológicos I (n=5), II (n=28) e III (n=6) (Figura 4 e Tabela 1). Foi comum observar variações no número e na forma dos braços do endocisto e no tamanho dos cistos de um isolado clonado (Figura 4).

Figura 4 - Microscopia de contraste de fase de cistos clonados cultivados em ágar soja de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba*. As imagens mostram as características típicas de cada grupo morfológico (A-F) e variações entre cistos de um mesmo isolado clonado (A e B; G e H). **A, B**: grupo I (isolado Tmnus3); **C, D**: grupo II (isolados Krt2.AAO e S10, respectivamente); **E, F**: grupo III (isolados A3P4 e R1A, respectivamente); **G, H**: grupo II (isolados S10 e R2P5-1, respectivamente). Barra: 10µm.

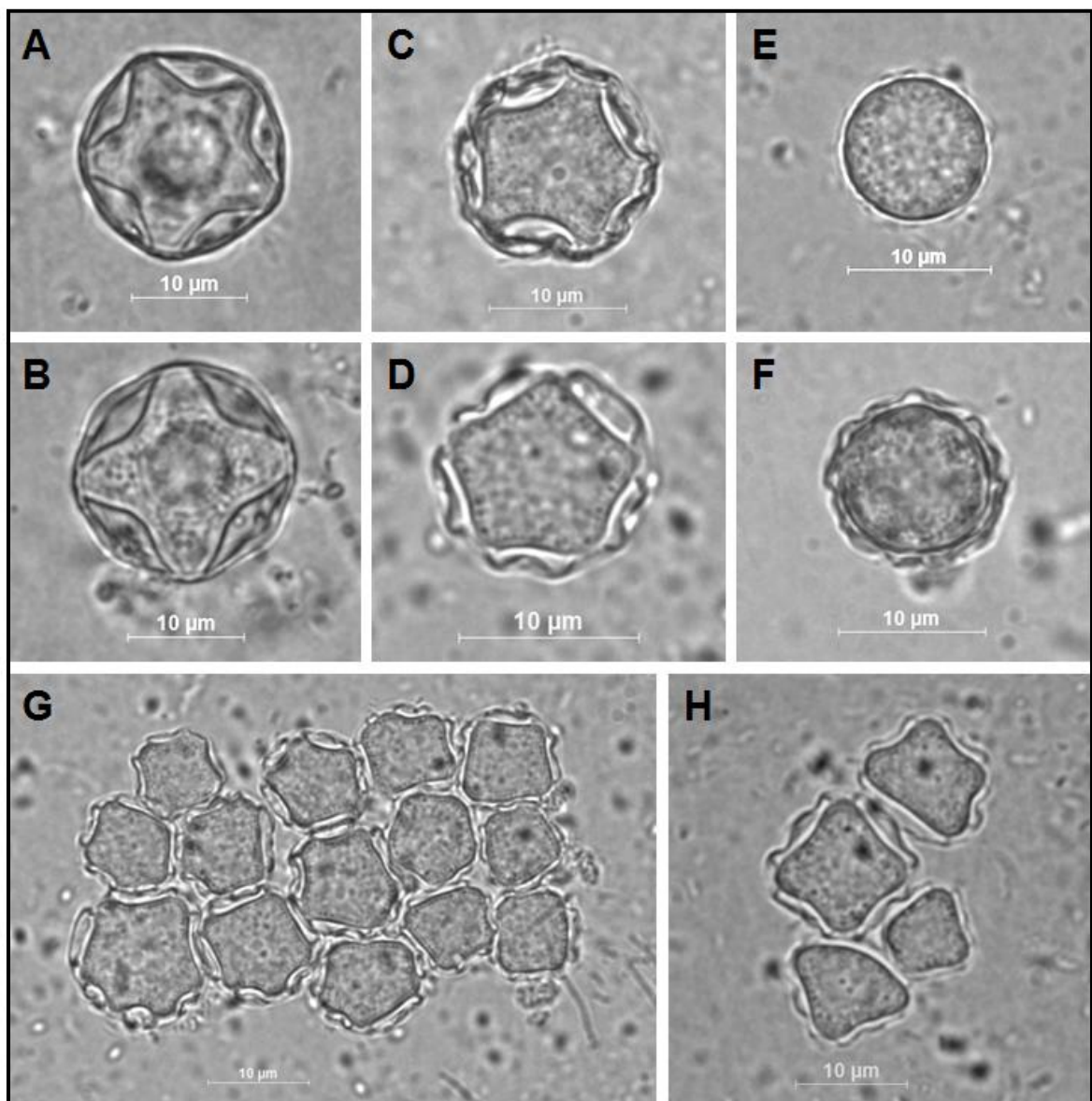


Tabela 1 - Origem, localização geográfica, classificação morfológica e genotipagem de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* obtidos no Brasil durante os anos de 2010 a 2017. A classificação genotípica foi realizada a partir dos fragmentos ASA.S1 e GTSA.B1 do gene 18S rDNA.

Isolados	Origem	Coordenada geográfica	Grupo/ Genótipo	% de similaridade e referência no <i>GenBank</i> de ASA.S1 / GTSA.B1
SoA1	solo (ES) ^a	20°17'52.0"S 40°18'57.1"W	I/T17	98% GU808302.1 / NS
SoA4	solo (ES)	20°07'36.9"S 40°11'06.1"W	I/T17	98% GU808302.1 / 97% GU808301.1
Tmnus3	rio (AM)	3°00'36.5"S 60°10'31.7"W	I/T18	98% KC822468.1 / NS
Mor1	rio (PR)	25°28'34.9"S 48°49'53.7"W	I/T18	98% KC822466.1 / NS
Val1	esgoto (RJ)	21°11'04.0"S 41°53'34.7"W	I/T18	99% KC822470.1 / NS
R2P5-1	poeira (ES)	20°17'51.8"S 40°17'33.3"W	II/T1	99% U07400.1 / 99% U07400.1
BT1	biofilme (ES)	20°17'56.7"S 40°18'44.0"W	II/T3	99% KY072779.1 / 99% GQ397466.1
Mnus4	biofilme (AM)	3°03'42.2"S 60°06'26.9"W	II/T3	100% KY072779.1 / 99% GQ397466.1
Krt15.DFNL	ceratite (ES) ^b		II/T3	100% KY072779.1 / 99% GQ397466.1
BT2	biofilme (ES)	20°17'56.7"S 40°18'44.0"W	II/T4	99% KJ094680.1 / NS
S9	mar (ES)	20°17'30.3"S 40°17'20.7"W	II/T4	100% KT735327.1 / NS
S10	mar (ES)	20°17'57.2"S 40°17'24.9"W	II/T4	100% KT735333.1 / NS
R3P2	poeira (ES)	20°22'26.1"S 40°19'10.2"W	II/T4	100% KT735327.1 / NS
R10P2	piscina (ES)	20°16'40.6"S 40°17'51.8"W	II/T4	100% GQ397478.1 / NS
So2	solo (ES)	20°07'36.9"S 40°11'06.1"W	II/T4	100% KT356266.1 / NS
Krt1.RNM	ceratite		II/T4	100% HM036176.1 / NS
Krt2.AAO	ceratite		II/T4	100% KJ094686.1 / NS
Krt3.ZCS	ceratite		II/T4	100% AB795719.1 / 99% U07406.1
Krt4.JSS	ceratite		II/T4	100% KT735333.1 / NS
Krt5.JDM	ceratite		II/T4	100% KT735332.1 / NS
Krt6.VOSM	ceratite		II/T4	100% KT735333.1 / 99% GQ905498.1
Krt7.PFV	ceratite		II/T4	100% KT735333.1 / 100% GQ905498.1
Krt8.JSS	ceratite		II/T4	100% GQ905497.1 / NS
Krt9.MBO	ceratite		II/T4	100% AB795719.1 / 99% U07406.1
Krt10.RLC	ceratite		II/T4	99% KT735334.1 / 99% U07410.1
Krt11.DSL	ceratite		II/T4	100% AB795719.1 / NS
Krt12.ROS	ceratite		II/T4	100% KT735333.1 / 99% U07404.1
Krt13.MOV	ceratite		II/T4	100% JX441873.1 / 99% U07401.1
Krt14.MRMF	ceratite		II/T4	100% AB795719.1 / 99% U07406.1
SoP1	solo (ES)	20°17'27.2"S 40°17'58.6"W	II/T4	100% HF930499.1 / NS
P8II	estuário (ES)	20°17'36.8"S 40°21'01.9"W	II/T4	100% AB795719.1 / NS
R7P2	piscina (ES)	20°20'11.4"S 40°22'03.8"W	II/T11	99% KJ094683.1 / 99% AF333608.1
SoP3	solo (ES)	20°17'27.2"S 40°17'58.6"W	II/T11	99% KJ094683.1 / NS
A3P4	poeira (ES)	20°19'01.9"S 40°18'45.2"W	III/T5	99% KT897270.1 / 98% U94730.1
R1A	poeira (ES)	20°17'27.2"S 40°17'58.6"W	III/T5	100% KM823784.1 / 99% U94733.1
BT3	biofilme (ES)	20°17'56.7"S 40°18'44.0"W	III/T5	99% KM823784.1 / 100% U94741.1
Krt16.PEN	ceratite		III/T5	100% KT897268.1 / 99% U94731.1
Val2	esgoto (RJ)	21°11'34.1"S 41°53'46.4"W	III/T5	99% AB741044.2 / NS
P10III	estuário (ES)	20°17'26.3"S 40°21'26.4"W	III/T15	99% KC778190.1 / NS

^a estados do Brasil de onde foram coletadas amostras ambientais: Espírito Santo (ES), Amazonas (AM), Paraná (PR) e Rio de Janeiro (RJ).

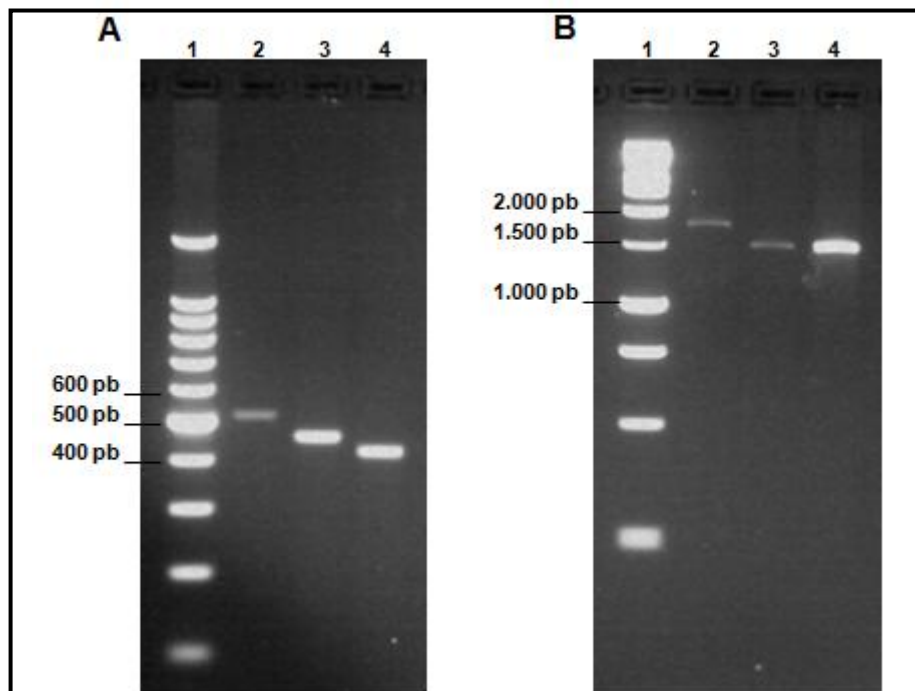
^b todas as amostras clínicas são do ES.

NS: não sequenciado.

5.2 Classificação genotípica

Produtos da PCR de ASA.S1 variaram de 430 a 530 pb (Figura 5). Isolados do grupo I e III apresentaram os maiores e menores tamanhos, respectivamente. Amplificados do grupo II ficaram entre 470 e 500 pb (Figura 5). Os tamanhos de GTSA.B1 foram de 1.500 e 1.700 pb e também apresentaram correspondência com os grupos morfológicos: os maiores foram dos isolados do grupo I e os menores dos grupos II e III (Figura 5). Nenhum isolado apresentou *introns* em seus amplificados.

Figura 5 - Tamanho dos amplificados de *Acanthamoeba* dos grupos morfológicos I, II e III obtidos por PCR do gene 18S rDNA e visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. **A:** fragmentos ASA.S1 - 1: marcador de 100 pb; 2: grupo I (isolado Mor1); 3: grupo II (isolado P8II); 4: grupo III (isolado R1A). **B:** fragmentos GTSA.B1 - 1: marcador de 1 Kb; 2: grupo I (isolado SoA4); 3: grupo II (isolado Krt13.MOV); 4: grupo III (isolado A3P4).



Foram obtidas sequências de ASA.S1 de todos os 39 isolados de *Acanthamoeba*, enquanto que sequências de GTSA.B1 foram obtidas de 18 isolados (Tabela 1). Todas as sequências foram depositadas no *GenBank* sob os números de acesso MG825451 a MG825489.

Com base em suas sequências, os isolados foram classificados como pertencentes aos genótipos T17, T18 (grupo I); T1, T3, T4, T11 (grupo II); T5 e T15 (grupo III). A classificação genotípica por BLAST foi a mesma independente da sequência utilizada (ASA.S1 ou GTSA.B1), com valores altos de identidade ($\geq 97\%$) com aquelas do *GenBank* (Tabela 1).

A identificação filogenética, por sua vez, foi mais acurada em análises com GTSA.B1 do que com ASA.S1 (Figuras 6 e 7). Por exemplo, na filogenia de ASA.S1, não houve suporte estatístico para os agrupamentos monofiléticos de T3 e T4; sequências de T11 não foram agrupadas como monofiléticas; e isolados de genótipos T17 e T18 não foram identificados adequadamente (Figura 6). Para ambas as sequências, as filogenias por NJ mostraram as melhores topologias, com suportes altos para os clados (Figuras 6 e 7).

O genótipo T4 predominou entre os isolados clínicos (14/16) e ambientais (8/23). Os isolados clínicos também foram classificados como T3 (n=1) e T5 (n=1) (Tabela 1 e Figura 7). Os outros genótipos identificados dentre os isolados ambientais foram T17 (n=2), T18 (n=3), T1 (n=1), T3 (n=2), T11 (n=2), T5 (n=4) e T15 (n=1) (Tabela 1 e Figura 7).

Figura 6 - Árvore filogenética de *neighbor-joining* gerada com sequências ASA.S1 do gene 18S rDNA de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* obtidos no Brasil. Os números nas ramificações indicam o suporte estatístico dos clados, como segue: repetições de *bootstrap* ≥ 60 para *neighbor-joining* / ≥ 60 para máxima verossimilhança / probabilidade posterior bayesiana $\geq 0,95$. "-": sem suporte estatístico. "NA": não se aplica - relação filogenética não estabelecida na referida análise. Genótipos estão representados com seus respectivos números de acesso ao *GenBank* e isolados genotipados neste estudo estão destacados em negrito. Como grupo externo foi utilizada a sequência JX524850 de *Balamuthia mandrillaris*.

(continua)

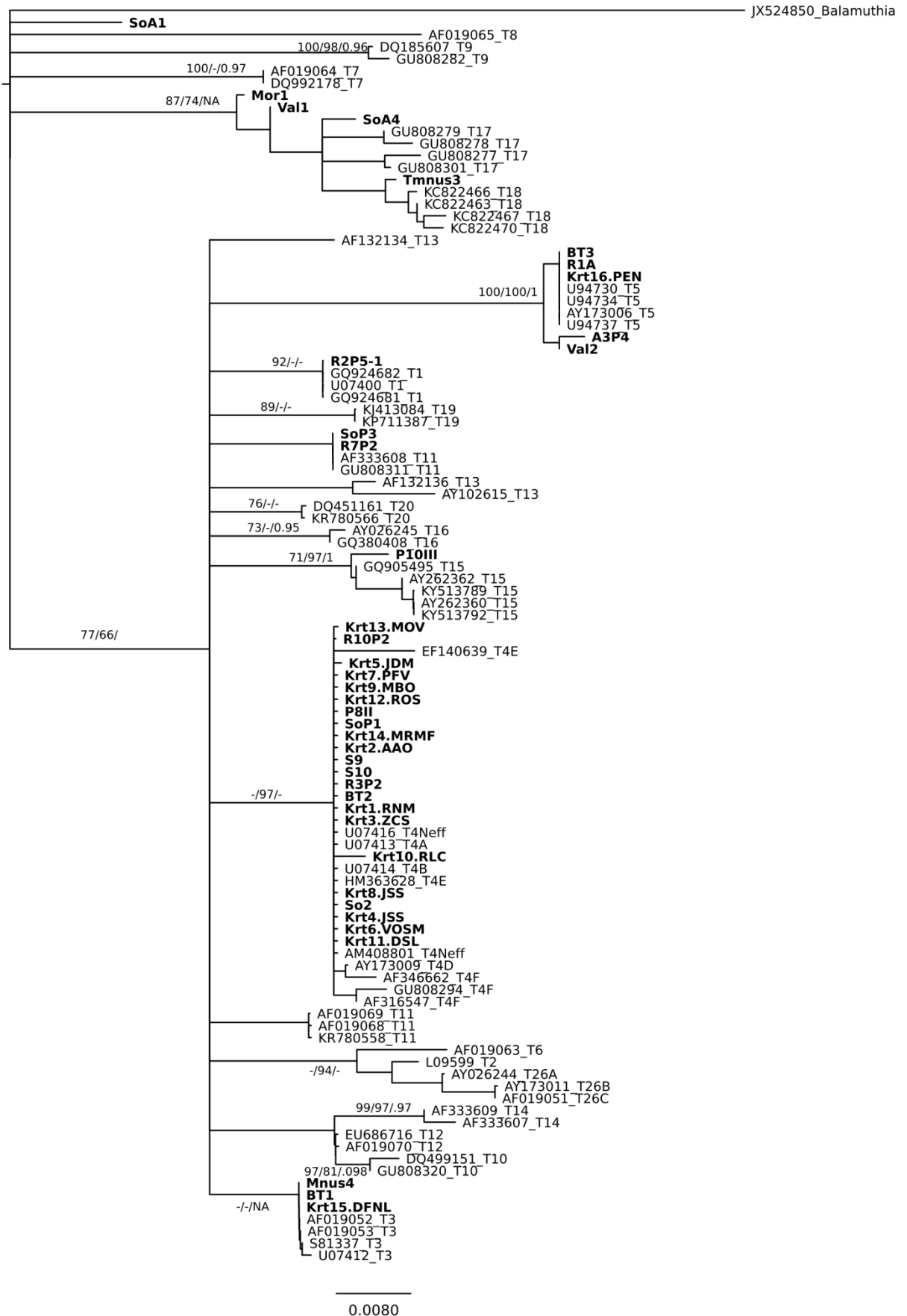
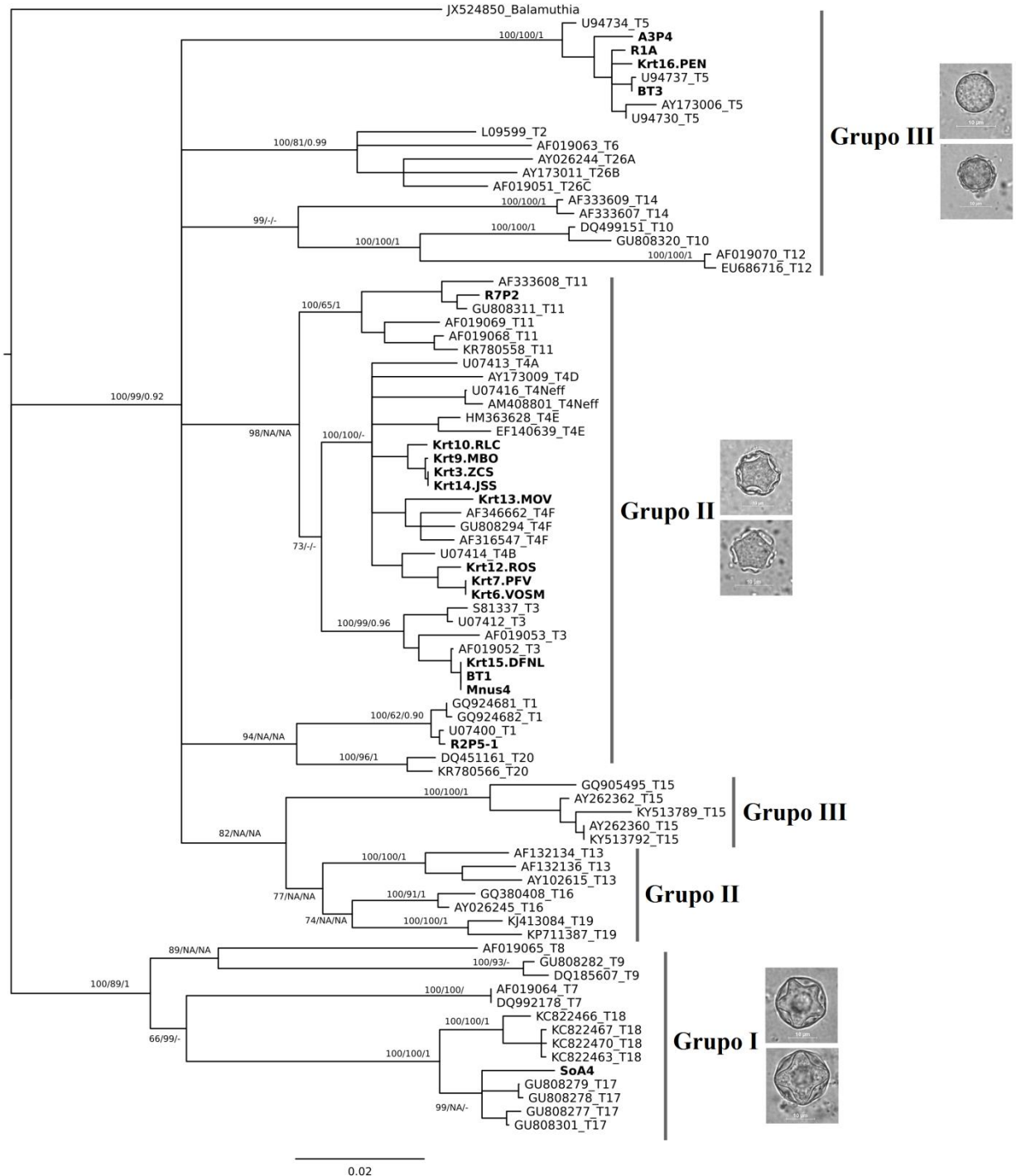


Figura 7 - Árvore filogenética de *neighbor-joining* gerada com sequências GTSA.B1 do gene 18S rDNA de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* obtidos no Brasil. Os números nas ramificações indicam o suporte estatístico dos clados, como segue: repetições de *bootstrap* ≥ 60 para *neighbor-joining* / ≥ 60 para máxima verossimilhança / probabilidade posterior bayesiana $\geq 0,95$. "-": sem suporte estatístico. "NA": não se aplica - relação filogenética não estabelecida na referida análise. Genótipos estão representados com seus respectivos números de acesso ao *GenBank*, grupos morfológicos estão indicados como proposto por Corsaro e outros (2017) e isolados genotipados neste estudo estão destacados em negrito. Como grupo externo foi utilizada a sequência JX524850 de *Balamuthia mandrillaris*.



5.3 Ensaio fisiológicos

Os resultados dos ensaios fisiológicos estão representados na Tabela 2. Todos os isolados cresceram bem a 30 °C e 37 °C, exceto o isolado ambiental P8II, que não se desenvolveu a 37 °C. Dentre os isolados que cresceram a 40 °C (14/39), a maioria é proveniente do ambiente (n=11). Somente quatro isolados se desenvolveram a 1 M de manitol: três deles de origem clínica (Krt4.JSS, Krt7.PFV e Krt12.ROS) e um de origem ambiental (SoP3).

5.4 Ensaio de efeito citopático

Dentre os 39 isolados de *Acanthamoeba*, 24 (11 clínicos e 13 ambientais) foram axenizados e testados quanto ao seu potencial citopatogênico. Do isolamento à axenização, esses cultivos foram submetidos de cinco a 12 passagens em um período máximo de seis semanas, a depender do crescimento e capacidade de adaptação do isolado.

Somente três isolados, um clínico (Krt9.MBO) e dois ambientais (P8II e SoP3), não causaram EC. Nove isolados causaram EC com até 10% de destruição da monocamada (Tabela 2). Dentre os isolados com EC acima de 10% (n=12), quatro apresentaram grande potencial citopatogênico (EC com 50 a 100% de destruição): Krt11.DSL e Krt16.PEN, de origem clínica; e SoA1 e Val1, de origem ambiental (Tabela 2). A Figura 8 mostra os níveis de destruição da monocamada de células MDCK utilizados para avaliar o EC.

5.5 Análise dos resultados

Não houve diferença significativa entre os números de isolados clínicos e ambientais com tolerância a 40 °C ($p=0,06$), a 1 M de manitol ($p=0,14$) e com a capacidade de causar EC ($p=0,59$).

Segundo os grupos morfológicos e os genótipos dos isolados, a correlação entre capacidade de causar EC e tolerância aos ensaios fisiológicos está representada na Tabela 3. Quando o EC e a tolerância a 37 °C foram comparados, ficou evidente a correlação entre essas duas propriedades. Já a tolerância a 40 °C e a 1 M de

manitol foram pouco correspondentes à capacidade de causar EC. Se o ensaio de osmotolerância for desconsiderado, é possível observar a seguinte relação: isolados de genótipos T1 e T5 crescendo muito bem a 40 °C e causando EC acima de 10% (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Resultados dos ensaios de termotolerância, osmotolerância e de efeito citopático (EC) de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* com seus respectivos genótipos.
(continua)

Isolados e genótipos	Termotolerância ^a			Osmotolerância ^a (1 M manitol)	Efeito citopático ^b
	30 °C	37 °C	40 °C		
SoA1 (T17)	+++	+++	-	-	+++
SoA4 (T17)	+++	+++	-	-	NA
Tmnus3 (T18)	+++	+++	-	-	NA
Mor1 (T18)	++	++	-	-	NA
Val1 (T18)	++	+++	++	-	+++
R2P5-1 (T1)	+++	+++	+++	-	++
BT1 (T3)	+++	+++	-	-	NA
Mnus4 (T3)	+++	+++	+	-	+
^c Krt15.DFNL (T3)	+++	+++	++	-	+
BT2 (T4)	+++	+++	-	-	+
S9 (T4)	+++	+++	-	-	NA
S10 (T4)	+++	+++	++	-	++
R3P2 (T4)	+++	+++	+	-	NA
R10P2 (T4)	+++	+++	-	-	+
So2 (T4)	+++	+++	-	-	NA
Krt1.RNM (T4)	+++	+++	-	-	NA
Krt2.AAO (T4)	+++	+++	+	-	+
Krt3.ZCS (T4)	+++	+++	-	-	+
Krt4.JSS (T4)	+++	+++	-	+	NA
Krt5.JDM (T4)	+++	+++	-	-	NA
Krt6.VOSM (T4)	+++	+++	-	-	NA
Krt7.PFV (T4)	+++	+++	-	+	+
Krt8.JSS (T4)	+++	+++	-	-	NA
Krt9.MBO (T4)	+++	+++	-	-	-
Krt10.RLC (T4)	+++	+++	-	-	++
Krt11.DSL (T4)	+++	+++	-	-	+++
Krt12.ROS (T4)	+++	+++	-	+	++
Krt13.MOV (T4)	+++	+++	-	-	++
Krt14.MRMF (T4)	+++	+++	-	-	+
SoP1 (T4)	+++	++	-	-	NA
P8II (T4)	+++	-	-	-	-
R7P2 (T11)	+++	+++	+	-	+
SoP3 (T11)	+++	+++	-	+	-

Tabela 2 - Resultados dos ensaios de termotolerância, osmotolerância e de efeito citopático (EC) de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* com seus respectivos genótipos. (conclusão)

Isolados e genótipos	Termotolerância ^a			Osmotolerância ^a (1 M manitol)	Efeito citopático ^b
	30 °C	37 °C	40 °C		
A3P4 (T5)	+++	+++	+++	-	++
R1A (T5)	+++	+++	+++	-	++
BT3 (T5)	+++	+++	+++	-	++
Krt16.PEN (T5)	+++	+++	+++	-	+++
Val2 (T5)	++	+++	+++	-	NA
P10III (T15)	++	++	+++	-	NA
Total	39/39 (100%)	38/39 (97.4%)	14/39 (35.9%)	4/39 (10.3%)	21/24 (87.5%)
Isolados ambientais	23/23 (100%)	22/23 (95.7%)	11/23 (47.8%)	1/23 (4.3%)	11/13 (84.6%)
Isolados clínicos	16/16 (100%)	16/16 (100%)	3/16 (18.8%)	3/16 (18.8%)	10/11 (90.9%)

^a avaliação do crescimento: (-), ausência de crescimento a partir da área central da placa; (+), crescimento de até 1 cm; (++) , crescimento de 1 a 2 cm; e (+++), crescimento acima de 2 cm.

^b avaliação do EC: (-), ausência de destruição da monocamada; (+), EC com até 10% de destruição; (++) , EC com 10 a 50% de destruição; e (+++), EC com 50 a 100% de destruição.

^c krt: *keratitis* - isolados de ceratite.

NA: não avaliado.

Figura 8 - Aspecto macroscópico do efeito citopático (EC) de isolados clínicos de *Acanthamoeba* em monocamada de células MDCK. O grau de destruição celular após coloração com cristal violeta foi avaliado como: **A**, controle negativo; **B** (+), EC com até 10% de destruição da monocamada causado por Krt14.MRMF; **C**, **D**: (++) , EC com 10 a 50% de destruição causado por Krt10.RLC e Krt13.MOV, respectivamente; **E**, **F**: (+++), EC com 50 a 100% de destruição causado por Krt16.PEN e Krt11.DSL, respectivamente.

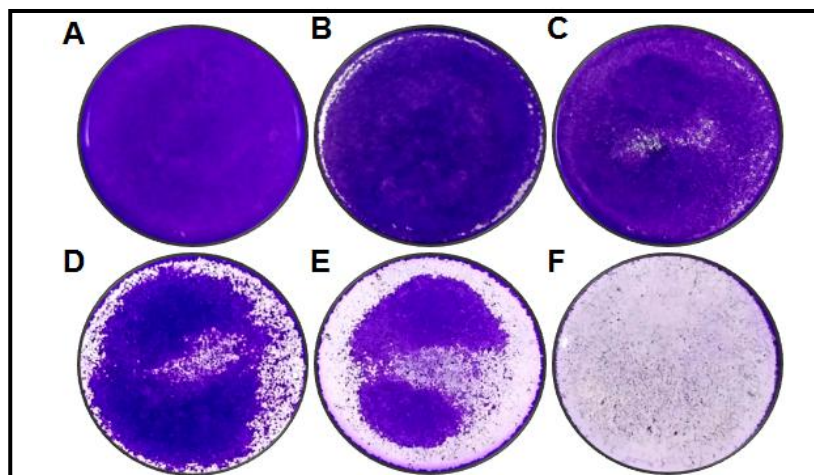


Tabela 3 - Quantidade total e por grupo/genótipo de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* tolerantes a 37 °C, 40 °C e 1 M de manitol e com capacidade de causar efeito citopático (EC); e correlação entre tolerância aos ensaios fisiológicos e EC.

Propriedades (nº positivos/total)	Grupos e genótipos							
	I		II				III	
	T17	T18	T1	T3	T4	T11	T5	T15
Tolerância 37 °C (38/39)	2/2	3/3	1/1	3/3	21/22	2/2	5/5	1/1
Tolerância 40 °C (14/39)	0/2	1/3	1/1	2/3	3/22	1/2	5/5	1/1
Tolerância 1 M (4/39)	0/2	0/3	0/1	0/3	3/22	1/2	0/5	0/1
Efeito citopático (21/24)	1/1	1/1	1/1	2/2	11/13	1/2	4/4	NA
37 °C x EC	1	1	1	2	12 ^a	1	4	NA
40 °C x EC	0	1	1	2	2	2 ^b	4	NA
1 M x EC	0	0	0	0	2	0	0	NA

^a EC negativo e não tolerante a 37 °C = 1; EC positivo e tolerante a 37 °C = 11.

^b EC negativo e não tolerante a 40 °C = 1; EC positivo e tolerante a 40 °C = 1.

EC: efeito citopático.

NA: não avaliado.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho evidencia como a exposição humana a *Acanthamoeba* é inevitável, dado a diversidade de ambientes a partir dos quais os isolados foram obtidos. Com base na classificação morfológica clássica e na genotipagem atual de *Acanthamoeba*, os isolados aqui analisados são representantes fidedignos dos três grupos morfológicos (I, II e III) e de oito (T1, T3, T4, T5, T11, T15, T17, T18) dentre os 20 tipos genotípicos já descritos. Quando, entretanto, são utilizados testes de patogenicidade, não é possível o agrupamento dos isolados. Isso significa que um isolado classificado como patogênico por um ensaio, pode ser definido como não patogênico por outro. Além disso, o comportamento aos testes não corresponde à origem dos isolados, clínica ou ambiental.

Embora *Acanthamoeba* tenha sido formalmente descrita em 1931, a autenticidade do gênero só foi reconhecida em 1977, após o estudo definitivo de Pussard e Pons (1977) sobre a morfologia de seus cistos. E até hoje, mais de 40 anos depois, a principal metodologia de classificação morfológica de *Acanthamoeba* é a divisão dos isolados entre os três grupos sugeridos por esses autores (CORSARO et al., 2017; FUERST et al., 2015).

Já foi demonstrado, no entanto, que as condições de cultivo exercem influência na estrutura cística e que culturas de amebas clonadas podem apresentar cistos com diferentes aspectos morfológicos, o que pode dificultar a identificação morfológica (CHAN et al., 2011; NAGYOVÁ et al., 2010b; WALOCHNIK et al., 2000a). Neste trabalho, por exemplo, muitos isolados clonados apresentaram essas variações, principalmente no número de braços do endocisto. Neste contexto, a divisão de *Acanthamoeba* em genótipos, definida segundo os fragmentos hipervariáveis do gene 18S rDNA, é mais confiável e representa a principal ferramenta taxonômica para a identificação subgenérica do gênero atualmente (FUERST et al., 2015).

O tamanho do gene 18S rDNA de *Acanthamoeba* varia de 2.300 a 2.700 pb e é formado por 12 regiões variáveis, flanqueadas por inúmeras regiões conservadas. Esse gene é quase 500 nucleotídeos maior que um típico 18S rDNA eucarioto, que possui entre 1.800 e 1.900 pb. Sem considerar os *introns*, o grupo morfológico I apresenta os maiores tamanhos do gene, com 2.600 a 2.700 pb, enquanto que nos

grupos morfológicos II e III o tamanho é de aproximadamente 2.300 pb (FUERST et al., 2015; GAST et al., 1996; STOTHARD et al., 1998).

Por questões práticas e econômicas, se tornou comum a utilização de fragmentos menores do gene (< 1.500 pb) para a identificação e genotipagem de *Acanthamoeba* (MAGLIANO et al., 2012; RISLER et al., 2013; SCHROEDER et al., 2001). Dentre eles, o mais utilizado é o fragmento ASA.S1, que varia de 423 a 551 pb (entre os pb 936 e 1.402 de referência do gene). Embora ASA.S1 represente somente uma pequena porção do gene, variações em seu tamanho segundo o grupo morfológico equivalem, em parte, àsquelas observadas no gene completo (CARLESSO et al., 2014; DUARTE et al., 2013; SCHROEDER et al., 2001).

Neste trabalho, isolados do grupo I apresentaram os maiores tamanhos de ASA.S1, em torno de 530 pb, enquanto que os menores tamanhos (~430 pb) foram observados no grupo III. Entre eles ficaram os isolados do grupo II, com fragmentos entre 470 e 500 pb. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Schroeder e outros (2001) e Tawfeek e outros (2016). Sugere-se, com isso, que os resultados da PCR de ASA.S1 podem ser utilizados para confirmar a classificação morfológica de Pussard e Pons (1977).

Por se tratar de uma região parcialmente conservada, ASA.S1 possui uma sequência com aproximadamente 110 pb (pb 1.271 a 1.383) que apresenta alta taxa de variabilidade. Por isso, este fragmento pode ser utilizado também para distinguir alguns genótipos, exceto aqueles que são filogeneticamente muito próximos entre si, como é o caso de T3/T4/T11 e T17/T18 (MARTÍN-PÉREZ et al., 2017; SCHROEDER et al., 2001; QVARNSTROM et al., 2013). Por sua vez, o fragmento GTSA.B1 abrange uma região de 1.400 a 1.700 pb (pb 1 a 1.475), a depender do genótipo e sem considerar a presença de *introns*, e inclui oito regiões variáveis, inclusive ASA.S1. Por este motivo, é considerado um amplímero genótipo-específico para *Acanthamoeba*, já que permite uma distinção segura entre todos os genótipos já descritos (MARTÍN-PÉREZ et al., 2017; SCHROEDER et al., 2001).

Foram obtidas neste estudo sequências GTSA.B1 com 1.700 pb do grupo I, enquanto que isolados dos grupos II e III geraram fragmentos de 1.500 pb. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de ser comum no 18S rDNA de *Acanthamoeba* a expansão de uma série de regiões altamente variáveis dispersas

pelo gene que, em termos de tamanho e heterogeneidade, são mais proeminentes no grupo I (FUERST et al., 2015; STOTHARD et al., 1998). Embora nenhum isolado tenha apresentado *introns* em suas sequências GTSA.B1, eles já foram identificados em isolados dos grupos morfológicos II (genótipos T3 e T4) e III (genótipos T5 e T15), com tamanhos que variam entre 519 e 933 pb (CORSARO et al., 2017; GAST et al., 1994; NAGYOVÁ et al., 2010a; SCHROEDER-DIEDRICH et al., 1998).

Independente se foi utilizado ASA.S1 ou GTSA.B1 para genotipagem dos isolados por BLAST, oito genótipos foram seguramente identificados neste trabalho: T1, T3, T4, T5, T11, T15, T17 e T18. Todos eles corresponderam à classificação morfológica realizada previamente, como sugerido por Corsaro e outros (2017). No entanto, a identificação filogenética de *Acanthamoeba* foi mais robusta quando GTSA.B1 foi utilizado. A filogenia de ASA.S1 falhou em identificar os genótipos T17 e T18, e somente a reconstrução filogenética de GTSA.B1 revelou suportes altos para o agrupamento monofilético dos isolados, especialmente daqueles pertencentes ao clado T3/T4/T11. Esses resultados confirmam dados da literatura de que a filogenia de GTSA.B1 apresenta uma robustez muito próxima daquela que utiliza todo o gene 18S rDNA (MARTÍN-PÉREZ et al., 2017; SCHROEDER et al., 2001).

Foi revelada uma predominância do genótipo T4 (grupo II) em isolados clínicos de *Acanthamoeba* (87,5% do total de isolados clínicos), como largamente descrito na literatura (BOOTON et al., 2005; MACIVER et al., 2013; RISLER et al., 2013). Os outros dois genótipos identificados nos isolados clínicos foram T3 (1 isolado), também pertencente ao grupo II, e T5 (1 isolado), do grupo III. Como demonstrado por Maciver e outros (2013), depois de T4, os genótipos mais comumente isolados em casos de CA são T3 e T11, que compõem o clado T3/T4/T11 (MAGNET et al., 2014; RISLER et al., 2013; STOTHARD et al., 1998).

É interessante notar que, em termos de prevalência ambiental, T5 e T3 são os mais abundantes depois de T4, o que também poderia explicar a presença desses genótipos nos isolados clínicos de *Acanthamoeba* aqui analisados (BOOTON et al., 2005; MACIVER et al., 2013; TAWFEEK et al., 2016). Até então, o único registro na literatura de genotipagem de isolados clínicos de *Acanthamoeba* no Brasil é o trabalho de Duarte e outros (2013), realizado em colaboração com o Laboratório de

Protozoologia da UFES. Esses autores identificaram o genótipo T4 em quatro casos de CA do HUCAM, atendidos entre os anos de 2006 e 2008.

Dentre os isolados ambientais de *Acanthamoeba*, no grupo I foram identificados os genótipos T17 e T18, raros e pouco conhecidos acerca de suas características biológicas. O genótipo T17, obtido aqui a partir de amostras de solo, somente foi isolado e caracterizado anteriormente em dois estudos, que utilizaram amostras de água doce e solo (MAGLIANO et al., 2012; NUPRASERT et al., 2010). Até onde se tem conhecimento, este é o primeiro trabalho a relatar o isolamento de T18 de amostras ambientais (rio e esgoto) no Brasil e no mundo. Até hoje, esse genótipo só havia sido isolado de amostras de tecidos da pele e do cérebro de um caso de EAG (QVARNSTROM et al., 2013).

Os isolados ambientais do grupo II foram classificados como T1, T3, T4 e T11, com T4 compondo a maioria dos isolados, como esperado (BOOTON et al., 2005; MACIVER et al., 2013; NAGYOVÁ et al., 2010a). O genótipo T1, obtido de poeira residencial, é raro e também foi identificado pela primeira vez no Brasil neste estudo. Quase não há relatos na literatura sobre o isolamento de T1 em amostras ambientais, por isso, sua distribuição natural no ambiente é desconhecida (BOOTON et al., 2005; MACIVER et al., 2013; NIYYATI et al., 2017). Nenhum caso de CA causado por esse genótipo foi descrito até hoje. Em contrapartida, T1 já foi isolado em casos de EAG e infecções sistêmicas no homem e em outros animais (AZZAM et al., 2015; KENT et al., 2011; MACIVER et al., 2013).

Do grupo III, foram identificados T5 e T15 entre os isolados ambientais de *Acanthamoeba*. O genótipo T5, como mencionado anteriormente, é um dos mais encontrados no ambiente, sendo, portanto, o genótipo mais comum desse grupo morfológico, já tendo sido descrito em alguns casos de CA pelo mundo (BOOTON et al., 2005; RISLER et al., 2013; TAWFEEK et al., 2016). Já o genótipo T15, apesar de sua distribuição cosmopolita, é raramente associado a CA. Comumente isolado de ambientes aquáticos, aqui foi obtido de água de estuário (CORSARO et al., 2017; HEWETT et al., 2003; NAGYOVÁ et al., 2010b). E também foi identificado pela primeira vez no Brasil neste estudo.

Ao investigar as propriedades fisiológicas e o EC dos isolados, a única característica em comum entre eles foi o crescimento a 30 °C. Nenhuma concordância foi

encontrada entre parâmetros fisiológicos de resistência (tolerância a 40 °C e 1 M de manitol) e EC. Por exemplo, o isolado clínico Krt11.DSL, que causou EC total, não foi tolerante a 40 °C e a 1 M de manitol. Em contrapartida, alguns isolados que cresceram a 40 °C causaram EC fraco. Do mesmo modo, o isolado SoP3, que se desenvolveu a 1 M de manitol, não sobreviveu a 40 °C e nem causou EC. Além disso, não houve relação estatística entre tolerância a essas condições adversas (40 °C e 1 M de manitol) ou EC com a origem dos isolados (clínica ou ambiental).

Outros estudos mostram resultados semelhantes. De Jonckheere (1980) demonstrou que linhagens de *Acanthamoeba* não patogênicas *in vivo* podem ser termotolerantes; que cepas que não se desenvolvem a 40 °C causam EC e levam a óbito animais por EAG; e que nem sempre um EC proeminente está relacionado com a capacidade de um isolado causar infecção *in vivo*. No trabalho de Carlesso e outros (2014), isolados que não foram termo e osmotolerantes causaram EC significativo. E Hajjalilo e outros (2016) mostraram que somente quatro dentre 18 isolados clínicos de CA eram osmotolerantes. Vale lembrar que, de modo parecido, somente três dos 16 isolados clínicos analisados aqui se desenvolveram a 1 M de manitol.

Na verdade, todos os ensaios falham de alguma forma ao tentar estabelecer critérios rígidos determinantes da patogenicidade de *Acanthamoeba*. Por isso, ainda não existe um consenso na literatura quanto ao melhor teste para avaliar o potencial patogênico dessas amebas (MAGNET et al., 2014).

Apesar das inconsistências entre ensaios fisiológicos e EC neste trabalho, alguns padrões podem ser notados quando os resultados da osmotolerância são desconsiderados e os genótipos são analisados individualmente. Os isolados de genótipos T1 e T5, por exemplo, apresentaram crescimento alto a 40 °C e forte citopatogenicidade. A maioria das cepas T1 já descrita é proveniente de casos de EAG, o que permite supor ser este um genótipo resistente e virulento (AZZAM et al., 2015; KENT et al., 2011; NIYYATI et al., 2017). E é comum encontrar relatos de *Acanthamoeba* termofílica e com capacidade de causar EC pertencente ao grupo morfológico III/genótipo T5 (CARLESSO et al., 2014; FLINT et al., 2003; WALOCHNIK et al., 2000b). Assim, os resultados obtidos neste estudo corroboram

com os dados da literatura que afirmam terem esses genótipos tendência à patogenicidade.

O único isolado T15 (grupo III) deste trabalho apresentou resistência à axenização, o que impossibilitou a avaliação desse genótipo quanto à capacidade de causar EC, embora também tenha crescido muito a 40 °C. É interessante notar que diferentes autores já relataram dificuldade em axenizar isolados de *Acanthamoeba* pertencentes ao genótipo T15 (CABELLO-VÍLCHEZ et al., 2014; HEWETT et al., 2003; NAGYOVÁ et al., 2010b).

Sabe-se que cultivos prolongados de *Acanthamoeba* em meio axênico podem causar alterações em sua patogenicidade (KOEHSLER et al., 2008, 2009). No entanto, já foi demonstrado que cepas referência de *Acanthamoeba* (ATCC - *American Type Culture Collection* ou CCAP - *Culture Collection of Algae and Protozoa*) mantêm sua citopatogenicidade mesmo cultivadas axênicas por anos (KHAN et al., 2002; MAGLIANO et al., 2012; ROCHA-AZEVEDO; COSTA e SILVA-FILHO, 2007). Neste estudo, os isolados foram mantidos o menos tempo possível em PYG antes dos testes de EC (máximo de seis semanas). Portanto, é improvável que a habilidade dos isolados de causar EC tenha sido perdida devido ao cultivo axênico. Talvez, uma atenuação do potencial citopatogênico nesse período deva ser considerada, mas, mesmo em níveis mais baixos, o EC é um indicador da patogenicidade de *Acanthamoeba* e foi considerado nas análises aqui realizadas.

Outra consideração que deve ser feita é que algumas partes do corpo humano possuem temperatura média abaixo do normal, como é o caso do olho, cuja temperatura varia em torno de 34 °C (LORENZO-MORALES et al., 2015; WALOCHNIK et al., 2000b). Por isso, o fato de um isolado de *Acanthamoeba* ser intolerante a 37 °C, não exclui a possibilidade que ele seja potencialmente patogênico para a córnea, como aqui é o caso de P8II. No estudo de Hajjalilo e outros (2016), por exemplo, um isolado obtido de um caso de CA não cresceu a 37 °C. E também, amebas não resistentes às altas temperaturas da febre (≥ 39 °C) em casos de EAG, podem encistar e sobreviver até o restabelecimento da temperatura corporal, quando ocorre o desencistamento e casos de recorrência da infecção (GRIFFIN, 1972).

É importante destacar também a natureza multifatorial da patogenicidade de *Acanthamoeba*. Embora o presente trabalho tenha utilizado ensaios fisiológicos e de EC para caracterizar os isolados, outros fatores estão envolvidos na patogenia das doenças causadas por *Acanthamoeba* e devem ser considerados como indicativos do potencial patogênico. A habilidade de se ligar ao epitélio da córnea, por exemplo, que antecede o EC, é um importante mecanismo que regula a cascata patogênica dessas amebas (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; VAN KLINK et al., 1992). E o perfil de enzimas extracelulares produzidas pelos trofozoítos, como as proteases, facilita a invasão e degradação do estroma corneano, eventos estes que sucedem o EC (MAGLIANO et al., 2009; TAWFEEK et al., 2016).

Inicialmente se acreditava que a patogenicidade de *Acanthamoeba* estava restrita a poucos genótipos relacionados, como T3, T4 e T11 (BOOTON et al., 2005; STOTHARD et al., 1998; WALOCHNIK et al., 2000b). No entanto, muitos dados atuais corroboram com o fato de que genótipos filogeneticamente distantes entre si podem apresentar o mesmo perfil patogênico *in vitro* e causar doenças. Além disso, isolados pertencentes ao mesmo genótipo podem apresentar diferentes níveis de virulência, dificultando o estabelecimento de qualquer tipo de relação definitiva entre genótipo e patogenicidade (CARLESSO et al., 2014; MAGLIANO et al., 2012; NAGYOVÁ et al., 2010b). Dentre os 20 genótipos já descritos, somente T8, T13, T14, T17 e T19 ainda não foram associados às infecções causadas por *Acanthamoeba* no homem e outros animais (HAJIALILO et al., 2016; MACIVER et al., 2013; QVARNSTROM et al., 2013; TAWFEEK et al., 2016).

Neste contexto, se destacam os genótipos do grupo morfológico I (T7, T8, T9, T17 e T18) que, por muito tempo, foram considerados não patogênicos, pois nenhuma infecção causada por eles havia sido descrita (BOOTON et al., 2005; MACIVER et al., 2013; NUPRASERT et al., 2010). Além disso, estudos indicavam que não possuíam potencial patogênico *in vitro* (KILIC et al., 2004; LORENZO-MORALES et al., 2005; NUPRASERT et al., 2010). No entanto, trabalhos mais recentes mostram o contrário: isolados de genótipos T9 e T17 com características de virulência (MAGLIANO et al., 2012); Qvarnstrom e outros (2013) caracterizaram, pela primeira vez, um isolado do grupo I/genótipo T18 como o agente etiológico de um caso de EAG; e Tawfeek e outros (2016) e Hajialilo e outros (2016) isolaram, respectivamente, *Acanthamoeba* pertencente aos genótipos T7 e T9, também pela

primeira vez, em casos de CA. E isso incluiu o grupo I e seus genótipos na lista dos potenciais patógenos para o homem.

Neste estudo, o isolado Val1 (T18) cresceu a 40 °C e causou EC forte; e o isolado SoA1 (T17), embora não tenha sido tolerante a 40 °C, também causou considerável destruição da monocamada de células MDCK. Esses resultados confirmam que isolados do grupo I podem ser termotolerantes e possuir potencial citopatogênico.

Talvez, deva-se levar em consideração que todo isolado de *Acanthamoeba*, independente da origem e do grupo morfológico ou genótipo a que pertença, seja capaz de causar doenças. E que a instalação da infecção dependa, essencialmente, do tipo de estímulo dado a determinado tipo de cepa durante um contato ameba/hospedeiro específico. Como sugerido por Stothard e outros (1998), pode ser que a capacidade parasitária de *Acanthamoeba* tenha surgido como um evento único durante a evolução; e como reiterado por Walochnik e outros (2000b), pode ser que a virulência de muitas linhagens tenha sido perdida durante o percurso evolutivo do gênero.

7 CONCLUSÃO

Este estudo descreve a ocorrência de *Acanthamoeba* dos três grupos morfológicos e de oito genótipos em isolados clínicos e ambientais; e demonstra pela primeira vez os genótipos T1, T15 e T18 no Brasil.

Os ensaios de termotolerância, osmotolerância e de EC podem ser utilizados para caracterização *in vitro* de *Acanthamoeba*, mas eles não são necessariamente inter-relacionados; e alguns deles, em particular os testes fisiológicos de tolerância, podem não ser determinantes da capacidade de causar infecção. Ao considerar todos os ensaios utilizados neste trabalho, o EC foi o indicador mais robusto da patogenicidade de *Acanthamoeba*. De fato, o grande número de isolados de genótipos T4 e T5 com habilidade para causar EC condiz com o que comumente é encontrado na literatura sobre o potencial patogênico desses genótipos. Dentre os testes, a osmotolerância parece ser o parâmetro menos relacionado à capacidade de causar doença.

Os resultados aqui discutidos mostram que existem variações no comportamento de um mesmo isolado de *Acanthamoeba* aos testes de patogenicidade, o que comprova a dificuldade em correlacionar termotolerância, osmotolerância e EC, mesmo quando se tratam de isolados clínicos. Embora esses testes indiquem a existência de cepas mais resistentes ou mais virulentas que outras, a relevância dessas características no decurso de uma infecção causada por *Acanthamoeba* permanece incerta, não justificando a divisão do gênero em isolados patogênicos e não patogênicos de acordo com os resultados dos mesmos.¹

¹ Os resultados deste trabalho foram publicados na forma de artigo na revista *Parasitology Research* (ISSN 1432-1955) em 12 de março de 2018 (Qualis B1 em Medicina II) (ANEXO D).

REFERÊNCIAS

- ABED, G. H.; ELKABBANY, M. N.; MANDOUR, A. M.; MOHAMED, M. A. Morphopathological changes in rat brains after inoculation with *Naegleria* and *Acanthamoeba*. **Archives of Biological Sciences**, v.1, n. 2, p. 9-15, 2013.
- ALFIERI, S. C.; CORREIA, C. E.; MOTEGI, S. A.; PRAL, E. M. Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **The Journal of Parasitology**, v. 86, n. 2, p. 220-227, 2000.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- AZZAM, R.; BADENOCH, P. R.; FRANCIS, M. J.; FERNANDEZ, C.; ADAMSON, P. J.; DENDLE, C.; WOOLLEY, I.; ROBSON, J.; KORMAN, T. M.; GRAHAM, M. *Acanthamoeba* encephalitis: isolation of genotype T1 in mycobacterial liquid culture medium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 735-739, 2015.
- BADENOCH, P. R.; GRIMMOND, T. R.; CADWGANS, J.; DEAYTON, S. E.; ESSERY, M. S.; HILL, B. D. Nasal Carriage of Free-Living Amoebae. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 1, n. 3, p. 209-211, 1988.
- BEHERA, H. S.; SATPATHY, G.; TRIPATHI, M. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba* meningitis/meningoencephalitis (AME) patients in India. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 442, 2016.
- BLOCH, K. C.; SCHUSTER, F. L. Inability to make a premortem diagnosis of *Acanthamoeba* species infection in a patient with fatal granulomatous amebic encephalitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 3003–3006, 2005.
- BOOTON, G. C.; KELLY, D. J.; CHU, Y. W.; SEAL, D.V.; HOUANG, E.; LAM, D. S.; BYERS, T. J.; FUERST, P. A. 18S Ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1621-1625, 2002.
- BOOTON, G. C.; VISVESVARA, G. S.; BYERS, T. J.; KELLY, D. J.; FUERST, P. A. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1689-1693, 2005.
- CABELLO-VÍLCHEZ, A. M.; MARTÍN-NAVARRO, C. M.; LÓPEZ-ARENCIBIA, A.; REYESBATLLE, M.; GONZÁLEZ, A. C.; GUERRA, H.; GOTUZZO, E.; VALLADARES, B.; PIÑERO, J. E.; LORENZO-MORALES, J. Genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains isolated from nasal swabs of healthy individuals in Peru. **Acta Tropica**, v. 130, p. 7-10, 2014.

- CAO, Z.; JEFFERSON D. M.; PANJWANI N. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15838-15845, 1998.
- CARLESSO, A. M.; MENTZ, M. B.; DA MACHADO, M. L.; CARVALHO, A.; NUNES, T. E.; MASCHIO, V. J.; ROTT, M. B. Characterization of isolates of *Acanthamoeba* from the nasal mucosa and cutaneous lesions of dogs. **Current Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 702-707, 2014.
- CASTRILLÓN, J. F.; OROZCO, L. P. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. **Revista Chilena de Infectología**, v. 30, n. 2, p. 147-155, 2013.
- CHAGLA, A. H.; GRIFFITHS, A. J. Growth and Encystation of *Acanthamoeba castellanii*. **Journal of General Microbiology**, v. 85, p. 139-145, 1974.
- CHAN, L. L.; MAK, J. W.; LOW, Y. T.; KOH, T. T.; ITHOI, I.; MOHAMED, S. M. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 23-30, 2011.
- CHAPPELL, C. L.; WRIGHT, J. A.; COLETTA, M.; NEWSOME, A. L. Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 4, p. 724-730, 2001.
- CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; OMAÑA-MOLINA, M.; GONZÁLEZ-LÁZARO, M.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; BONILLA, P.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. Ultrastructural study of encystation and excystation in *Acanthamoeba castellanii*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 153–158, 2005.
- CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; SALAZAR-VILLATORO, L.; OMAÑA-MOLINA, M.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; RAMÍREZ-FLORES, E.; LORENZO-MORALES, J.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Acanthamoeba culbertsoni*: Electron-Dense Granules in a Highly Virulent Clinical Isolate. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 744-750, 2016.
- CHEW, H. F.; YILDIZ, E. H.; HAMMERSMITH, K. M.; EAGLE, R. C. Jr.; RAPUANO, C. J.; LAIBSON, P. R.; AYRES, B. D.; JIN, Y. P.; COHEN, E. J. Clinical outcomes and prognostic factors associated with *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea**, v. 30, n. 4, p. 435-441, 2011.
- CLARKE, D. W.; NIEDERKORN, J. Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 175-180, 2006.
- CORSARO, D.; KÖHSLER, M.; MONTALBANO DI FILIPPO, M.; VENDITTI, D.; MONNO, R.; DI CAVE, D.; BERRILLI, F.; WALOCHNIK, J. Update on *Acanthamoeba jacobsi* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. **Parasitology Research**, v. 116, n. 4, p. 1273-1284, 2017.

CORSARO, D.; WALOCHNIK, J.; KÖHSLER, M.; ROTT, M. B. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19 and T20, and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). **Parasitology Research**, v. 114, n. 7, p. 2481-2490, 2015.

COSTA, A. O.; CASTRO, E. A.; FERREIRA, G. A.; FURST, C.; CROZETA, M. A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Characterization of *Acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 70-75, 2010.

COSTA, A. O.; FURST, C.; ROCHA, L. O.; CIRELLI, C.; CARDOSO, C. N.; NEIVA, F. S.; POSSAMAI, C. O.; DE ASSIS SANTOS, D.; THOMAZ-SOCCOL, V. Molecular diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis: evaluation in rat model and application in suspected human cases. **Parasitology Research**, v. 116, n. 4, p. 1339-1344, 2017.

CURSONS, R. T.; BROWN, T. J. Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, n. 1, p. 1-11, 1978.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DE JONCKHEERE, J. F. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 681-685, 1980.

DI CAVE, D.; MONNO, R.; BOTTALICO, P.; GUERRIERO, S.; D'AMELIO, S.; D'ORAZI, C.; BERRILLI, F. *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, n. 6, p. 607-612, 2009.

DUARTE, J. L.; FURST, C.; KLISIEWICZ, D. R.; KLASSEN, G.; COSTA, A. O. Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 9-14, 2013.

DUARTE, A. G.; SATTAR, F.; GRANWEHR, B.; ARONSON, J. F.; WANG, Z.; LICK, S. Disseminated acanthamoebiasis after lung transplantation. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 25, n. 2, p. 237-240, 2006.

FLINT, J. A.; DOBSON, P. J.; ROBINSON, B. S. Genetic analysis of forty isolates of *Acanthamoeba* group III by multilocus isoenzyme electrophoresis. **Acta Protozoologica**, v. 42, p. 317-324, 2003.

FOUQUE, E.; TROUILHÉ, M.; THOMAS, V.; HARTEMANN, P.; RODIER, M.; HÉCHARDA, Y. Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 4, p. 392-387, 2012.

FUERST, P. A. Insights from the DNA databases: approaches to the phylogenetic structure of *Acanthamoeba*. **Experimental Parasitology**, v. 145, p. 39-45, 2014.

FUERST, P. A.; BOOTON, G. C.; CRARY, M. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 69-84, 2015.

GARATE, M.; CAO, Z.; BATEMAN, E.; PANJWANI, N. Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 28, p. 29849-29856, 2004.

GARATE, M.; CUBILLOS, I.; MARCHANT, J.; PANJWANI, N. Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5775-5781, 2005.

GARATE, M.; MARCHANT, J.; CUBILLOS, I.; CAO, Z.; KHAN, N. A.; PANJWANI, N. In vitro pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 3, p. 1056-1062, 2006.

GAST, R. J.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. Discovery of group I introns in the nuclear small subunit ribosomal RNA genes of *Acanthamoeba*. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 4, p. 592-596, 1994.

GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 498-504, 1996.

GATTI, S.; RAMA, P.; MATUSKA, S.; BERRILLI, F.; CAVALLERO, A.; CARLETTI, S.; BRUNO, A.; MASERATI, R.; DI CAVE, D. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from corneal infections in Italy. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 1324-1330, 2010.

GONZÁLEZ-ROBLES, A.; GONZÁLEZ-LÁZARO, M.; OMAÑA-MOLINA, M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Acanthamoeba castellanii*: Endocytic Structures Involved in the Ingestion of Diverse Target Elements. **Acta Protozoologica**, v. 48, n. 4, p. 327-332, 2009.

GONZÁLEZ-ROBLES, A.; SALAZAR-VILLATORO, L.; OMAÑA-MOLINA, M.; REYES-BATLLE, M.; MARTÍN-NAVARRO, C. M.; LORENZO-MORALES, J. Morphological Features and In Vitro Cytopathic Effect of *Acanthamoeba griffini* Trophozoites Isolated from a Clinical Case. **Journal of Parasitology Research**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

GRIFFIN, J. L. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. **Science**, v. 178, n. 4063, p. 869-870, 1972.

HAJIALILO, E.; BEHNIA, M.; TARIGHI, F.; NIYYATI, M.; REZAEIAN, M. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains (T4, T9, and T11) from amoebic keratitis patients in Iran. **Parasitology Research**, v. 115, n. 8, p. 3147-3151, 2016.

HEWETT, M. K.; ROBINSON, B. S.; MONIS, P. T.; SAINT, C. P. Identification of a New *Acanthamoeba* 18S rRNA Gene Sequence Type, Corresponding to the Species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). **Acta Protozoologica**, v. 42, p. 325-329, 2003.

JAISON, P. L.; CAO, Z.; PANJWANI, N. Binding of *Acanthamoeba* to [corrected] mannose-glycoproteins of corneal epithelium: effect of injury. **Current Eye Research**, v. 17, n. 8, p. 770-776, 1998.

JOB, G.; VON HAESLER, A.; STRIMMER, K. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, p. 18, 2004.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 108, p. 1-7, 2017.

KENT, M.; PLATT, S. R.; RECH, R. R.; EAGLESON, J. S.; HOWERTH, E. W.; SHOFF, M.; FUERST, P. A.; BOOTON, G.; VISVESVARA, G. S.; SCHATZBERG, S. J. Multisystemic infection with an *Acanthamoeba* sp in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 238, n. 11, p. 1476-1481, 2011.

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

KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Current Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 204-208, 2001.

KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. **Current Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 197-202, 2002.

KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PANJWANI, N.; CAO, Z.; PAGET, T. A. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2858-2861, 2000.

KILIC, A.; TANYUKSEL, M.; SISSONS, J.; JAYASEKERA, S.; KHAN, N. A. Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. **Acta Parasitologica**, v. 49, n. 3, p. 246-252, 2004.

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

KÖHSLER, M.; LEITSCH, D.; FÜRNRANZ, U.; DUCHÊNE, M.; ASPÖCK, H.; WALOCHNIK, J. *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 1069-1072, 2008.

LACKNER, P.; BEER, R.; BROESSNER, G.; HELBOK, R.; PFAUSLER, B.; BRENNEIS, C.; AUER, H.; WALOCHNIK, J.; SCHMUTZHARD, E. Acute granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis in an immunocompetent patient. **Neurocritical Care**, v. 12, n. 1, p. 91-94, 2010.

LALITHA, P.; LIN, C. C.; SRINIVASAN, M.; MASCARENHAS, J.; PRAJNA, N. V.; KEENAN, J. D.; MCLEOD, S. D.; ACHARYA, N. R.; LIETMAN, T. M.; PORCO, T. C. *Acanthamoeba* keratitis in South India: a longitudinal analysis of epidemics. **Ophthalmic Epidemiology**, v. 19, n. 2, p. 111-115, 2012.

LEHER, H.; SILVANY, R.; ALIZADEH, H.; HUANG, J.; NIEDERKORN, J. Y. Mannose Induces the Release of Cytopathic Factors from *Acanthamoeba castellanii*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 1, p. 5-10, 1998.

LEHER, H.; ZARAGOZA, F.; TAHERZADEH, S.; ALIZADEH, H.; NIEDERKORN, J. Y. Monoclonal IgA antibodies protect against *Acanthamoeba* keratitis. **Experimental Eye Research**, v. 69, n. 1, p. 75-84, 1999.

LLOYD, D.; MELLOR, H.; WILLIAMS, J. L. Oxygen affinity of the respiratory chain of *Acanthamoeba castellanii*. **The Biochemical Journal**, v. 214, n. 1, p. 47-51, 1983.

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, v. 22, n. 10, p. 1-19, 2015.

LORENZO-MORALES, J.; LINDO, J. F.; MARTINEZ, E.; CALDER, D.; FIGUERUELO, E.; VALLADARES, B.; ORTEGA-RIVAS A. Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 99, n. 8, p. 751-758, 2005.

LORENZO-MORALES, J.; MARTÍN-NAVARRO, C. M.; LÓPEZ-ARENCIBIA, A.; ARNALICH-MONTIEL, F.; PIÑERO, J. E.; VALLADARES, B. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 181-187, 2013.

MACIVER, S. K.; ASIF, M.; SIMMEN, M. W.; LORENZO-MORALES, J. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. **European Journal of Protistology**, v. 49, n. 2, p. 217-221, 2013.

MAGLIANO, A. C.; DA SILVA, F. M.; TEIXEIRA, M. M.; ALFIERI, S. C. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 3, p. 231-235, 2009.

MAGLIANO A. C.; TEIXEIRA, M. M.; ALFIERI, S. C. Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): characterization of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences. **Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 45-52, 2012.

MAGNET, A.; HENRIQUES-GIL, N.; GALVÁN-DIAZ, A. L.; IZQUIEDO, F.; FENOY, S.; DEL AGUILA, C. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. **Parasitology Research**, v. 113, n. 8, p. 2845-2850, 2014.

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

MARTÍN-PÉREZ, T.; CRIADO-FORNELIO, A.; MARTÍNEZ, J.; BLANCO, M. A.; FUENTES, I.; PÉREZ-SERRANO, J. Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in Spain. **European Journal of Protistology**, v. 61, p. 244-252, 2017.

MASCARENHAS, J.; LALITHA, P.; PRAJNA, N. V.; SRINIVASAN, M.; DAS, M.; D'SILVA, S. S.; OLDENBURG, C. E.; BORKAR, D. S.; ESTERBERG, E. J.; LIETMAN, T. M.; KEENAN, J. D. *Acanthamoeba*, fungal, and bacterial keratitis: a comparison of risk factors and clinical features. **American Journal of Ophthalmology**, v. 157, n. 1, p. 56-62, 2014.

MAYROSE, I.; FRIEDMAN, N.; PUPKO, T. A gamma mixture model better accounts for among site rate heterogeneity. **Bioinformatics**, v. 21, p. 151-158, 2005.

MITRO, K.; BHAGAVATHIAMMAI, A.; ZHOU, O. M.; BOBBETT, G.; MCKERROW, J. H.; CHOKSHI, R.; CHOKSHI, B.; JAMES, E. R. Partial characterization of the proteolytic secretions of *Acanthamoeba polyphaga*. **Experimental Parasitology**, v. 78, n. 4, p. 377-385, 1994.

NAGYOVÁ, V.; NAGY, A.; JANECEK, S.; TIMKO, J. Morphological, physiological, molecular and phylogenetic characterization of new environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from the region of Bratislava, Slovakia. **Biologia**, v. 65, n. 1, p. 81-91, 2010a.

NAGYOVÁ, V.; NAGY, A.; TIMKO, J. Morphological, physiological and molecular biological characterisation of isolates from first cases of *Acanthamoeba* keratitis in Slovakia. **Parasitology Research**, v. 106, n. 4, p. 861-872, 2010b.

NEELAM, S.; NIEDERKORN, J. Y. Pathobiology and Immunobiology of *Acanthamoeba* Keratitis: Insights from Animal Models. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 2, p. 261-268, 2017.

NIYYATI, M.; ARAB-MAZAR, Z.; LASJERDI, Z.; LORENZO-MORALES, J.; ESPOTIN, A.; YADEGARYNIA, D.; GACHKAR, L.; RAHMATI ROODSARI, S. Molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from the oral cavity of hemodialysis patients in Iran. **Parasitology Research**, v. 116, n. 11, p. 2965-2969, 2017.

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

OMAHÑA-MOLINA, M.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; SALAZAR-VILLATORO, L. I.; LORENZO-MORALES, J.; CRISTÓBAL-RAMOS, A. R.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, V. I.; TALAMÁS-ROHANA, P.; MÉNDEZ-CRUZ, A. R.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. Reevaluating the role of *Acanthamoeba* proteases in tissue invasion: observation of cytopathogenic mechanisms on MDCK cell monolayers and hamster corneal cells. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

PAGE, F. C. A new key to freshwater and soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside, 1988.

PAGE, F. C. Marine Gymnamoebae (Culture Centre of Algae and Protozoa). England: Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge, 1983.

PANJWANI, N.; ZHAO, Z.; BAUM, J.; HAZLETT, L. D.; YANG, Z. *Acanthamoeba* bind to rabbit corneal epithelium in vitro. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, n. 9, p. 1858-64, 1997.

PRESTON, T.M.; RICHARDS, H.; WOTTON, R.S. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. **FEMS Microbiology Letters**, v. 194, n. 2, p.143-147, 2001.

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

QVARNSTROM, Y.; NERAD, T. A.; VISVESVARA, G. S. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 626-633, 2013.

RADFORD, C. F.; MINASSIAN, D. C.; DART, J. K. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 86, n. 5, p. 536-542, 2002.

RISLER, A.; COUPAT-GOUTALAND, B.; PÉLANDAKIS, M. Genotyping and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* isolates associated with keratitis. **Parasitology Research**, v. 112, n. 11, p. 3807-3816, 2013.

ROCHA-AZEVEDO, B. DA; COSTA e SILVA-FILHO, F. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. **Archives of Microbiology**, v. 188, n. 5, p. 441-449, 2007.

ROCHA-AZEVEDO, B. DA; TANOWITZ, H. B.; MARCIANO-CABRAL, F. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, p. 1-14, 2009.

SALAMEH, A.; BELLO, N.; BECKER, J.; ZANGENEH, T. Fatal Granulomatous Amoebic Encephalitis Caused by *Acanthamoeba* in a Patient With Kidney Transplant: A Case Report. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 1-4, 2015.

SCHROEDER, J. M.; BOOTON, G. C.; HAY, J.; NISZL, I. A.; SEAL, D. V.; MARKUS, M. B.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1903-1911, 2001.

SCHROEDER-DIEDRICH, J. M.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. Group-I introns with unusual sequences occur at three sites in nuclear 18S rRNA genes of *Acanthamoeba lenticulata*. **Current Genetics**, v. 34, n. 1, p. 71-78, 1998.

SCHUSTER, F. L. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 342-354, 2002.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 9, p. 1001-1027, 2004.

SEAL, D. V. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. **Eye (London, England)**, v. 17, n.8, p. 893-905, 2003.

SEIJO MARTINEZ, M.; GONZALEZ-MEDIERO, G.; SANTIAGO, P.; RODRIGUEZ De LOPE, A.; DIZ, J.; CONDE, C.; VIVESVARA, G. S. Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3892-3895, 2000.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 6, p. 1-13, 2012.

SMITH, S. N.; KHAN, J. A.; ARMSTRONG, R. A.; MOHINDRU, B.; PRINCE, M.; WHIPPS, J. M. *Acanthamoeba polyphaga* trophozoite binding of representative fungal single cell forms. **Acta Protozoologica**, v. 49, n.4, p. 289-300, 2010.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2688-2690, 2006.

STOTHARD, D. R.; SCHROEDER-DIEDRICH, J. M.; AWWAD, M. H.; GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S.; DEAN, C. L.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 45-54, 1998.

STRATFORD, M. P.; GRIFFITHS, A. J. Variations in the Properties and Morphology of Cysts of *Acanthamoeba castellanii*. **Journal of General Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 33-37, 1978.

TAKAOKA-SUGIHARA, N.; YAMAGAMI, S.; YOKOO, S.; MATSUBARA, M.; YAGITA, K. Cytopathic effect of *Acanthamoeba* on human corneal fibroblasts. **Molecular Vision**, v. 2012, n. 18, p. 2221-2228, 2012.

TAWFEEK, G. M.; BISHARA, S. A.; SARHAN, R. M.; TAHER, E. E.; KHAYYAL, A. E. Genotypic, physiological, and biochemical characterization of potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from the environment in Cairo, Egypt. **Parasitology Research**, v. 115, n. 5, p. 1871-1881, 2016.

VAN KLINK, F.; ALIZADEH, H.; STEWART, G. L.; PIDHERNEY, M. S.; SILVANY, R. E.; HE, Y.; MCCULLEY, J. P.; NIEDERKORN, J. Y. Characterization and pathogenic potential of a soil isolate and an ocular isolate of *Acanthamoeba castellanii* in relation to *Acanthamoeba* keratitis. **Current Eye Research**, v. 11, n. 12, p. 1207-1220, 1992.

VIANNA, E. N.; COSTA, J. O.; SANTOS, C. K.; CURY, M. C.; SILVA, E. F.; COSTA, A. O.; GOMES, M. A. An alternative method for DNA extraction and PCR identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in fecal samples. **Parasitology**, v. 136, n. 7, p. 765-769, 2009.

VISVESVARA, G. S. Free-Living Amebae as Opportunistic Agents of Human Disease. **Journal of Neuroparasitology**, v. 1, p. 1-13, 2010.

VISVESVARA, G. S.; BOOTON, G. C.; KELLEY, D. J.; FUERST, P.; SRIRAM, R.; FINKELSTEIN, A.; GARNER, M. M. In vitro culture, serologic and molecular analysis of *Acanthamoeba* isolated from the liver of a keel-billed toucan (*Ramphastos sulfuratus*). **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 74-78, 2007a.

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

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

WALOCHNIK, J.; AICHELBURG, A.; ASSADIAN, O.; STEUER, A.; VISVESVARA, G.; VETTER, N.; ASPÖCK, H. Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 338-340, 2008.

WALOCHNIK, J.; HALLER-SCHOBER, E. M.; KOLLI, H.; PICHER, O.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens-wearing keratitis patients in Austria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 3932-3936, 2000a.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlation between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4408-4413, 2000b.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; HALLER-SCHOBER, E. M.; ASPÖCK, H. Anti-*Acanthamoeba* IgG, IgM, and IgA immunoreactivities in correlation to strain pathogenicity. **Parasitology Research**, v. 87, n. 8, p. 651-656, 2001.

WALOCHNIK, J.; SCHEIKL, U.; HALLER-SCHÖBER, E. M. Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n.1, p. 3-11, 2015.

YAMAZOE, K.; YAMAMOTO, Y.; SHIMAZAKI-DEN, S.; SHIMAZAKI, J. Visual outcome in Japanese patients with *Acanthamoeba* keratitis. **Eye (London, England)**, v. 26, n. 4, p. 517-522, 2012.

YANG, Z.; CAO, Z.; PANJWANI, N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: carbohydrate-mediated host-parasite interactions. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 439-445, 1997.

ZAMORA, A.; HENDERSON, H.; SWIATLO, E. *Acanthamoeba* encephalitis: A Case Report and Review of Therapy. **Surgical Neurology International**, v. 5, p. 68, 2014.

ZHONG, J.; LI, X.; DENG, Y.; CHEN, L.; ZHOU, S.; HUANG, W.; LIN, S.; YUAN, J. Associated factors, diagnosis and management of *Acanthamoeba* keratitis in a referral Center in Southern China. **BMC Ophthalmology**, v. 17, n. 175, p. 1-8, 2017.

ANEXOS

ANEXO A - Meios de cultivo e soluções

Quadro 1 - Protocolo de preparação do meio ágar soja a 0,2%, utilizado para isolamento e clonagem de *Acanthamoeba*.

REAGENTES	QUANTIDADE
Farinha de soja	2,0 g
Ágar bacteriológico	15,0 g
Água destilada q.s.p	1000 mL
<p>Preparo:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Deixar a farinha de soja em infusão por 24 horas na água destilada; 2) Filtrar a solução em papel de filtro; 3) Acrescentar o ágar bacteriológico; 4) Autoclavar o meio a 121°C por 15 minutos; 5) Distribuí-lo, ainda quente, em placas de Petri estéreis; 6) Após resfriamento e solidificação, selar as placas com plástico PVC e armazená-las em geladeira (2-8°C). 	

Fonte: COSTA et al.; 2010.

Quadro 2 - Protocolo de preparação do meio ágar MacConkey, utilizado para cultivo de *E. coli*.

REAGENTES	QUANTIDADE
Ágar MacConkey	50 g
Água destilada q.s.p	1.000 mL
<p>Preparo:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Misturar o ágar à água destilada; 2) Autoclavar o meio a 121°C por 15 minutos; 3) Distribuí-lo, ainda quente, em placas de Petri estéreis; 4) Após resfriamento e solidificação, selar as placas com plástico PVC e armazená-las em geladeira (2-8°C). 	

Quadro 3 - Protocolo de preparação da solução de *E. coli* inativada pelo calor, utilizada como substrato alimentar para *Acanthamoeba*.

REAGENTES	QUANTIDADE
<i>E. coli</i> em ágar MacConkey	1 placa
Salina de Page q.s.p	50 mL
<p>Preparo:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Adicionar salina à placa; 2) Suspender as colônias de <i>E. coli</i> com alça de drigalski; 3) Distribuir a solução em alíquotas; 4) Levar em banho-maria a 62 °C por 2 horas; 5) Armazenar em congelador (-20 °C). 	

Quadro 4 - Protocolo de preparação de salina de Page, utilizada para repiques, clonagem, axenização e extração de DNA de isolados de *Acanthamoeba*.

REAGENTES (solução estoque 10 ×)	QUANTIDADE (em 100 mL de água destilada)
Cloreto de sódio (NaCl)	1,20 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ × 7 H ₂ O)	0,04 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ × 2H ₂ O)	0,04 g
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	1,42 g
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	1,36 g
Água destilada q.s.p	950 mL
<p>Preparo:</p> <p>1) Adicionar 10 mL de cada solução estoque à água destilada;</p> <p>2) Autoclavar a solução a 121°C por 15 minutos;</p> <p>3) Distribuir a salina em alíquotas e armazenar em geladeira (2-8°C).</p>	

Fonte: PAGE, 1988.

Quadro 5 - Protocolo de preparação do meio PYG, utilizado para axenização de isolados de *Acanthamoeba*.

REAGENTES	QUANTIDADE
Proteose peptona	20 g
Extrato de levedo	2 g
Glicose	9 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,75 g
Citrato de sódio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ × 2 H ₂ O)	1 g
Sulfato ferroso amoniacal (Fe(NH ₄) ² (SO ₄) ² × 6 H ₂ O)	0,02 g
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,34 g
Fosfato de sódio bibásico (Na ₂ HPO ₄ × 7H ₂ O)	0,4 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ × 2H ₂ O)	0,08 g
Água destilada q.s.p	1.000 mL
<p>Preparo:</p> <p>1) Dissolver primeiramente todos os sais na água destilada;</p> <p>2) Adicionar os outros reagentes e homogeneizar;</p> <p>3) Ajustar o pH para 6,5 (± 0,2);</p> <p>4) Autoclavar o meio a 121°C por 15 minutos;</p> <p>5) Distribuir o meio em alíquotas e armazenar em geladeira (2-8°C).</p>	

Fonte: modificado de ALFIERI et al.; 2000.

Quadro 6 - Protocolo de preparação do meio ágar NN, utilizado para ensaios fisiológicos com isolados de *Acanthamoeba*.

REAGENTES	QUANTIDADE
Ágar bacteriológico	15,0 g
Salina de Page q.s.p	1.000 mL
<p>Preparo:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Misturar o ágar na salina; 2) Autoclavar o meio a 121°C por 15 minutos; 3) Distribuí-lo, ainda quente, em placas de Petri estéreis; 4) Após resfriamento e solidificação, selar as placas com plástico PVC e armazená-las em geladeira (2-8°C). 	

Fonte: PAGE, 1988.

Quadro 7 - Protocolo de preparação do meio DMEM, utilizado para cultivo de células MDCK.

REAGENTES	QUANTIDADE
DMEM em pó de baixa glicose	10 g (1 g de glicose e 1 g de L-glutamina)
Bicarbonato de sódio	3,7 g
Soro bovino fetal	100 mL (10%)
Antibiótico PSA	1 mL (1%)
Água destilada autoclavada q.s.p	1.000 mL
<p>Preparo:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Misturar todos os reagentes na água destilada; 2) Ajustar o pH para 7,3; 3) Esterilizar o meio em membrana de filtro (0,22 µM de porosidade); 4) Distribuir o meio em alíquotas e armazenar em congelador (-20 °C). 	

Quadro 8 - Protocolo de preparação de PBS, utilizado nos ensaios de efeito citopático.

REAGENTES	QUANTIDADE
Cloreto de sódio (NaCl)	8,4 g
Fosfato de sódio bibásico (Na ₂ HPO ₄)	1,5 g
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,6 g
Água destilada q.s.p	1.000 mL
<p>Preparo:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Misturar todos os reagentes na água destilada; 2) Ajustar o pH para 7,2; 3) Autoclavar a solução a 121°C por 15 minutos; 4) Distribuir a salina em alíquotas e armazenar em geladeira (2-8°C). 	

ANEXO B - Protocolo de extração de DNA pela técnica de lise alcalina

- 1)** Adicionar 200 µL de tampão de lise (glicose a 50 mM, Tris HCl a 25 mM-pH 8, EDTA a 10mM) ao tubo com a amostra a ser extraída;
- 2)** Homogeneizar e incubar à temperatura ambiente por 5 minutos;
- 3)** Adicionar 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) e homogeneizar;
- 4)** Incubar em banho-maria a 55°C por 90 minutos;
- 5)** Acrescentar 400 µL de NaOH a 0,2 M com 1% de SDS e homogeneizar;
- 6)** Congelar em freezer - 80 °C e descongelar em banho-maria a 99 °C três vezes;
- 7)** Incubar em gelo por 5 minutos;
- 8)** Adicionar 300 µL de acetato de amônio a 7,5 M;
- 9)** Homogeneizar vigorosamente e incubar em gelo por 20 minutos;
- 10)** Centrifugar a 6.000 xg por 5 minutos;
- 11)** Transferir até 700 µL do sobrenadante para um novo tubo;
- 12)** Adicionar 600 µL de isopropanol;
- 13)** Incubar em freezer durante 15 minutos;
- 14)** Centrifugar a 6.000 xg por 15 minutos e descartar o sobrenadante;
- 15)** Adicionar 500 µL de etanol a 70%;
- 16)** Centrifugar a 6.000 xg por 5 minutos e descartar o etanol;
- 17)** Deixar o tubo aberto e invertido à temperatura ambiente;
- 18)** Após secagem, adicionar 50 µL de tampão TE (Tris HCl a 10 mM, EDTA a 1 mM);
- 19)** Armazenar o produto da extração a - 20 °C.

Fonte: modificado de COSTA et al., 2017; VIANNA et al., 2009.

ANEXO C - Protocolos do sequenciamento

Protocolo de purificação de produto de PCR com *ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup* (Affymetrix®)

- 1) Adicionar 10 µL do produto de PCR em cada poço da placa de sequenciamento;
- 2) Adicionar 1 µL de *ExoSAP* diluído na proporção *ExoSAP*/água-ultra pura esterilizada de 1:4;
- 3) Levar ao termociclador a 37 °C por 30 minutos, seguidos de 15 minutos a 80 °C;
- 4) Armazenar as amostras purificadas à 4 °C até a reação de sequenciamento.

Protocolo de reação de sequenciamento com o *kit BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems®)

REAGENTES	QUANTIDADE
Água ultra-pura	4 µL
Tampão 5 ×	3,7 µL
Primer ^a (5µM)	1,0 µL
<i>Big Dye</i>	0,3 µL
DNA ^b	1µL
Volume total	10 µL
Condições da reação: 96 °C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos a 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e uma extensão final a 60 °C por 4 minutos.	

^a Para cada primer é realizada uma reação.

^b 40 ng de DNA molde purificado.

Protocolo de precipitação com EDTA/NaOAc/Etanol

- 1) Adicionar 1 µL de EDTA a 125 mM e passar no *vortex* gentilmente;
- 2) Adicionar 1 µL de acetato de sódio a 3 M e passar no *vortex* gentilmente;
- 3) Adicionar 32 µL de etanol a 95%, passar no *vortex* gentilmente e dar um *spin down*;
- 4) Deixar à temperatura ambiente por 15 minutos;
- 5) Centrifugar a 2.500 xg por 30 minutos;
- 6) Imediatamente após a centrifugação, inverter a placa rapidamente e de uma única vez, para descartar o sobrenadante;
- 7) Centrifugar a 185 xg por 1 minuto;
- 8) Adicionar 35 µL de etanol a 70% e passar no *vortex* gentilmente;

- 9) Centrifugar a 2.500 xg por 15 minutos;
- 10) Repetir os itens 6 e 7;
- 11) Após secagem, guardar a placa envolta em papel alumínio a - 20 °C por, no máximo, um mês.

ANEXO D - Artigo publicado na revista *Parasitology Research* (ISSN 1432-1955)

