



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

BRENDA TEIXEIRA SCARDINI MARINHO

**Isolamento e caracterização de amebas de vida livre no Arroio
Dilúvio e Lago Guaíba em Porto Alegre - RS**

PORTO ALEGRE

2022

BRENDA TEIXEIRA SCARDINI MARINHO

**Isolamento e caracterização de amebas de vida livre no Arroio
Dilúvio e Lago Guaíba em Porto Alegre - RS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marilise Brittes Rott

PORTO ALEGRE

2022

Aos meus pais.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE NO ARROIO DILÚVIO E LAGO GUAÍBA EM PORTO ALEGRE - RS¹

Autora: Brenda Teixeira Scardini Marinho

Orientadora: Prof.^a Dra. Marilise Brittes Rott

RESUMO

Amebas de vida livre (AVL) são microrganismos amplamente dispersos no ambiente e são responsáveis por diferentes infecções ocasionadas ao ser humano e a outros animais. Gêneros como *Acanthamoeba* spp., e as espécies *Vermamoeba vermiformis*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata* e *Paravahlkampfia francinae* n. sp. são potencialmente patogênicas e estão associadas a doenças que afetam o sistema nervoso central, além de infecções na pele e ceratite como ocorre no gênero *Acanthamoeba*. Estas amebas podem ser encontradas na água, solo e ar, onde se nutrem de pequenas partículas orgânicas, além de bactérias, fungos e até protozoários. Os microrganismos ingeridos podem resistir à fagocitose e se tornarem resistentes às amebas que poderão servir como seus hospedeiros. Dada a relevância da problematização das AVL em ambientes aquáticos antropogênicos, este trabalho objetivou o isolamento, a identificação e a caracterização desses microrganismos presentes em dois cursos hídricos em Porto Alegre, RS. Amostras de 1L foram coletadas em Janeiro de 2022 e inoculadas em placas de ágar não-nutriente contendo *Escherichia coli* inativada pelo calor. O crescimento das amebas foi acompanhado ao longo de 15 dias e tiveram a sua morfologia caracterizada. Os resultados de PCR indicaram a presença de AVL dos gêneros *Acanthamoeba*, *Vermamoeba* e *Naegleria* nas áreas do estudo. O sequenciamento genético indicou um grupo de amebas como sendo de *Vermamoeba vermiformis* e o outro de *Naegleria gruberi*. Esses ambientes aquáticos e antropogênicos podem servir como meio de veiculação e contaminação por AVL, o que levanta um alerta quanto à saúde pública da cidade.

Palavras-chave: *Naegleria gruberi*, *Vermamoeba vermiformis*, Teste de exflagelação, Análise de patogenicidade.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS - Brasil - Dezembro, 2022.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FREE-LIVING AMOEBAE IN DILUVIO STREAM AND GUAIBA LAKE IN PORTO ALEGRE - RS¹

Author: Brenda Teixeira Scardini Marinho

Supervisor: Prof. Dr. Marilise Brittes Rott

RESUME

Free-living amoebae (FLA) are microorganisms widely dispersed in the environment and are responsible for different infections caused to humans and other animals. Genus such as *Acanthamoeba* spp., and the species *Vermamoeba vermiformis*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata* and *Paravahlkampfia francinae* n. sp. are potentially pathogenic and are associated with diseases that affect the central nervous system, in addition to skin infections and keratitis, as occurs in the genus *Acanthamoeba*. These amoebae can be found in water, soil and air, where they feed on small organic particles, as well as bacteria, fungi and even protozoa. Ingested microorganisms can resist phagocytosis and become resistant to amoebae that may serve as their hosts. Given the relevance of problematizing FLA in anthropogenic aquatic environments, this work aimed to isolate, identify and characterize these microorganisms present in two watercourses in Porto Alegre, RS. 1L samples were collected in January 2022 and inoculated onto non-nutrient agar plates containing heat-inactivated *Escherichia coli*. The growth of the amoebae was monitored over 15 days and their morphology was characterized. PCR results indicated the presence of FLA of the genera *Acanthamoeba*, *Vermamoeba* and *Naegleria* in the study areas. Genetic sequencing indicated one group of amoebae as *Vermamoeba vermiformis* and the other as *Naegleria gruberi*. These aquatic and anthropogenic environments can serve as a means of transmission and contamination by FLA, which raises an alert regarding public health in the city.

Keywords: *Naegleria gruberi*, *Vermamoeba vermiformis*, Exflagellation test, Pathogenicity analysis.

¹ Master's Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS - Brazil - December, 2022.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pontos de amostragem do Arroio Dilúvio	23
Figura 2. Pontos de amostragem no Lago Guaíba	24
Figura 3. Método de Diehl, Paes & Rott (2021) utilizado	26
Figura 4. Variação das temperaturas anual de Porto Alegre - RS	31
Figura 5. Precipitação média anual de Porto Alegre - RS	32
Figura 6. Placas das etapas iniciais de isolamento contendo outros microrganismos	33
Figura 7. Cultura de AVL monoxênica do Lago Guaíba no ponto 7	33
Figura 8. Clone B do ponto 3 do Arroio Dilúvio	34
Figura 9. Micrometria do clone C do ponto 7 do Arroio Dilúvio	35
Figura 10. Clone B do ponto 6 do Lago Guaíba, positivo para <i>Vermamoeba</i> sp.	43
Figura 11. Trofozoíto do clone positivo para <i>Naegleria</i> spp.	47
Figura 12. Morfologia dos cistos do clone B do ponto 5 do Arroio Dilúvio, positivo para <i>Acanthamoeba</i> spp.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos específicos utilizados	30
Tabela 2. Caracterização morfológica dos clones do Arroio Dilúvio	36
Tabela 3. Caracterização morfológica dos clones do Lago Guaíba	37
Tabela 4. Patogenicidade dos clones do Arroio Dilúvio	40
Tabela 5. Patogenicidade dos clones do Lago Guaíba	41
Tabela 6. Resultado do PCR dos clones do Arroio Dilúvio	45
Tabela 7. Resultado do PCR dos clones do Lago Guaíba	46
Tabela 8. Análise da identidade dos clones	49
Tabela 9. Registros dos depósitos no GenBank	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Histórico	13
3.2 Aspectos biológicos e morfologia das espécies	14
3.2.1 <i>Taxonomia e classificação das AVL</i>	14
3.2.2 <i>Acanthamoeba spp.</i>	15
3.2.3 <i>Naegleria spp.</i>	16
3.2.4 <i>Balamuthia spp.</i>	17
3.2.5 <i>Vermamoeba spp.</i>	17
3.2.6 <i>Sappinia spp.</i>	18
3.2.7 <i>Paravahlkampfia francinae n. sp.</i>	19
3.3 Doenças causadas por amebas de vida livre	19
3.3.1 <i>Encefalite amebiana granulomatosa</i>	19
3.3.2 <i>Ceratite amebiana</i>	20
3.3.3 <i>Meningoencefalite Amebiana Primária</i>	20
3.4 Relação de endossimbiose	21
4. METODOLOGIA	22
4.1 Local de desenvolvimento do projeto	22
4.2 Área de Estudo	22
4.3 Coletas	22
4.3.1 <i>Arroio Dilúvio</i>	23
4.3.2 <i>Lago Guaíba</i>	24

4.4	Processamento das amostras	25
4.4.1	<i>Preparação das amostras e inoculação</i>	25
4.4.2	<i>Crescimento amebiano e obtenção das culturas monoxênicas</i>	25
4.4.3	<i>Clonagem dos isolados monoxênicos</i>	25
4.5	Identificação morfológica dos clones	27
4.5.1	<i>Caracterização morfológica</i>	27
4.5.2	<i>Emissão de flagelos de Naegleria spp.</i>	27
4.5.3	<i>Reconhecimento da osmotolerância</i>	27
4.5.4	<i>Tolerância dos clones sob temperaturas elevadas</i>	28
4.6	Identificação molecular dos clones	28
4.6.1	<i>Extração de DNA dos clones</i>	28
4.7	Análise molecular dos clones	28
4.7.1	<i>Identificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	28
4.7.2	<i>Sequenciamento e análise dos amplicons</i>	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Caracterização da área de estudo	30
5.2	Isolamento de AVL das amostras coletadas	32
5.3	Clonagem das culturas monoxênicas	33
5.4	Caracterização morfológicas dos clones	34
5.5	Potencial de patogenicidade dos clones	38
5.6	Extração do DNA e quantificação	39
5.7	Identificação molecular	42
5.9	Classificação morfológica segundo Pussard & Pons	48
5.10	Sequenciamento dos amplicons obtidos	48
6.	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

APÊNDICE A	63
APÊNDICE B	64
APÊNDICE C	66
ANEXO A	68
ANEXO B	69

1. INTRODUÇÃO

As Amebas de Vida Livre (AVL) são protozoários anfizoicos que estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontradas na água, solo e ar, e em diferentes condições geográficas e climáticas. Dentre essas amebas, representantes dos gêneros *Acanthamoeba*, *Vermamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia* e *Paravahlkampfia* estão associados a doenças que podem acometer o ser humano e a outros animais (RODRÍGUEZ-ZARAGOZA, 1994; TRABELSI *et al.*, 2012; VISVESVARA *et al.*, 2009).

Dentre os gêneros de AVL, *Acanthamoeba* tem sido o mais estudado pela comunidade científica (KHAN, 2006). O gênero apresenta oito espécies em destaque nos estudos por causarem doenças como a Ceratite Amebiana (CA) em indivíduos imunocompetentes, além de diversas outras infecções cutâneas e Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) em imunocomprometidos (VISVESVARA, MOURA & SCHUSTER, 2007; TRABELSI *et al.*, 2012). A CA é uma infecção grave da córnea que pode levar à perda da visão e que está comumente associada ao uso de lentes de contato. Os casos têm aumentado em função da crescente utilização de lentes de contato nos dias atuais.

Vermamoeba vermiformis (anteriormente conhecida como *Hartmannella vermiformis*) assim como *Acanthamoeba* spp., são microrganismos presentes em inúmeros ambientes (SMIRNOV *et al.*, 2011), já tendo sido relatados algumas vezes como agentes etiológicos de úlceras na proximidade dos olhos e de ceratite, em que na maioria dos casos estavam associadas a outros microrganismos, como a própria *Acanthamoeba* spp. (AITKEN *et al.*, 1996; INOUE *et al.*, 1998; LORENZO-MORALES *et al.*, 2007). *Vermamoeba vermiformis* já foi encontrada inclusive como colonizadora oportunista em caso de meningoencefalite e broncopneumonia, podendo ter sido a responsável pelo agravamento do caso em questão (CENTENO *et al.*, 1996).

Naegleria fowleri, a principal espécie pertencente ao gênero *Naegleria* responsável por causar Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP) em jovens e crianças saudáveis expostos à água doce quente, é conhecida por apresentar uma fase flagelada e ser termofílica, tendo por isso, a preferência por ambientes com temperaturas acima de 45 °C (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008b). *Naegleria fowleri* já foi investigada como a causa de meningoencefalite também em animais, como em bovinos e antas sul-americanas

(LOZANO-ALARCÓN *et al.*, 1997; PIMENTEL, *et al.*, 2012). Segundo Visvesvara, Moura e Schuster (2007), devido ao fato dessa ameba infectar principalmente indivíduos saudáveis, ela não é considerada oportunista e sim um patógeno. Além de *N. fowleri*, a espécie *Paravahlkampfia francinae* n. sp. também é apontada como agente causadora da MAP (VISVESVARA *et al.*, 2009).

Identificada por causar uma infecção ao sistema nervoso central semelhante à encefalite amebiana granulomatosa causada por *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* espécie do gênero *Balamuthia*, afeta pessoas saudáveis de diferentes idades, e com imunocompetência e imunocomprometimento (VISVESVARA, MOURA & SCHUSTER, 2007; COPE *et al.*, 2019). Esses organismos são conhecidos por se alimentarem de amebas do solo, como *Acanthamoeba* spp. e *Naegleria* spp., e de células em cultura de tecidos (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004).

Associada a um único caso de encefalite em um jovem saudável de 38 anos retratado por Gelman *et al.* (2001), a espécie *Sappinia pedata* levanta uma questão importante: quantas amebas que ainda não foram identificadas estão infectando o ser humano e os animais sem a ciência dos estudiosos? Como ainda não existe um bom teste de diagnóstico que seja confiável para identificar essas doenças amebianas que atingem o sistema nervoso central, é de se imaginar a existência de inúmeros outros casos que podem estar associados a essas e a outros gêneros de AVL, e que ainda não se tem conhecimento.

Diante desses fatos, e dos meios em que esses organismos podem ser encontrados no ambiente, é crescente o interesse em mapear as possíveis áreas que possam servir como fontes de transmissão, principalmente por se tratarem de ambientes aquáticos e comumente utilizados como recreativos à população. Desta forma, este trabalho tem-se por objetivo isolar, identificar e caracterizar amebas de vida livre potencialmente patogênicas/opportunistas presentes em ambientes aquáticos antropogênicos, pela primeira vez, no Arroio Dilúvio e Lago Guaíba em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Isolar, identificar e caracterizar amebas de vida livre potencialmente patogênicas/opportunistas presentes em fontes de água naturais em Porto Alegre - RS.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar as AVL potencialmente patogênicas/opportunistas de fontes de água em pontos pré-definidos do Lago Guaíba e do Arroio Dilúvio;
- Identificar e caracterizar os gêneros e espécies de AVL encontradas através de características morfológicas e moleculares;
- Mapear a presença de gêneros amebianos de acordo com os pontos de coleta.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico

As amebas pertencentes aos gêneros *Acanthamoeba*, *Vermamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia* e *Paravahlkampfia* são protozoários anfizoicos amplamente dispersos no ambiente, podendo ser encontradas em amostras de solo, água e ar, de diferentes regiões do mundo. As infecções por essas amebas envolvem o cérebro, a pele, o pulmão e os olhos (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a).

Fowler e Carter (1961) relataram um caso de um menino de nove anos que morreu após ser diagnosticado com meningite aguda. Algo que intrigou os estudiosos foi a presença de amebas, distintas à morfologia de *Entamoeba histolytica*, no cérebro e nas meninges. O mesmo caso de diagnose se repetiu em 1965 com outros três pacientes, sendo duas meninas de oito anos e um homem de vinte e oito, pertencentes ao mesmo distrito do primeiro caso. Após exames *post-mortem* foi sugerido uma infecção ocasionada por *Acanthamoeba* spp. Posteriormente, esses casos foram atribuídos à *Naegleria fowleri* (FOWLER & CARTER, 1965). Este foi o primeiro caso de Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP). A espécie encontrada foi nomeada em homenagem ao pesquisador Malcolm Fowler.

Em 1972, pesquisadores que realizaram uma necropsia em um paciente com doença de Hodgkin identificaram a presença de cistos amebianos nos tecidos cerebrais. As características da ameba encontrada foram associadas ao gênero *Hartmannella* (JAGER & STAMM, 1972). Por conta das características encontradas, a infecção ficou conhecida como Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG), ocasionada por *Acanthamoeba* spp. Os primeiros casos de ceratite pelo mesmo gênero foram registrados por Naginton *et al.* (1974) no Reino Unido e por Jones *et al.* (1975) nos Estados Unidos.

Visvesvara *et al.* (1990) apresentou o primeiro caso de infecção por *Balamuthia* no sistema nervoso central de uma babuína mandril que chegou ao óbito em 1986. Três anos após o primeiro relato, compartilhou o resultado de sua pesquisa e a partir daí diversos casos de encefalite em humanos pelo mundo causada pela *Balamuthia mandrillaris* foram relatados (VISVESVARA, SCHUSTER & MARTINEZ, 1993).

Em 1991, um homem de 21 anos usuário de lentes de contato relatou perda de visão, dor ocular acentuada, fotofobia e secreção aquosa profusa do olho esquerdo. Após uma raspagem de córnea, biópsia, ceratoplastia, e uma análise microbiológica das lentes e dos estojos de armazenamento, o caso foi associado a uma infecção mista por *Hartmannella* e *Vahlkampfia* (AITKEN *et al.*, 1996). Sem histórico de infecção ocular, uma paciente de 27 anos que apresentava uma úlcera nas proximidades do olho direito, teve a *Vermamoeba vermiformis* como a responsável pela infecção local (SCHEID *et al.*, 2019). Esta mesma espécie já foi relatada como responsável pelo agravamento de um paciente com meningoencefalite e broncopneumonia (CENTENO *et al.*, 1996). Em 2011, Smirnov *et al.* (2011) reclassificou a até então conhecida como *Hartmannella vermiformis* como sendo *Vermamoeba vermiformis*.

Gelman (2001) reportou o único caso já registrado de encefalite amebiana em um homem de 38 anos, causada por *Sappinia diploidea*. Estudos moleculares divulgados em 2009 indicaram essa espécie como sendo a *Sappinia pedata* (QVARNSTROM *et al.*, 2009).

O caso mais recente de identificação de uma nova espécie de ameba de vida livre capaz de infectar humanos foi abordado por Visvesvara *et al.* (2009). Em seu estudo, identificaram uma nova espécie do gênero *Paravahlkampfia* designada como CDC:V595 (*Paravahlkampfia francinae* n. sp.). A ameba foi isolada do líquido cefalorraquidiano de um jovem de 18 anos contendo sintomas típicos de meningoencefalite amebiana primária, doença até então associada à *Naegleria fowleri*.

3.2 Aspectos biológicos e morfologia das espécies

3.2.1 Taxonomia e classificação das AVL

A taxonomia das amebas de vida livre já foi revisada inúmeras vezes, isso devido aos recentes estudos de sequenciamento genético. A classificação taxonômica clássica foi completamente abandonada pela Sociedade Internacional de Protozoologia para uma nova classificação baseada em abordagens morfológicas, bioquímicas e de filogenética molecular do sequenciamento do gene 18s do rDNA.

O novo sistema utilizado classifica os eucariotos em seis grupos: Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata e Excavata. Os gêneros

Acanthamoeba e *Balamuthia* são classificados no supergrupo Amoebozoa: Acanthamoebidae, *Sappinia* no Amoebozoa: Flabellinea: Thecamoebidae e, *Vermamoeba*, Amoebozoa: Tubulinea: Echinamoebidae. Enquanto *Naegleria* e *Paravahlkampfia* no supergrupo Excavata: Heterolobosia: Vahlkampfiidae (ADL *et al.*, 2005; VISVESVARA *et al.*, 2009; PAGE, 1967).

3.2.2 *Acanthamoeba* spp.

Isoladas em diferentes ambientes, como: água doce e do mar, sedimentos oceânicos, piscinas, esgoto, solo, unidades de tratamento dentário, estojos para lentes de contato, além de vegetais e diversos animais (SIDDIQUI & KHAN, 2012), *Acanthamoeba* spp., possui um ciclo biológico composto por dois estágios: trofozoíto, sua forma ativa, com tamanho que varia de 14 a 40 µm em que se alimenta por fagocitose de bactérias, algas e leveduras, e por pinocitose de nutrientes dissolvidos no ambiente; e o cisto, sua forma latente, podendo variar de 10 a 20 µm (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; CASTRILLÓN & OROZCO, 2013; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a). Poros são encontrados na parede do cisto, permitindo que a ameba dominante surja e retorne ao seu crescimento trófico quando necessário. A forma cística garante proteção contra a dessecação, falta de nutrientes e a variações de agentes químicos e físicos no meio (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004).

Devido à cápsula bacteriana ter a capacidade de inibir a fagocitose e o pigmento oferecer toxicidade à ameba, *Acanthamoeba* spp. apresenta a preferência de se alimentar de bactérias não capsuladas ou pigmentadas. Devido a essas características de alimentação, as espécies podem ser facilmente cultivadas em placas de ágar não-nutriente revestidas com bactérias, como *Escherichia coli* ou *Enterobacter aerogenes* (VISVESVARA, MOURA & SCHUSTER, 2007; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a)

Composta por apenas um único núcleo, os seus trofozoítos possuem projeções semelhantes a espinhos em sua superfície, denominadas de acantopódios. Provavelmente, estas estruturas são importantes para promover uma melhor adesão, movimentação celular ou captura de presas (KHAN, 2006).

Quanto às suas características e dimensões, o gênero possui 24 espécies já identificadas e é dividido em três grupos. O grupo I é caracterizado pelo endocisto estrelado e o ectocisto liso ou rugoso, com diâmetro médio do cisto maior ou igual a 18 µm. Grupo II

com ectocisto rugoso, endocisto podendo ser encontrado na forma poligonal, triangular, oval ou arredondada, e cistos menores de 18 µm; e o grupo III, o qual apresenta cistos maiores de 18 µm, endocisto arredondado e, ectocisto fino e ondulado (VISVESVARA, 1991).

Várias espécies desse gênero são conhecidas por causar ceratite amebiana em indivíduos imunocompetentes, e ainda, encefalite amebiana granulomatosa, infecções cutâneas e da nasofaringe em imunocomprometidos (CALIXTO *et al.*, 2014).

3.2.3 *Naegleria* spp.

Naegleria possui um ciclo de vida composto por três estágios: cisto, trofozoíto e um estágio flagelado que se desenvolve a partir da ameba, quando esta se encontra em um ambiente com alguma alteração na concentração iônica (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008b). Das espécies conhecidas, são exceções quanto à existência de uma forma flagelada: *N. indonesiensis*, *N. chilensis*, *N. spitzbergenensis*, *N. paradobsoni* e *N. neochilensis*, que nunca foram observadas nesse terceiro estágio (JONCKHEERE, 2014).

Todos representantes do gênero possuem morfologia semelhante, o que dificulta a sua identificação. A ameba trófica tem um padrão de locomoção de limacina contendo um ou mais pseudópodes ectoplasmáticos, muda constantemente de tamanho e forma, e apresenta dimensões que variam de 10 a 25 µm. Além disso, realiza a replicação assexuada e, se alimenta de bactérias e outras matérias orgânicas; o cisto, com 8 a 20 µm, possui uma dupla parede com poros. Quando encontrada em estágio transitório flagelado, *Naegleria* spp. não se alimenta nem se divide e, possui uma morfologia piriforme com 10 a 16 µm de tamanho (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; TRABELSI *et al.*, 2012).

Das 47 espécies de *Naegleria* já descritas, cinco já foram identificadas por causarem infecções no sistema nervoso central. *Naegleria australiensis*, *N. philippinenses* e *N. italica*, durante estudos em laboratórios, apresentaram infecção em camundongos (BELLINI *et al.*, 2020). Cerva *et al.* (1969) identificou uma meningoencefalite amebiana aguda causada por *Naegleria gruberi*. Já *Naegleria fowleri* é conhecida mundialmente provocar uma infecção aguda fulminante em humanos e em animais, a meningoencefalite amebiana primária (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a; HENKER *et al.*, 2019).

Em laboratório, assim como *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp. podem ser mantidas em placas de ágar não-nutriente suplementadas com bactérias gram-negativas como *E. coli* ou *Enterobacter aerogenes*. Além de servir como hospedeira de bactérias patogênicas, a exemplo da *Legionella pneumophila* (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008b).

3.2.4 *Balamuthia* spp.

Com dois estágios em seu ciclo biológico, cisto e trofozoíto, o gênero está presente apenas no solo, sendo de difícil isolamento e cultivo. Na grande maioria das vezes, o trofozoíto é pleomórfico e mede de 12 a 60 µm, apresentando um único núcleo. Porém em alguns casos, formas binucleadas podem ser visualizadas. Os cistos, de 12 a 30 µm de diâmetro, possuem uma parede com camada tripla e sem poros (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a; TRABELSI *et al.*, 2012).

Apesar de *Balamuthia* não ter uma fonte de alimento claramente conhecida, sabe-se que ela pode se alimentar de amebas menores do que ela, como *Acanthamoeba* spp. e *Naegleria* spp. e de células de tecidos, mas não de bactérias. Por isso, diferentemente das demais, ela não pode ser cultivada em placas com ágar revestido de bactérias (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008b).

Até o presente, *Balamuthia mandrillaris* é a única espécie do gênero conhecida por causar encefalite amebiana granulomatosa e infecções na pele, bem semelhantes às causadas por *Acanthamoeba* spp. em humanos e demais animais, afetando imunocomprometidos, como pacientes com HIV/AIDS e usuários de drogas intravenosas (VISVESVARA, MOURA & SCHUSTER, 2007).

3.2.5 *Vermamoeba* spp.

Vermamoeba vermiformis, é a única espécie conhecida até a presente data. É uma ameba ubíqua de ambientes aquáticos e marinhos. Inicialmente a sua taxonomia era associada à *Hartmannella* (PAGE, 1967). Contudo, foi renomeada novamente por Smirnov *et al.* (2011). Em sua forma ativa, possui uma locomoção de forma monopodial mas se torna bi ou multipodial ao mudar de direção com uma zona hialina anterior proeminente e muitas das vezes possui um vacúolo contrátil. A forma trofozoítica apresenta um comprimento variando

de 22 a 42 μm . Quando encistada, possuem uma morfologia bilaminar arredondada ou ligeiramente oval, com dimensões de 6 a 9 μm (SMIRNOV *et al.*, 2011; PAGE, 1991).

Vermamoeba vermiformis foi encontrada inúmeras vezes associadas a casos de ceratites com *Acanthamoeba* spp., além de se associar com outros microrganismos, como fungos, vírus e bactérias, sendo capaz de internalizar, preservar e permitir o desenvolvimento de patógenos com resistência a drogas (DELAFONT *et al.*, 2018; CATEAU, 2014). Servindo ainda, como agravante de doenças quando associadas ao principal agente (CENTENO *et al.*, 1996).

A espécie pode ser cultivada em ágar não-nutriente enriquecido por bactérias, como: *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, e *Pseudomonas aeruginosa* (PAGNIER *et al.*, 2015).

3.2.6 *Sappinia* spp.

O gênero compreende três espécies, *Sappinia pedata*, *S. diploidea* e *S. platani*, se encontra distribuído em diferentes ambientes na natureza, como no solo e água doce (VISVESVARA, MOURA & SCHUSTER, 2007), e apresenta-se em dois estágios de ciclo de vida, trofozoíto e cisto. Os trofozoítos possuem dois núcleos e geralmente apresentam de 50 a 60 μm de comprimento e 20 a 30 μm de largura, além de uma locomoção monopodial com grande hialoplasma na parte anterior da célula. Já os cistos possuem de 18 a 25 μm de diâmetro (WALOCHNIK, WYLEZICH & MICHEL, 2010).

Em experimentos realizados, *Sappinia* spp. nunca foram associadas a casos fatais em animais ou humanos, e nunca antes havia sido associada a alguma patologia. Um único caso foi reportado em um jovem imunocompetente o qual sobreviveu após uma encefalite (TRABELSI *et al.*, 2012). Inicialmente o caso foi atribuído à *S. diploidea*, após ensaios utilizando a tecnologia de reação em cadeia da polimerase por tempo real os testes indicaram *S. pedata* como sendo de fato a responsável pela infecção (WYLEZICH, WALOCHNIK & MICHEL, 2009).

Sappinia spp. podem ser cultivadas em placas de ágar não-nutriente revestidas com bactérias, como *Enterobacter cloacae* e *Escherichia coli* (WALOCHNIK, WYLEZICH & MICHEL, 2010; QVARNSTROM *et al.*, 2009).

3.2.7 *Paravahlkampfia francinae* n. sp.

Esta espécie é caracterizada por um ciclo de vida em dois estágios, com trofozoíto (15-25 µm) e cisto (15-21 µm). A morfologia é típica das amebas vahlkampfiidicas, exibindo movimento ameboide por meio de pseudópodes eruptivos. O cisto possui parede dupla e contém endossimbiontes bacterianos por entre as camadas da parede (VISVESVARA *et al.*, 2009).

As amebas crescem bem em temperaturas de 33° C, 37° C e 40° C. A locomoção do trofozoíto a 37° C é a mais rápida, o que indica uma maior preferência a esta temperatura. *Paravahlkampfia francinae* não produz flagelados e não cresce em placas de ágar revestidas com *E.coli*, fonte alimentar usual de *Paravahlkampfia ustiana*, espécie típica do gênero, nem em meio axênico o qual é normalmente utilizado para o crescimento de *Naegleria gruberi* e *N. fowleri*, mas apresenta um bom crescimento em culturas de tecidos de mamíferos (VISVESVARA *et al.*, 2009).

3.3 Doenças causadas por amebas de vida livre

3.3.1 Encefalite amebiana granulomatosa

A encefalite amebiana granulomatosa (EAG) é uma doença oportunista causada por *Acanthamoeba* spp. (JAGER & STAMM, 1972), *Balamuthia mandrillaris* (VISVESVARA *et al.*, 1990) e *Sappinia pedata* (QVARNSTROM *et al.*, 2009). A infecção afeta o sistema nervoso central de hospedeiros que possuem alguma integridade metabólica, fisiológica ou imunológica comprometida. Poucos casos foram descritos em indivíduos sem sinais óbvios de imunocomprometimento (VISVESVARA, MOURA & SCHUSTER, 2007).

Por conta da morfologia semelhante, em microscopia de luz em cortes de tecido, *Acanthamoeba* spp. e *B. mandrillaris* são de difícil diferenciação. Como as duas amebas possuem uma distinta morfologia no estágio de cisto, elas podem ser diferenciadas a partir de uma análise de imunofluorescência, uma microscopia eletrônica de transmissão ou por ferramenta molecular (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008b).

A rota de invasão e penetração das amebas inclui as vias respiratórias inferiores e lesões na pele (MARTINEZ, 1991). Apesar dos mecanismos associados à patogênese não

serem claros, acredita-se que as complicações que envolvem o sistema nervoso incluem a indução das respostas pró-inflamatórias, invasão da barreira hematoencefálica e do tecido conjuntivo, e ainda, um dano neuronal que resulta na disfunção cerebral (KHAN, 2006).

Os sintomas da EAG são: dor de cabeça, rigidez na nuca, paralisia facial, anomalias no estado mental, febre baixa, náuseas, vômitos, ataxia cerebelar, letargia, distúrbios visuais, hemiparesia, convulsões e coma (VISVESVARA, MOURA & SCHUSTER, 2007).

3.3.2 Ceratite amebiana

A ceratite amebiana é uma infecção que afeta a região da córnea nos olhos e é causada principalmente por *Acanthamoeba* spp. em indivíduos imunocompetentes. Fatores que acabam elevando o risco de contágio são: o uso prolongado de lentes de contato, traumas na córnea, soluções não-estéreis para limpeza das lentes e a prática de natação em água contaminada (CALIXTO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2018).

Como a superfície posterior da lente é estática quando em uso, o período de retenção dos organismos na superfície ocular pode ser estendido, o que faz com que eles se proliferem e tenham a capacidade de aderir às células epiteliais da córnea, permitindo um acesso mais profundo nas camadas do tecido (CARNT & STAPLETON, 2015).

A infecção é caracterizada pela inflamação na córnea, dor intensa nos olhos, fotofobia, recorrente ruptura do epitélio da córnea e uma lesão refratária aos antibióticos que normalmente são utilizados. Geralmente apenas um dos olhos é afetado, porém casos com ceratite bilateral já foram relatados (VISVESVARA, MOURA & SCHUSTER, 2007). Na ausência de dano epitelial da córnea, a maioria dos microrganismos conseguem ser removidos da superfície dos olhos devido ao ato de piscar e lacrimejar (CARNT & STAPLETON, 2015).

3.3.3 Meningoencefalite Amebiana Primária

Causada por *Naegleria fowleri* (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a) e *Paravahlkampfia francinae* n. sp. (VISVESVARA *et al.*, 2009), a meningoencefalite amebiana primária (MAP) se trata de uma meningoencefalite aguda, fulminante e hemorrágica com início abrupto, que atinge crianças e jovens adultos previamente saudáveis com histórico de exposição à água doce quente, cerca de uma semana antes dos primeiros sintomas (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008b). Por conta das características da doença e a

distribuição da ameba nos hospedeiros, os primeiros estudos realizados sugeriram fortemente que a invasão do microrganismo no cérebro e na meninge se deu através da mucosa nasal (FOWLER & CARTER, 1965).

Os primeiros sintomas são de início súbito com cefaleias bifrontais ou bitemporais, rigidez na nuca, febre elevada, náuseas, vômitos, inquietação e irritabilidade. A rigidez na nuca, de maneira geral, ocorre com sinais de Kernig e Brudzinski positivos. E uma sensibilidade à luz pode vir a ocorrer, seguido de letargia, confusão, convulsão, coma, diplopia e, dentro de uma semana, pode levar ao óbito (VISVESVARA, MOURA & SCHUSTER, 2007).

3.4 Relação de endossimbiose

Alguns grupos de vírus e bactérias têm a capacidade de interagir com as AVL, resistindo ao processo de fagocitose. Esses organismos se tornam resistentes e mantêm uma relação estável com a ameba. Esta relação é denominada de endossimbiose. Isso significa que amebas, como *Acanthamoeba* spp., podem servir como hospedeiros/reservatórios de patógenos, atuando como uma espécie de “cavalos de Tróia” (BARKER & BROWN, 1994; KHAN, 2006; GREUB & RAOULT, 2004; STEENBERGEN *et al.*, 2004; WINIECKA-KRUSNELL *et al.*, 2009).

Legionella pneumophila foi o primeiro microrganismo resistente à ameba pela qual a sua resistência recebeu um destaque na atuação das amebas de vida livre como reservatórios, vetores e um “berço evolutivo” (GREUB & RAOULT, 2004). Normalmente essas bactérias são capazes de resistir ao processo de encistamento amebiano, e por isso, são protegidas juntamente com as amebas sob condições adversas (LOVIENO *et al.*, 2010).

A interação dos vírus com as AVL, foi descrita algumas vezes em amostras de água como descrito por Lorenzo-Morales *et al.* (2007), além de pacientes que apresentaram casos de co-infecções com *Acanthamoeba* e vírus patogênicos (GAJDATSY, KOSMIN & BARRETT, 2000). Assim como a detecção de genomas de adenovírus humanos em *Acanthamoeba* de isolados de piscina (STAGGEMEIER *et al.*, 2016).

Considerando que tanto as AVL quanto os adenovírus podem ser encontrados em ambientes aquáticos, Scheid & Schwarzenberger (2012) buscaram entender a possível

associação de adenovírus e amebas de vida livre em seu estudo. Com isso, eles concluíram que *acantamebas* podem atuar como promotores ou veículos de dispersão de adenovírus gastrointestinais e oculares em fontes de água.

4. METODOLOGIA

4.1 Local de desenvolvimento do projeto

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Protozoologia, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre - RS.

4.2 Área de Estudo

O estudo foi realizado no município de Porto Alegre, capital do estado do Rio Grande do Sul. A capital apresenta uma extensão territorial de 495,390 km² localizada em 30° 01' 58" ao Sul e 51° 13' 48" à Oeste, e uma população estimada de 1.492.530 habitantes para o ano de 2021, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2022).

Segundo Menegat *et al.* (2006), Porto Alegre possui uma classificação climática Köppen-Geiger como sendo de subtropical úmido (Cfa), isso devido aos valores de temperatura média do mês mais quente serem superiores à 22° C e ainda, por apresentar chuvas bem dispersas ao longo do ano. Diante da particularidade dos ambientes no qual as amebas de vida livre são comumente encontradas, foi levantado dados referentes às características climatológicas do município, como variação da temperatura anual e de pluviometria.

4.3 Coletas

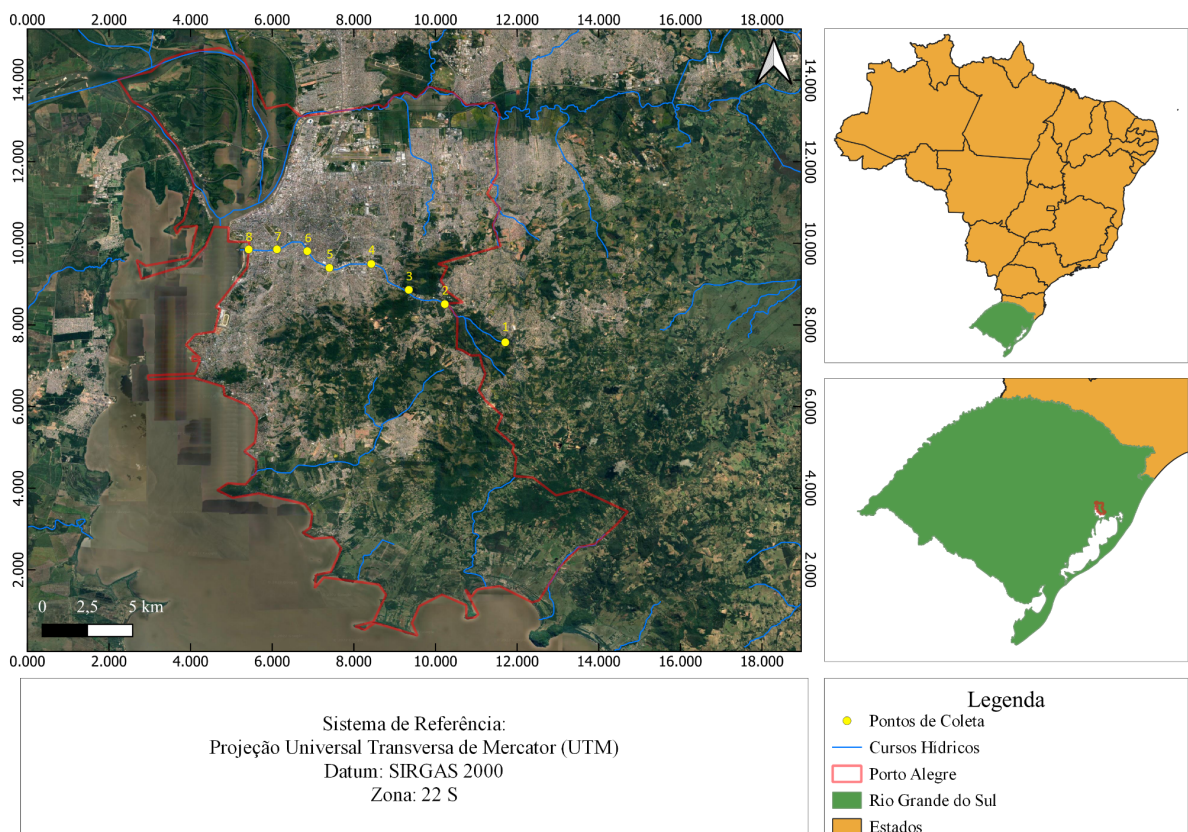
Foram coletadas 17 amostras de fonte de água doce, sendo 9 delas correspondentes ao Lago Guaíba e as demais ao Arroio Dilúvio (8). As amostras foram coletadas em frascos esterilizados de 1L, identificadas, acondicionadas em caixas de isopor e transportadas para o laboratório de Protozoologia/ICBS da UFRGS. Parâmetros como temperatura, pH e características organolépticas foram analisadas *in loco* (Apêndice A).

4.3.1 Arroio Dilúvio

O Arroio Dilúvio é um canal hídrico aberto de aproximadamente 18 km que percorre todo o município de Porto Alegre, abrangendo regiões altamente urbanizadas e com uma grande densidade populacional, além da área de nascente pertencente ao município adjacente de Viamão, RS (BASSO, MOREIRA & PIZZATO, 2011). Assim, para a seleção dos pontos de coleta foram indicados locais estratégicos, como: nascente, proximidade a hospitais, universidades, regiões bem urbanizadas, industrializadas e o ponto de deságue junto ao Lago Guaíba.

A coleta na nascente (Ponto 1) foi realizada no Parque Nacional Municipal Saint'Hilaire, localizado no município de Viamão-RS. A autorização da coleta foi realizada conforme apresentado no Anexo A. A Figura 1 destaca os pontos de amostragem no Arroio Dilúvio. As coletas foram elaboradas no período da manhã nos dias 24, 25 e 28 de Janeiro de 2022 (estação do verão).

Figura 1. Pontos de amostragem do Arroio Dilúvio

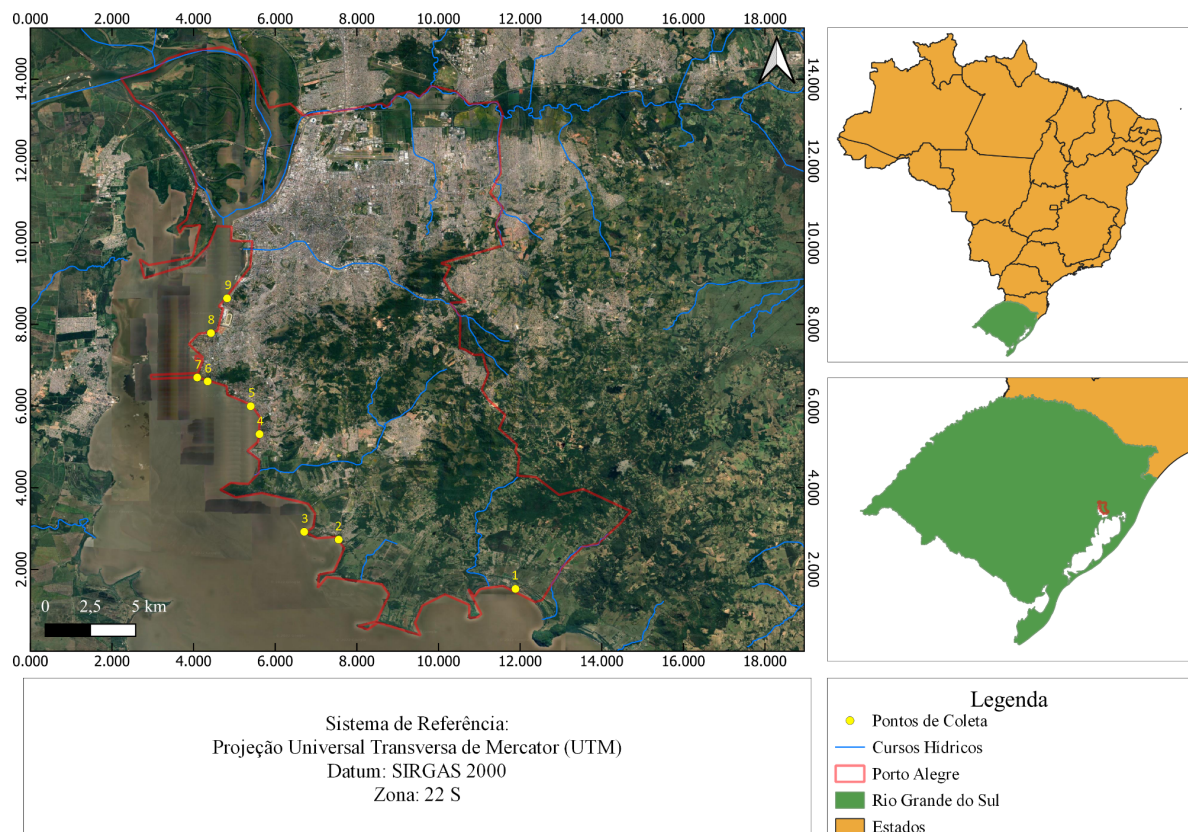


4.3.2 Lago Guaíba

Segundo Nicolodi (2007), o Lago Guaíba possui uma área aproximada de 84.700 km² que abrange mais de 250 municípios, englobando boa parte da região central e nordeste do estado do Rio Grande do Sul. O lago é utilizado para diversas atividades, como: recreação, navegação, extração de areia, e captação de água para abastecimento público de grande parte da região metropolitana do estado. O ponto 1 foi definido como o ponto mais ao sul de Porto Alegre.

Para a seleção dos pontos de coleta no Lago Guaíba foi utilizado como critério de seleção o turismo e lazer local. Os pontos de amostragem estão dispostos na Figura 2. Assim como as coletas no Arroio Dilúvio, as coletas no Lago Guaíba também foram realizadas no período da manhã no verão de 2022 (dias 27 e 28 de Janeiro), isso porque o período é destacado pela grande procura da população por ambientes mais frescos em dias com temperaturas elevadas.

Figura 2. Pontos de amostragem no Lago Guaíba



4.4 Processamento das amostras

4.4.1 Preparação das amostras e inoculação

Após homogeneização, cada amostra foi disposta em um cálice de sedimentação por um período de 24 horas. Após este período, o sobrenadante foi descartado e o pellet homogeneizado para ser então transferido para dois tubos Falcon de 50 mL. As amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 2500 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, 200 µL do material sedimentado em cada tubo foi pipetado e transferido para uma placa Petri contendo 1,5% de ágar não-nutriente (ANN) respectivamente, onde foi previamente inoculada com *Escherichia coli* (ATCC 8739) inativada pelo calor. As placas foram então, seladas com Parafilm® e inoculadas a uma temperatura de 30° C.

4.4.2 Crescimento amebiano e obtenção das culturas monoxênicas

Diariamente as placas foram observadas junto a um microscópio óptico, utilizando a objetiva de 10X e monitoradas por até 20 dias. As placas que não obtiveram crescimento foram descartadas. Nas placas em que foi possível detectar a presença de amebas, a região de crescimento foi demarcada, e parte do ágar foi extraído com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril e em seguida, inoculado com a face voltada para baixo e arrastado em uma nova placa de ANN contendo *E. coli* (ATCC 8739) inativada. Onde foi novamente incubada a 30° C. A fim de evitar contaminação, todo o procedimento foi realizado dentro de uma capela de fluxo laminar ou próximo ao bico de Bunsen. O processo de reinoculação foi realizado ao longo de 45 dias, até que foi possível de se observar amostras livres de contaminantes, composta apenas por uma cultura monoxênica.

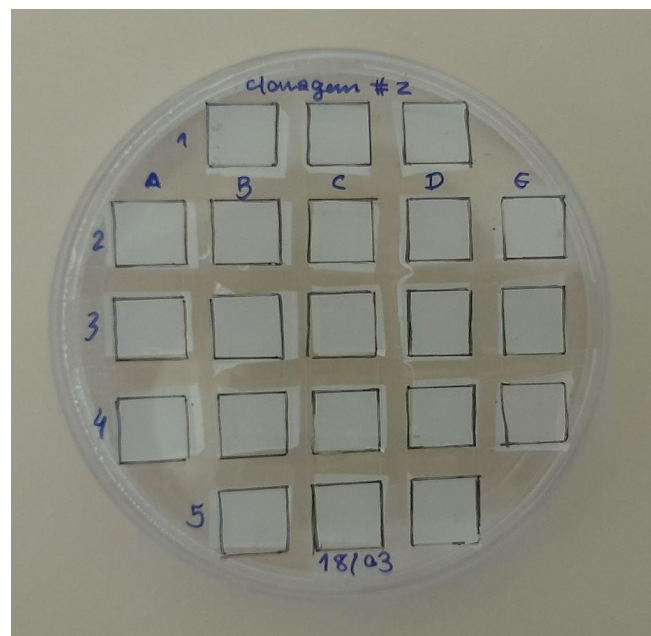
4.4.3 Clonagem dos isolados monoxênicos

Para a obtenção da clonagem de cada amostra, a técnica de diluições sucessivas foi utilizada. Dentro da capela de fluxo laminar as placas contendo as amebas foram dispostas sobre gelo por 10 minutos. Posteriormente foi adicionado 10 mL de solução salina de Page (Anexo B) no interior das placas, onde com o auxílio de alça de Drigalski esterilizada foram realizados suaves movimentos para ajudar a desprender as amebas da superfície do ágar.

A suspensão foi transferida com o auxílio de um pipetador para um tubo Falcon de 15 mL e centrifugado a uma velocidade de 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido com 1 mL de tampão fosfato-salino (PBS) com pH de 7,2 e homogeneizada para a quantificação. Cerca de 15 μ L do conteúdo foi adicionado na câmara de Neubauer para contagem. A concentração de PBS foi ajustada para 200 amebas/mL, estimando assim a presença de uma ameba para cada 5 μ L da solução final.

Para aprimorar a técnica de clonagem de isolados, a metodologia de Diehl, Paes & Rott (2021) foi utilizada. Desta forma, placas com ágar não-nutriente foram cortadas, conforme apresenta a Figura 3.

Figura 3. Método de Diehl, Paes & Rott (2021) utilizado



Em cada quadrado, previamente inoculado com *Escherichia coli* (ATCC 10536) inativada, foi adicionado 5 μ L da suspensão, com o objetivo de se observar apenas uma única célula. Após a visualização microscópica da célula, as placas foram então incubadas a 30° C, e o seu crescimento foi acompanhado ao longo de 7 dias. Quando observado um bom crescimento de trofozoítos, o quadrado era então transferido para uma nova placa inoculada com *Escherichia coli* (ATCC 10536) inativada.

Os clones obtidos, foram mantidos para a continuação do estudo. Após o crescimento e bom desenvolvimento das amebas na placa, os clones foram fotografados usando o

microscópio óptico Olympus BX41 incorporado com o sistema 5.0 Megapixel Olympus Q-Color 5[®], onde tiveram a sua morfologia analisada.

4.5 Identificação morfológica dos clones

4.5.1 Caracterização morfológica

Cada clone previamente identificado, foi analisado quanto à sua estrutura morfológica, de acordo com os critérios propostos por Page (1976). Características como: diâmetro do cisto e do trofozoíto, em μm ; e tempo de contração do vacúolo pulsátil em segundos, foram observados. Para a identificação de grupos do gênero de *Acanthamoeba*, a morfologia dos cistos foi analisada conforme proposto por Pussard & Pons (1977) três dias após o processo de encistamento.

A observação e medição das estruturas foram realizadas sem a adição de coloração, com o uso de um microscópio óptico com a objetiva de 40 X. Para a realização da média do diâmetro dos cistos e dos trofozoítos, foram selecionadas randomicamente dez células de cada. Quanto ao tempo de contração do vacúolo, foi considerado o tempo da retração até a abertura do mesmo. E para o cálculo da média, foram avaliados os tempos de cinco células de cada isolado.

4.5.2 Emissão de flagelos de *Naegleria* spp.

Para a identificação de espécies de *Naegleria* spp. que possuem a fase flagelar, foi realizada a técnica de exflagelação. Após o crescimento de trofozoítos, a superfície das placas de ágar não-nutriente foi coberta com 10 mL de água destilada estéril e gentilmente raspada com alça de Drigalski. O líquido foi direcionado a garrafas de cultivo esterilizadas e incubadas a 37° C. A emissão dos flagelos foi acompanhada por meio da visualização em microscópio invertido (Precision[®] P400) a cada 30 minutos por 4 horas (CARLI, 2001; SILVA & ROSA, 2001).

4.5.3 Reconhecimento da osmotolerância

Para analisar o efeito da osmolaridade das amebas, foram utilizadas placas de ágar não-nutriente (1,5%) contendo 0,5 M e 1,0 M de manitol com sobrecamada de *Escherichia coli* (ATCC 10536). Como controle, placas sem manitol foram submetidas sob as mesmas

condições. Cerca de 1000 trofozoítos foram inoculados ao centro da placa e submetidos por até 10 dias, a uma temperatura de 30° C.

O crescimento foi determinado através da contagem do número de células presentes a uma distância de 20 mm a partir do halo de inoculação. O experimento foi realizado em triplicata e cepas de *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010) foram utilizadas como controle.

4.5.4 Tolerância dos clones sob temperaturas elevadas

Os isolados de amebas de vida livre obtidos foram incubados em diferentes temperaturas (30° C, 37° C e 42° C) em triplicata e observados diariamente por 10 dias.

4.6 Identificação molecular dos clones

4.6.1 Extração de DNA dos clones

Para a extração do DNA total foi desenvolvido um protocolo capaz de abranger espécies da ordem Amoebida. A descrição das etapas e os materiais utilizados no processo de extração estão apresentados no Apêndice B. A extração foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. A qualidade do DNA dos clones de amebas de vida livre foi realizada através do nano espectrofotômetro (Kasvi® K23-0002, versão 01/13).

4.7 Análise molecular dos clones

4.7.1 Identificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL contendo cerca de 50 ng do molde de DNA, 5mM de dNTP, 10pM de cada oligonucleotídeo, tampão de reação (50 mM KCl₂, 10 mM Tris-HCl), 50 mM MgCl₂ e 1U de Taq polimerase (Invitrogen®) e água ultrapura tipo 1 estéril para completar o volume. Os oligonucleotídeos específicos utilizados na PCR estão descritos na Tabela 1. As reações foram incubadas em um termociclador (SimpliAmp™ Thermal Cycler - Applied biosystems® by Life Technologies™). As condições de ciclagem térmica foram programadas para uma desnaturação inicial a 94° C, durante 5 minutos. Após a desnaturação, a reação se seguiu para a amplificação dos diferentes gêneros e domínio relacionados, sendo:

- *Acanthamoeba* spp.: 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 segundos, anelamento a 60° C por 40 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto e 15 segundos.
- *Vermamoeba* spp.: 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 segundos, anelamento a 58° C por 40 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos.
- *Naegleria* spp: 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 segundos, anelamento a 55° C por 40 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto e 15 segundos.
- *Balamuthia mandrillaris*: 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 segundos, anelamento a 48° C por 40 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto e 15 segundos.
- Domínio Bacteria: 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 segundos, anelamento a 56° C por 40 segundos e extensão a 74° C por 1 minuto e 15 segundos.

Ao final dos ciclos as reações foram mantidas a 72°C por 5 minutos (exceto o domínio Bacteria que teve a extensão final a 74° C por 5 minutos) e resfriada a 4° C. O controle negativo incluiu todos os reagentes exceto o DNA. Os controles positivos foram: *Acanthamoeba* spp. (isolado clínico); *Naegleria* spp. (isolado clínico); *Vermamoeba* spp. (isolado ambiental); *Escherichia coli* (ATCC 10536); e *Balamuthia* (isolado ambiental). Após a PCR, os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,2%, corado com GelRed (Loading Buffer 5x - Quatro G P&D Ltda.) e visualizados sob luz ultravioleta com o fotodocumentador (Syngene® - GENi2). Os fragmentos amplificados ou amplicons foram analisados por comparação com um marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Ludwig Biotec®).

4.7.2 Sequenciamento e análise dos amplicons

Para o sequenciamento, os primers usados foram os mesmos da reação de PCR, porém nesta etapa, foram testados separadamente para cada reação (apenas o primer forward ou reverse), usando 4,5 pM de cada para um volume final contendo 60 ng. As amostras positivas foram enviadas para ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS - Brasil). O sequenciamento foi realizado usando o sequenciador automático ABI Prism 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems®. As sequências identificadas foram analisadas e submetidas à análise de homologia no BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) otimizada para sequências altamente similares (megablast), alinhadas pelo Clustal W 2.1 e depositadas junto ao banco de dados do GenBank.

Tabela 1. Oligonucleotídeos específicos utilizados

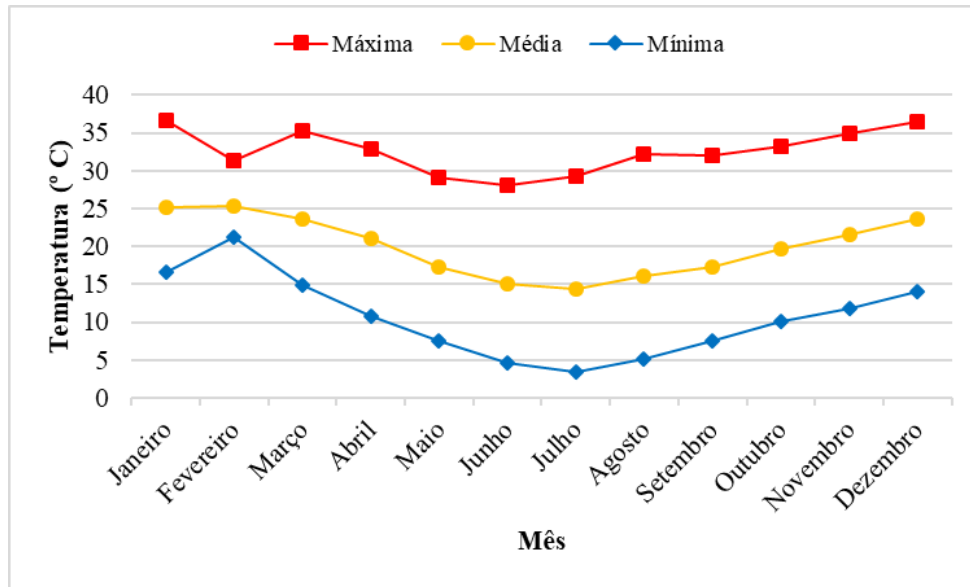
Organismo	Gene-alvo	Sequência 5' - 3'	Tamanho Amplicon (pb)	Bibliografia
Domínio Bacteria	16S rDNA	fDI: CCGAATTCGTCGACAACAGAGTT TGATCCTGGCTCAG rP2: CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTA CCTTGTTACGACTT	1400-1500	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
<i>Acanthamoeba</i>	Região ASA.S1	JDP1: GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA JDP2: TCTCACAAGCTGCTAGGGGATA	450-500	Booton <i>et al.</i> 2005
<i>Vermamoeba</i>	18S rDNA	Hv1227F: TTACGAGGTCAGGACACTGT Hv1728R: GACCATCCGGAGTTCTCG	505	Kuiper <i>et al.</i> 2006
<i>Naegleria</i>	Região ITS	ITS1: GAACCTGCGTAGGGATCATT ITS2: TTTCTTTTCCTCCCCTTATTA	400-453	Pélandakis <i>et al.</i> , 2000
<i>Balamuthia</i>	16s rRNA	5' Balspec16S: CGCATGTATGAAGAAGACCA 3' Balspec16S: TTACCTATATAATTGTCGATACCA	1075	Booton <i>et al.</i> , 2003

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da área de estudo

De posse dos dados disponíveis no portal do Instituto Nacional de Meteorologia - INMET, da estação automática A801 localizada em Porto Alegre - RS, foi desenvolvido um gráfico com a variação anual das temperaturas dos últimos 20 anos, com uma temperatura média anual de 20° C.

Figura 4. Variação das temperaturas anual de Porto Alegre - RS

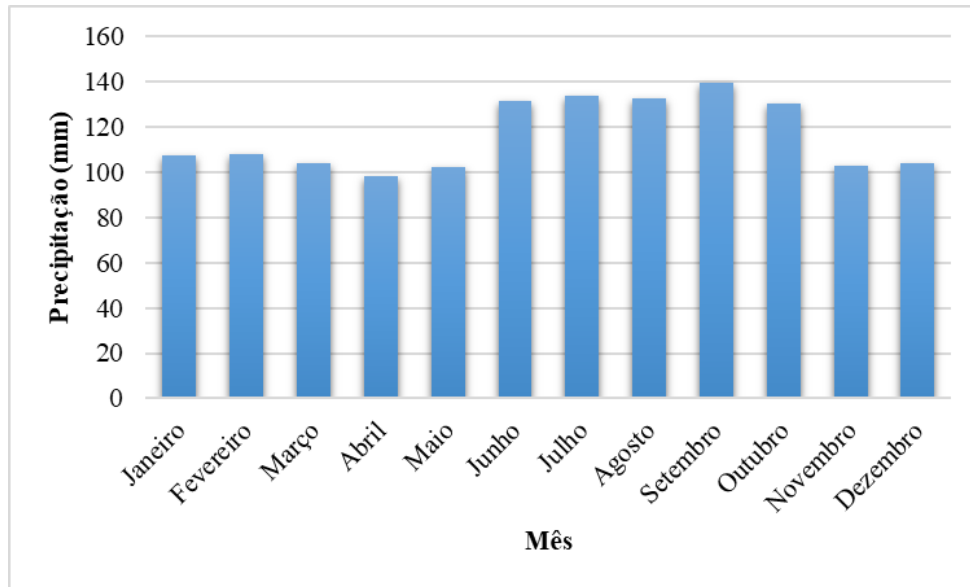


A Figura 4 destaca os meses de janeiro, março, novembro e dezembro como sendo os meses que historicamente atingem temperaturas máximas acima de 35° C. Alguns desses meses possuem como característica o fim do período letivo, o que favorece a busca de pessoas por ambientes mais frescos para fins recreativos. Essas temperaturas elevadas permitem a presença de microrganismos termotolerantes na água, característica esta que se encontra presente em algumas AVL patogênicas.

Esses resultados referentes à climatologia da cidade de Porto Alegre são importantes pois detalham o padrão da temperatura anual. Esses dados demonstram que apesar de ser uma capital com temperaturas mais amenas quando comparada às demais, em determinados períodos do ano, o aumento da temperatura pode favorecer os lagos como um ambiente mais propenso para o crescimento de amebas de vida livre.

A partir dos dados disponibilizados pelo portal HidroWeb de uma estação convencional pluviométrica localizada em Porto Alegre - RS, de código 03051011, dentro de um intervalo de 58 anos operada pela INMET, foi possível elaborar um gráfico contendo as médias mensais de precipitação para o período de 1961 a 2019, como apresentado na Figura 5, com um acumulado de 1.394,1 mm ao ano.

Figura 5. Precipitação média anual de Porto Alegre - RS



O gráfico apresentado na Figura 5, mostra a distribuição anual de precipitação no município de Porto Alegre. Os dados indicam que os meses de junho a outubro são os mais chuvosos, com precipitações acima de 130 mm ao mês.

O aumento global da temperatura tem sido uma preocupação quanto ao agravante de número de casos por infecções relacionadas a parasitos, o que inclui os estudos de doenças ocasionadas por AVL. Esse aquecimento da temperatura em boa parte do mundo pode promover o crescimento de organismos termotolerantes, os quais podem melhor se adaptar a infecções acometidas ao homem e a demais animais (COOK, 1992; PATZ *et al.*, 2000). Além disso, os meses menos chuvosos podem proporcionar uma maior concentração local de microrganismos nos cursos hídricos que, em condições de temperaturas mais elevadas, acima de 37° C, podem promover o crescimento de microrganismos tolerantes à altas temperaturas.

5.2 Isolamento de AVL das amostras coletadas

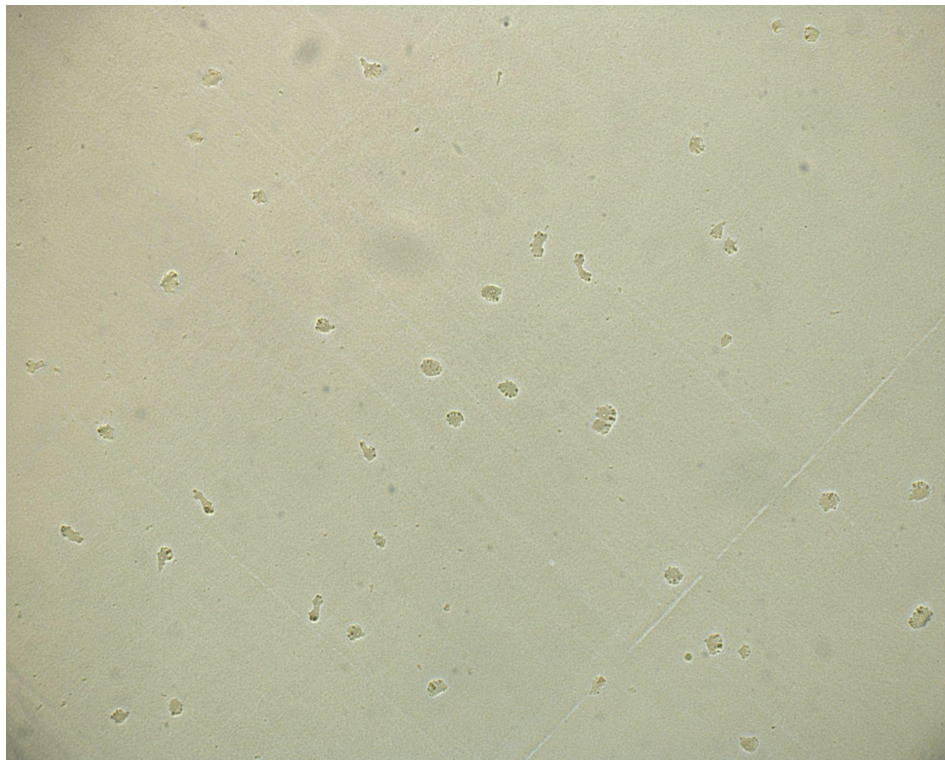
Das 17 amostras coletadas nos pontos estudados, todas (100%) foram positivas para o isolamento de amebas de vida livre. Outros microrganismos, como fungos, bactérias e outros protozoários estavam presentes nas amostras iniciais. A figura a seguir mostra alguns desses organismos.

Figura 6. Placas das etapas iniciais de isolamento contendo outros microrganismos



Após os isolamentos, foi possível obter uma cultura monoxênica, livre de outros organismos que não fossem a *Escherichia coli*, sendo esta, utilizada como fonte de alimento para o crescimento das amebas de vida livre. A Figura 7 detalha esta cultura final.

Figura 7. Cultura de AVL monoxênica do Lago Guaíba no ponto 7

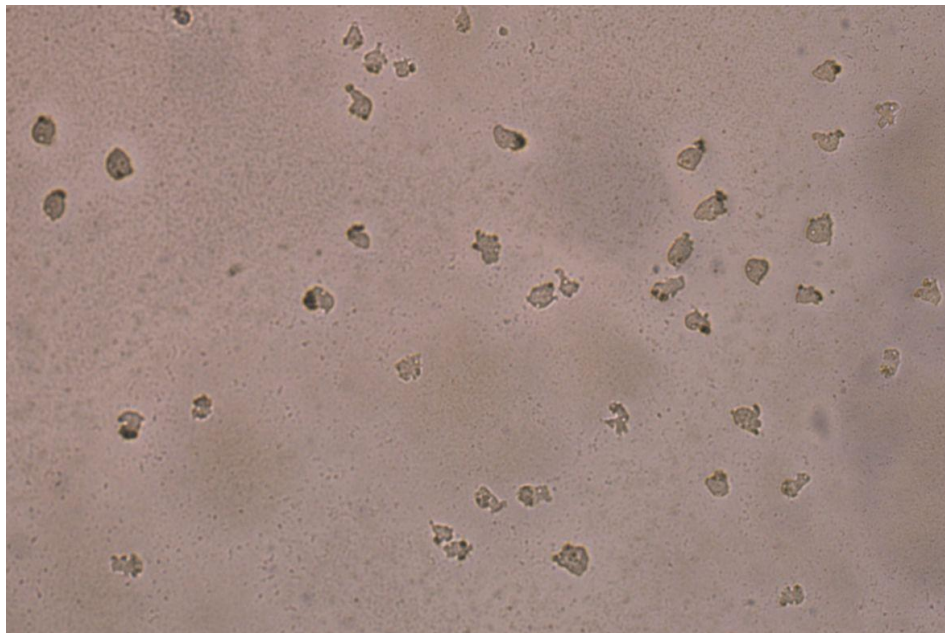


5.3 Clonagem das culturas monoxênicas

Através da clonagem foram obtidos clones de cada ponto coletado, sendo 3 clones para os pontos: 1, 2, 3, 4 e 8 do Arroio Dilúvio e para o Lago Guaíba nos pontos: 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7 e 8. Nos demais pontos do Arroio Dilúvio foi possível isolar apenas dois clones viáveis cada; e no ponto 9 do Lago Guaíba, apenas um clone. No total, teve-se 21 clones para o Arroio Dilúvio, e 25 para o Lago Guaíba. Com isso, todos os clones foram fotografados e dimensionados. A figura a seguir apresenta um desses clones e mostra as principais características das amebas, como a morfologia ameboide, e o vacúolo contrátil bem característico.

Figura 8. Clone B do ponto 3 do Arroio Dilúvio



5.4 Caracterização morfológicas dos clones

Os clones tiveram as suas características morfológicas analisadas. Os resultados referentes aos diâmetros e as contrações dos vacúolos pulsáteis estão apresentados nas Tabela 2 e 3, referentes ao Arroio Dilúvio e ao Lago Guaíba, respectivamente.

Algumas amebas tiveram as suas dimensões compatíveis com espécies dos gêneros *Acanthamoeba*, *Vermamoeba*, *Naegleria* e *Balamuthia*. Nenhuma apresentou dimensões consistentes a representantes de *Sappinia* e *Paravahlkampfia*. Os vacúolos pulsáteis, que foram evidentes no citoplasma de todos os clones, tiveram o tempo de contração cronometrado. Esses dados são também apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Figura 9. Micrometria do clone C do ponto 7 do Arroio Dilúvio



As dimensões registradas dos clones não apresentaram qualquer relação com o tempo médio de contração do vacúolo pulsátil. A exemplo, os dois clones que obtiveram a contração superior a 100,00 segundos tiveram as suas dimensões semelhantes à outros cujo o tempo de contração era igual ou inferior a metade de 100,00 segundos. Dessa forma, é possível dizer que neste estudo o tamanho do trofozoíto não influenciou no tempo entre o fechamento e abertura dos vacúolos contráteis.

Tabela 2. Caracterização morfológica dos clones do Arroio Dilúvio

Ponto	Clone	Diâmetro Médio dos Cistos (μm - DP)	Diâmetro Médio dos Trofozoítos (μm - DP)	Tempo Médio de Contração do Vacúolo Pulsátil (s - DP)
1	A	14,62 (2,8)	8,60 (1,1)	47,71 (8,4)
	B	15,48 (2,0)	10,32 (1,2)	52,83 (35,0)
	C	13,76 (5,5)	10,32 (0,9)	27,47 (6,2)
2	A	12,90 (2,7)	12,04 (2,6)	69,02 (23,1)
	B	12,04 (1,8)	8,60 (0,5)	32,72 (4,5)
	C	17,20 (3,8)	10,32 (1,2)	34,46 (10,3)
3	A	14,62 (2,5)	13,76 (1,7)	37,28 (6,4)
	B	12,90 (2,4)	16,34 (2,9)	40,00 (10,9)
4	A	12,04 (3,2)	10,32 (1,0)	27,40 (10,6)
	B	11,18 (3,4)	8,60 (0,8)	15,80 (4,4)
	C	10,32 (0,9)	10,32 (1,0)	16,90 (4,7)
5	A	13,76 (3,2)	10,32 (0,7)	31,74 (9,9)
	B	12,90 (3,4)	11,18 (0,9)	41,55 (7,5)
6	A	10,32 (1,9)	10,32 (2,5)	36,24 (8,9)
	B	10,32 (3,3)	10,32 (1,1)	39,16 (7,7)
7	A	13,76 (3,2)	10,32 (1,4)	33,49 (10,3)
	B	11,18 (2,1)	10,32 (2,7)	36,83 (1,6)
	C	12,90 (3,6)	8,60 (1,3)	33,61 (7,5)
8	A	12,04 (1,1)	12,04 (1,4)	26,89 (15,1)
	B	11,18 (3,1)	10,32 (1,8)	37,31 (8,1)
	C	10,32 (1,2)	11,18 (1,7)	28,14 (6,8)

* DP: Desvio Padrão

Tabela 3. Caracterização morfológica dos clones do Lago Guaíba

Ponto	Clone	Diâmetro Médio dos Cistos (µm - DP)	Diâmetro Médio dos Trofozoítos (µm - DP)	Tempo Médio de Contração do Vacúolo Pulsátil (s - DP)
1	A	11,18 (2,5)	12,90 (2,0)	90,21 (22,6)
	B	13,76 (2,5)	12,04 (1,1)	52,19 (18,8)
	C	14,62 (2,6)	12,90 (2,6)	101,06 (17,4)
2	A	16,34 (3,8)	19,78 (3,7)	43,24 (14,6)
	B	15,48 (3,1)	17,20 (3,2)	102,17 (21,0)
	C	10,32 (2,0)	13,76 (2,8)	17,92 (1,36)
3	A	12,90 (2,0)	13,76 (2,8)	11,34 (3,8)
	B	8,60 (1,4)	11,18 (21,0)	12,40 (0,9)
	C	9,46 (3,1)	11,18 (1,7)	15,07 (2,2)
4	A	16,34 (3,3)	8,60 (1,1)	33,64 (8,2)
	B	10,32 (1,8)	10,32 (0,7)	41,77 (6,6)
	C	10,32 (1,7)	8,60 (1,0)	27,91 (12,7)
5	A	10,32 (0,7)	8,60 (3,3)	16,35 (18,9)
	B	10,32 (1,1)	10,32 (1,1)	26,55 (8,3)
	C	12,04 (3,3)	10,32 (1,5)	22,52 (6,5)
6	A	10,32 (1,9)	13,76 (2,2)	33,45 (9,9)
	B	13,76 (1,8)	10,32 (1,2)	31,78 (11,4)
	C	13,76 (1,7)	10,32 (2,1)	34,61 (11,0)
7	A	10,32 (1,2)	12,04 (1,8)	32,00 (11,9)
	B	12,04 (3,1)	9,46 (1,4)	33,49 (7,3)
	C	14,62 (1,8)	7,74 (2,0)	23,35 (14,3)
8	A	15,48 (3,8)	6,88 (0,9)	19,44 (5,1)
	B	10,32 (1,2)	12,04 (1,0)	9,43 (5,5)
	C	5,16 (0,0)	9,46 (1,4)	36,15 (10,6)
9	A	14,62 (2,2)	13,76 (3,5)	47,81 (5,2)

* DP: Desvio Padrão

5.5 Potencial de patogenicidade dos clones

O teste de termotolerância indicou tolerância térmica em ambas as temperaturas para nove dos clones do Arroio Dilúvio e oito do Lago Guaíba. Os demais apresentaram tolerância apenas para uma das temperaturas submetidas ou não apresentaram tolerância, a Tabela 4 e 5 detalha os resultados obtidos.

O teste de osmotolerância submetido a todos os clones indica que alguns deles apresentaram algum tipo de tolerância para ambas as concentrações. O seguinte critério foi utilizado na análise:

- : Nenhuma célula foi encontrada fora do halo de inoculação
- + : Crescimento inicial superior à 20 mm fora ao halo de inoculação
- ++ : Crescimento parcial na placa fora do halo de inoculação
- +++ : Crescimento por toda a superfície da placa

A diferenciação da patogenicidade dos isolados foi norteadada conforme os critérios estabelecidos e analisados por Khan, Jarroll & Paget (2001), que em seu estudo submeteram amebas do gênero *Acanthamoeba*, patogênicas e não patogênicas, a diferentes temperaturas e osmolaridades a fim de indicar o nível de patogenicidade das amebas em questão a partir da relação entre estes dois fatores.

Os resultados de tempo médio de contração do vacúolo pulsátil não tiveram relação com o crescimento dos clones em condições de baixa ou alta osmolaridade. Uma vez que o tempo de abertura do vacúolo teve resultados semelhantes entre os clones que cresceram e aos que não cresceram em 0,5 M e/ou a 1 M de manitol. Vale ainda ressaltar que os três clones com os maiores tempos de contrações dos vacúolos, não cresceram nas diferentes condições de manitol.

Nossa análise indicou que 21 dos clones (45%) estabeleceram crescimento a temperatura de 37 °C e 0,5 M de manitol, 21 clones (45%) cresceram a 42 °C e 10 (22%) exibiram crescimento em alta concentração de osmolaridade. Os clones que cresceram a 1 M de manitol e também cresceram a 42 °C (4%) foram considerados altamente patogênicos. Sendo estes, os clones B, do segundo ponto do Arroio Dilúvio e do quarto ponto do Lago Guaíba. Os clones que cresceram a 42 °C e não cresceram a 1 M de manitol (41%) ou

criaram a 1 M de manitol e não cresceram a 42 °C (17%) foram considerados com baixo potencial patogênico, e os que não cresceram a 42 °C e 1 M de manitol (30%), como não-patogênicos.

O controle positivo de isolado de referência ATCC 30010, referente à *Acanthamoeba castellanii* Neff obteve o resultado esperado, uma vez que é um isolado ambiental que não apresenta a característica de patogenicidade. No teste em questão, o isolado não obteve crescimento sob as condições de alta concentração osmolar (1 M) e em elevada temperatura (42° C).

O potencial de patogenicidade de um isolado pode ser relacionado a sua capacidade de virulência, uma vez que ele pode ser mais ou menos virulento a depender da sua habilidade de adaptação ao meio e de viabilidade no hospedeiro. Ou seja, fatores como temperatura elevada e alta osmolaridade, indicados neste estudo, têm por objetivo relacionar de maneira indireta a capacidade de crescimento desses microrganismos em ambientes com o seu potencial patogênico quando em contato com um possível hospedeiro (KHAN, 2006). Sendo assim, os dois clones que se mostraram potencialmente patogênicos ainda podem ser comparados entre si, uma vez que o clone do Lago Guaíba obteve um crescimento bem característico (+++) quando comparado ao do Arroio Dilúvio (+). Desta forma, é provável que o clone do Lago Guaíba seja o mais virulento em questão.

5.6 Extração do DNA e quantificação

O método de extração de DNA desenvolvido proporcionou uma concentração mínima extraída de 9,87 ng/μL (Clone C do Ponto 2 do Arroio Dilúvio) e máxima de 544,68 ng/μL (Clone A do Ponto 7 do Arroio Dilúvio). Porém alguns tiveram taxas abaixo do recomendável para se considerar um DNA puro, o que indica uma provável contaminação por compostos orgânicos ou agentes caotrópicos, possivelmente decorrente dos reagentes utilizados no método. Por conta dessas desproporções entre os rendimentos, é recomendável a otimização desse método para garantir uma melhor precipitação de DNA e com uma alta qualidade. O Apêndice C detalha as concentrações obtidas dos DNA dos clones.

Tabela 4. Patogenicidade dos clones do Arroio Dilúvio

Ponto	Clone	Crescimento em Temperatura		Crescimento em Manitol		Patogenicidade
		37° C	42° C	0,5 M	1,0 M	
1	A	S	S	-	-	Baixa
	B	N	N	-	-	Nenhuma
	C	S	S	-	-	Baixa
2	A	S	N	+++	-	Nenhuma
	B	S	S	+++	+	Alta
	C	S	N	-	-	Nenhuma
3	A	S	S	+++	-	Baixa
	B	S	S	+++	-	Baixa
4	A	S	N	-	-	Nenhuma
	B	N	N	-	-	Nenhuma
	C	N	N	-	-	Nenhuma
5	A	S	N	+	+++	Baixa
	B	S	N	+++	+++	Baixa
6	A	S	N	+++	-	Nenhuma
	B	S	S	++	-	Baixa
7	A	S	S	++	-	Baixa
	B	S	S	+	-	Baixa
	C	S	N	-	-	Nenhuma
8	A	N	N	+++	++	Baixa
	B	S	N	-	-	Nenhuma
	C	N	N	+++	+++	Baixa

* Conforme Khan, Jarroll & Paget, 2001.

Tabela 5. Patogenicidade dos clones do Lago Guaíba

Ponto	Clone	Crescimento em Temperatura		Crescimento em Manitol		Patogenicidade
		37° C	42° C	0,5 M	1,0 M	
1	A	S	S	-	-	Baixa
	B	S	S	++	-	Baixa
	C	S	N	-	-	Nenhuma
2	A	N	S	-	-	Baixa
	B	S	S	-	-	Baixa
	C	S	N	-	-	Nenhuma
3	A	S	N	+++	++	Baixa
	B	S	N	-	-	Nenhuma
	C	N	N	-	-	Nenhuma
4	A	S	N	+++	-	Nenhuma
	B	N	S	+++	+++	Alta
	C	S	S	-	-	Baixa
5	A	S	N	++	-	Nenhuma
	B	N	N	++	-	Nenhuma
	C	N	N	+++	+++	Baixa
6	A	S	S	++	-	Baixa
	B	S	S	+++	-	Baixa
	C	S	S	+++	-	Baixa
7	A	S	S	+++	-	Baixa
	B	N	S	-	-	Baixa
	C	S	S	+++	-	Baixa
8	A	S	N	+++	-	Nenhuma
	B	N	N	+++	+++	Baixa
	C	S	N	+++	+++	Baixa
9	A	N	S	-	-	Baixa

* Conforme Khan, Jarroll & Paget, 2001.

5.7 Identificação molecular

A Reação em Cadeia de Polimerase foi utilizada como ferramenta molecular para a identificação. A PCR foi realizada para todos os clones de todos os pontos amostrados. Por se tratar de clones, as PCR realizadas e positivas para uma determinada espécie não foram submetidas a novas análises com os primers específicos para os demais gêneros. Uma vez que nenhum isolado apresentou dimensões compatíveis a *Sappinia* spp. e *Paravahlkampfia* spp., os clones não foram testados para ambos os gêneros.

Através da PCR utilizando oligonucleotídeos específicos, dois clones do Arroio Dilúvio e um do Lago Guaíba foram positivos para o gênero *Acanthamoeba* spp. Quanto ao gênero *Vermamoeba*, foi positivo para 18 clones, sendo doze deles do Lago Guaíba. Um isolado do ponto 4 do Arroio Dilúvio foi positivo para *Naegleria* spp.

Por se tratarem de extrações feitas a partir de uma cultura monoxênica. Ou seja, que continha *E. coli* inativada como fonte de alimentação das AVL. A análise de endossimbionte contou, como controle do Domínio Bacteria, o mesmo referente à inoculação das placas no momento do cultivo. Desta forma, o resultado observado no gel de agarose mostrou bandas em dois clones com tamanhos distintos ao de *E. coli* utilizada como controle positivo. Como conclusão, estes dois clones foram sugestivos quanto à presença de endossimbiontes. Todos os resultados estão detalhados nas Tabelas 6 e 7.

Apesar de alguns clones apresentarem uma dimensão condizente com algumas AVL potencialmente patogênicas, não era esperado encontrar o gênero *Balamuthia*, uma vez que até o momento, o gênero foi isolado apenas de solo. Sendo assim, alguns clones foram negativos para todos os gêneros testados, e por isso foram classificados como “NÃO IDENTIFICADO (NI)”. Esse resultado sugere que os microrganismos encontrados seriam referentes a outros gêneros amebianos não classificados como potencialmente patogênicos.

Figura 10. Clone B do ponto 6 do Lago Guaíba, positivo para *Vermamoeba* sp.



Os resultados do PCR indicaram positividade para os gêneros *Acanthamoeba*, *Vermamoeba* e *Naegleria* no Arroio Dilúvio. E no Lago Guaíba, os gêneros *Acanthamoeba* e *Vermamoeba*.

Quase todos os pontos do Lago Guaíba foram positivos para *Vermamoeba* spp., com exceção do segundo e nono ponto de amostragem. E para *Acanthamoeba* spp., o quarto foi o único ponto positivo. O ponto 4, era um local com área para caminhada de pessoas, e durante a coleta foi possível observar a presença de aves, além de um animal morto na areia. O penúltimo (8) local de amostragem se tratava de um clube privado de Iate, local frequentemente utilizado por pessoas. Considerando que os pontos que apresentaram AVL são locais popularmente conhecidos por “praia” e normalmente utilizado por moradores e turistas durante o período do verão, momento em que as temperaturas são mais elevadas, são ambientes antropogênicos perfeitos para a infecção por esse tipo de microrganismos. Vale ressaltar ainda que o clone B do quarto ponto do Lago Guaíba que foi positivo para *Vermamoeba* spp. foi classificado como potencialmente patogênico.

Os pontos 1, 7 e 8 do Arroio Dilúvio foram positivos apenas para *Vermamoeba* spp. e os pontos 5 e 6 para *Acanthamoeba* spp., o quarto ponto foi positivo para *Vermamoeba* spp. e *Naegleria* sp. É importante destacar que embora o ponto 1 se trate de uma nascente e que

tenha apresentado a menor temperatura de água coletada (Apêndice A), no local havia a presença de animais durante o momento de coleta, o que sugere que a nascente é um ambiente tradicionalmente frequentado por mamíferos, sendo estes uma possível fonte de contaminação por inúmeros microrganismos. O ponto 4, o único em que foi possível isolar dois gêneros, se tratava do primeiro local completamente urbanizado composto por residências e empreendimentos, além de ser um ponto que antecede um hospital no município. O ponto 7 também se tratava de um local próximo a um hospital de instituição privada.

Apesar dos gêneros terem sido isolados de ambientes diferentes ao longo do Arroio Dilúvio e Lago Guaíba, não exclui a possibilidade da presença desses gêneros ao longo do fluxo d'água. Sendo assim, o ponto 4 do Arroio Dilúvio, identificado para a presença de *Naegleria* spp., foi apenas um local possível para isolamento deste gênero, porém por se tratar de um ambiente de sistema aquático lótico, ou seja, de fluxo contínuo, é de se esperar que se tenha o gênero *Naegleria* até o último ponto do Arroio Dilúvio, mesmo que não tenha sido possível de se isolar *Naegleria* spp. no ponto 8.

Tabela 6. Resultado do PCR dos clones do Arroio Dilúvio

Ponto	Clone	Resultado de PCR
1	A	NI
	B	NI
	C	<i>Vermamoeba</i>
2	A	NI
	B	NI
	C	NI
3	A	NI
	B	NI
4	A	<i>Naegleria^S</i>
	B	<i>Vermamoeba</i>
	C	<i>Vermamoeba^S</i>
5	A	NI
	B	<i>Acanthamoeba</i>
6	A	<i>Acanthamoeba</i>
	B	NI
7	A	NI
	B	NI / Endossimbionte
	C	<i>Vermamoeba</i>
8	A	NI
	B	<i>Vermamoeba</i> / Endossimbionte
	C	<i>Vermamoeba^S</i>

NI: Não Identificado; ^S: Amostra submetida ao sequenciamento.

Tabela 7. Resultado do PCR dos clones do Lago Guaíba

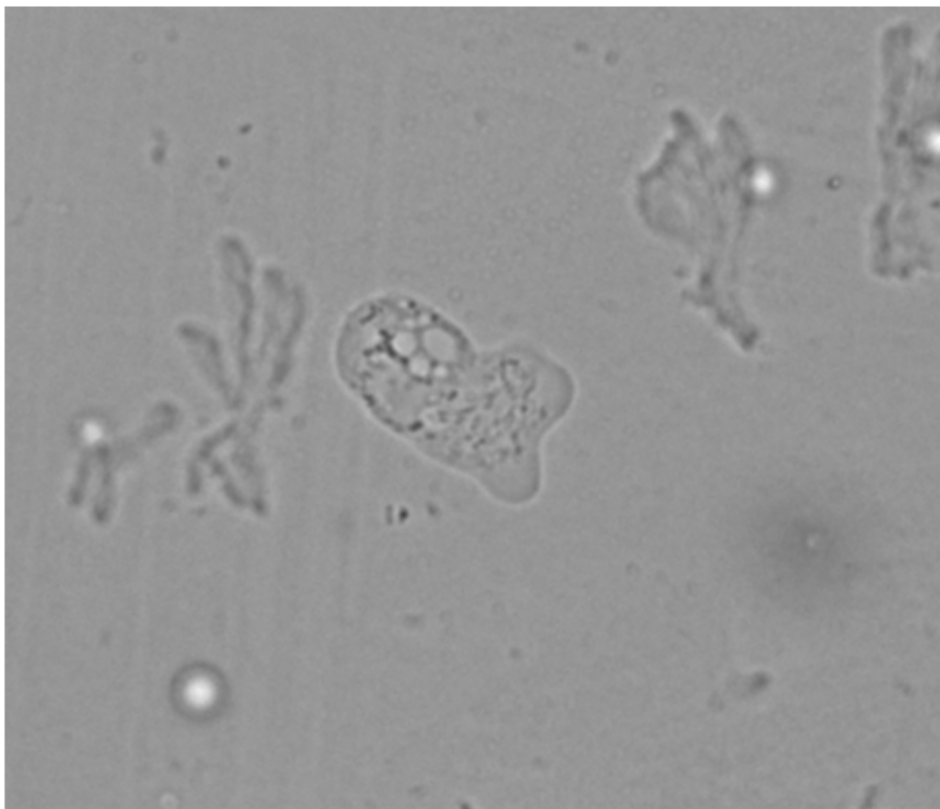
Ponto	Clone	Resultado de PCR
1	A	<i>Vermamoeba</i>
	B	<i>Vermamoeba</i>
	C	NI
2	A	NI
	B	NI
	C	NI
3	A	<i>Vermamoeba</i>
	B	NI
	C	NI
4	A	<i>Acanthamoeba</i>
	B	<i>Vermamoeba</i>
	C	NI
5	A	NI
	B	<i>Vermamoeba</i>
	C	NI
6	A	NI
	B	<i>Vermamoeba</i>
	C	<i>Vermamoeba</i>
7	A	<i>Vermamoeba</i>
	B	<i>Vermamoeba</i>
	C	NI
8	A	<i>Vermamoeba</i>
	B	<i>Vermamoeba</i> ^S
	C	<i>Vermamoeba</i>
9	A	NI

NI: Não Identificado; ^S: Amostra submetida ao sequenciamento.

5.8 Exibição dos flagelos da *Naegleria*

O teste de exflagelação foi realizado apenas para o clone que apresentou positividade por PCR para o gênero *Naegleria*. Após uma hora do início do teste de exflagelação, foi possível visualizar a fase flagelar do isolado do ponto 4 do Arroio Dilúvio. Essa é uma característica importante pois é uma fase presente em apenas algumas espécies do gênero, inclusive na espécie causadora da Meningoencefalite Amebiana Primária, a *N. fowleri*.

Figura 11. Trofozoíto do clone positivo para *Naegleria* spp.

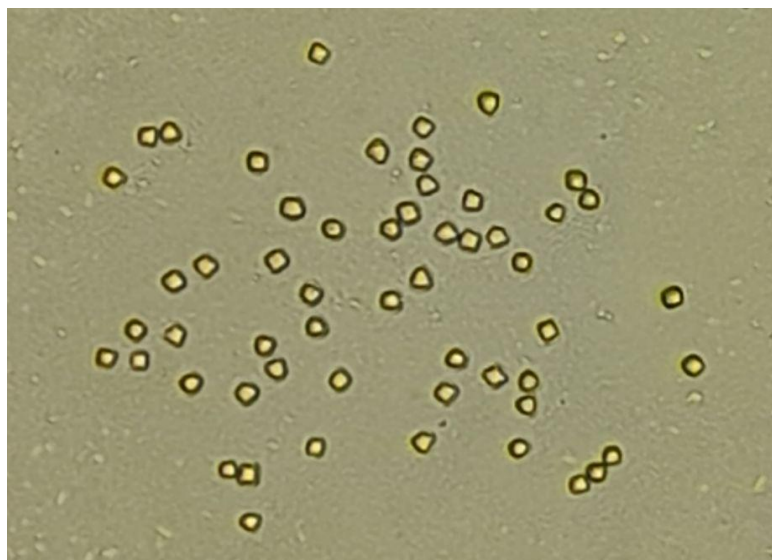


A transformação para a fase flagelada é transitória, e por isso se acredita que os flagelos, que podem ser vistos ocasionalmente, auxiliam na dispersão da ameba no ambiente em busca de nutrientes. Como a habilidade de se transformar na fase flagelar pode ser perdida, a identificação desse gênero se baseia no sequenciamento de regiões internas transcritas (ITS) (TRABELSI *et al.*, 2012; JONCKHEERE, 2004).

5.9 Classificação morfológica segundo Pussard & Pons

A classificação de Pussard & Pons (1977), que divide o gênero *Acanthamoeba* em três grupos de acordo com as dimensões e os aspectos morfológicos gerais dos cistos, foi utilizada para as amostras que foram positivas para *Acanthamoeba*. Dos isolados que foram positivos para *Acanthamoeba*, o clone B do ponto 5 do Arroio Dilúvio apresentou cistos com endocistos quadrangulares, pentagonais, triangulares e arredondados, característico do Grupo II da classificação; e o clone A do ponto 6 do Arroio Dilúvio e o único clone positivo do Lago Guaíba, apresentaram cistos ovais e quadrangulares, ambos também pertencentes do grupo II.

Figura 12. Morfologia dos cistos do clone B do ponto 5 do Arroio Dilúvio, positivo para *Acanthamoeba* spp.



5.10 Sequenciamento dos amplicons obtidos

Dentre os 22 clones que foram positivos para algum gênero, quatro deles foram selecionados arbitrariamente para o sequenciamento. Três representantes do gênero *Vermamoeba* e um do gênero *Naegleria*. As sequências de Forward e Reverse foram analisadas junto ao banco de dados do Blast para a indicação de uma possível espécie.

Conforme apresentado na Tabela 8, três isolados obtiveram uma identidade superior à 98% para *Vermamoeba vermiformis*, sendo similares à mesma sequência já descrita no GenBank. E a única espécie positiva para *Naegleria* spp. teve a sequência reversa, uma identidade superior à 93% para a espécie *Naegleria gruberi*.

Tabela 8. Análise da identidade dos clones

Clone	Nome científico	Sequência comparada no GenBank	Cobertura	Valor de E	Identidade
AD4A_F	<i>Naegleria gruberi</i>	MG699123.1	97%	0.0	98.92%
AD4A_R	<i>Naegleria gruberi</i>	MG699123.1	96%	1e-161	93.82%
AD4C_F	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	DQ407567.1	97%	0.0	99.78%
AD4C_R	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	MG969826.1	96%	0.0	99.56%
AD8C_F	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	MK418871.1	95%	0.0	98.68%
AD8C_R	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	MK418871.1	95%	0.0	98.90%
LG8B_F	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	MK418871.1	97%	0.0	99.78%
LG8B_R	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	MK418871.1	96%	0.0	99.78%

* AD4A: Arroio Dilúvio, ponto 4, clone A; AD4C: Arroio Dilúvio, ponto 4, clone C; AD8C: Arroio Dilúvio, ponto 8, clone C; e LG8B: Lago Guaíba, ponto 8, clone B.

** F e R: indica se a sequência é Forward (F) ou Reverse (R).

Tabela 9. Registros dos depósitos no GenBank

Clone	Nome científico	Registro no GenBank
AD4A_F	<i>Naegleria gruberi</i>	OP985783
AD4A_R	<i>Naegleria gruberi</i>	OP994306
AD4C_F	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	OP984080
AD4C_R	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	OP984113
AD8C_F	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	OP984114
AD8C_R	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	OP984115
LG8B_F	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	OP984125
LG8B_R	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	OP984126

* Nomenclatura igual a apresentada na Tabela 8.

Devida a função predadora a outros microrganismos, incluindo fungos, bactérias, algas, protozoários e a outras partículas orgânicas, as amebas contribuem para o equilíbrio da biosfera (PICKUP, PICKUP & PARRY, 2007). Porém, graças às características de

internalização de patógenos e a patogenicidade de algumas espécies de AVL, esses microrganismos têm sido pesquisados ao longo dos anos, em diferentes ambientes e em diferentes partes do mundo.

Panda *et al.* (2015) realizou uma série de coletas em lagos e lagoas ao norte da Índia. Do total de 107 amostras coletadas, 43 foram positivas para AVL por cultura. A partir do diagnóstico molecular foi indicado que dos isolados, 37 foram positivos para o gênero *Naegleria*. Dessas amostras, as sequências de 10 amplicons foram analisadas, nove delas foram homólogas à *N. australienses* e uma à *N. fowleri*. No Brasil, Bellini *et al.* (2020) revelou a presença de quatro espécies distintas de *Naegleria* spp. em um rio localizado no interior de São Paulo, sendo um deles identificado como sendo *N. gruberi*.

Javanmard *et al.* (2017) em sua pesquisa que abrangeu diferentes corpos hídricos, apontou a *Vermamoeba vermiformis*, espécie termotolerante, como a ameba de vida livre mais detectada, ficando acima de outros gêneros, como *Acanthamoeba* e *Naegleria*. E ainda, relacionou seus resultados com casos de ceratite por *V. vermiformis* relatados em diferentes ocasiões na mesma região de realização de seu estudo.

Em uma pesquisa conduzida em três países do sudeste asiático, Majid *et al.* (2017) conseguiu isolar AVL de água não-tratada (água de chuva, nascentes, poços, lagos, rios, cachoeiras e canais). Dos 68 isolados, dois foram positivos para *V. vermiformis*, três para *Acanthamoeba lenticulata* e um para *Acanthamoeba triangularis*. No entanto, uma outra pesquisa realizada na República Centro-Africana (FARRA *et al.*, 2007), não obteve sucesso no isolamento de espécies de *Naegleria* e *Acanthamoeba*. Ou seja, por mais que as AVL sejam espécies ubíquas, e o ambiente estudado na pesquisa de Farra *et al.* (2007) seja um local com condições favoráveis ao crescimento desses microrganismos, não se foi possível identificar espécies patogênicas.

É importante salientar que no Brasil poucas pesquisas ambientais foram feitas até o momento para um levantamento e mapeamento de AVL patogênicas em ambientes aquáticos e antropogênicos. Sendo ainda, este é o primeiro estudo em fontes naturais realizado no Rio Grande do Sul - Brasil.

Apesar de alguns estudos não identificarem AVL patogênicas em alguns ambientes naturais, é importante destacar que esses microrganismos possuem a capacidade de hospedar

outros microrganismos patogênicos. O que pode intensificar alguma característica desse endossimbionte ou promover algum tipo de benefício para o mesmo, a exemplo de: proteção contra ambiente hostil, persistência intracelular e/ou em co-cultura, replicação intracelular, aumento do crescimento, multiplicação e disseminação de bactérias. Em endossimbiontes fúngicos, pode promover o aumento do crescimento em co-cultura e, o processo de filamentação. E ainda, a endossimbiose pode auxiliar na proliferação dos vírus (DELAFONT *et al.* 2018).

Cerva *et al.* (1969) isolou uma cepa patogênica de *Naegleria gruberi* de um menino de onze anos com meningoencefalite amebiana aguda que veio a óbito poucos dias após a infecção. Em continuação ao estudo, Cerva (1971), cultivou e axenizou esta cepa para estudos de patogenicidade em animais a fim de revelar se a virulência e as propriedades patogênicas da cepa podem causar uma infecção semelhante à de animais como ocorreu ao menino. Apesar de não existir muito estudo em que aponte *N. gruberi* como agente de alguma doença, ela aqui foi reportada por causar uma infecção semelhante à promovida por *Acanthamoeba castellanii*.

Como resultado, esse estudo aponta a presença de outros dois microrganismos, sendo um deles responsável por promover ou intensificar alguma outra doença pré-existente (*V. vermiformis*). Outro gênero patogênico, como *Acanthamoeba* spp., também foi indicado por meio de oligonucleotídeos de gênero-específico. Esses resultados demonstram que esses ambientes do estudo são meios ideais para a promoção de agentes causadores de doenças promovida por AVL quando em contato com um possível hospedeiro.

Por mais que as amebas de vida livre sejam microrganismos que podem ser encontrados em diferentes ambientes e em diversas partes do mundo, ainda não se dispõe de muitos estudos que indicam que a maior prevalência das AVL encontradas, sejam compostas por espécies potencialmente patogênicas. Isso pode ser um indicativo do porquê as infecções por esses grupos são mais raras e locais. Porém, ainda é preocupante a dificuldade de diagnosticar com precisão e rapidez os agentes causadores dessas infecções que acometem o sistema nervoso central e que possuem como principal característica a fatalidade do hospedeiro.

6. CONCLUSÃO

O uso de técnicas bem estabelecidas para o cultivo permitiu o isolamento de AVL em todos os pontos de amostragem.

O método de análise de patogenicidade usando os testes de termotolerância e osmotolerância foi conclusivo para a presença de amebas potencialmente patogênicas em ambas as áreas de estudo.

O teste de exflagelação do isolado positivo para *Naegleria* spp. proporcionou a visualização da AVL em seu estágio flagelar.

Os isolados identificados por PCR como sendo do gênero *Acanthamoeba* foram classificados conforme a análise morfológica pertencentes ao grupo taxonômico II.

A análise molecular indicou a presença de três gêneros de grande importância: *Acanthamoeba*, *Vermamoeba* e *Naegleria*.

O sequenciamento indicou que parte dos isolados obtidos eram compostos pelas espécies: *Vermamoeba vermiformis* (3) e *Naegleria gruberi* (1).

Esse estudo apresenta uma importância epidemiológica e ambiental, uma vez que os gêneros presentes nessas duas áreas possuem espécies que são responsáveis por infecções que acometem tanto os seres humanos quanto a outros animais. Dessa forma, esses ambientes aquáticos e antropogênicos, que são frequentemente utilizados como recreativos, podem servir como meios para a transmissão e contaminação por AVL, o que fornece informações valiosas para a saúde pública da cidade. Por se tratar de um primeiro estudo ambiental no Rio Grande do Sul, é sugerido a realização de novas pesquisas para um levantamento de outros ambientes naturais e antropogênicos que também estejam propensos a contaminação por AVL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADL, S. M.; SIMPSON, A. G. B.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R. A.; ANDERSON, O. R.; BARTA, J. R.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R. A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T. Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C. E.; LEWIS, L. A.; LODGE, J.; LYNN, D. H.; MANN, D. G.; MCCOURT, R. M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, Ø.; MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; NERAD, T. A.; SHEARER, C. A.; SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. W. ; TAYLOR, M. F. J. R. **The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists.** Reino Unido: Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 52, n. 5, p. 399-451, 2005.

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

BARKER, J.; BROWN, M. R. W. **Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment.** Reino Unido: Microbiology, v. 140, n. 6, p. 1253-1259, 1994.

BASSO, L. A.; MOREIRA, L. G. R.; PIZZATO, F. **A influência da precipitação na concentração e carga de sólidos em cursos d'água urbanos: o caso do arroio Dilúvio, Porto Alegre-RS.** Florianópolis, SC: Geosul, v. 26, n. 52, p. 145-163.

BELLINI, N. K.; FONSECA, A. L. M. DA; REYES-BATLLE, M.; LORENZO-MORALES, J.; ROCHA, O.; THIEMANN, O. H. **Isolation of *Naegleria* spp. from a brazilian water source.** Suíça: Pathogens, v. 9, n. 2, p. 1-13, 2020.

BOOTON, G. C.; CARMICHAEL, J. R.; VISVESVARA, G. S., BYERS, T. J.; FUERST, P. A. **Identification of *Balamuthia mandrillaris* by PCR assay using the mitochondrial 16S rRNA Gene as a Target.** EUA: Journal of Clinical Microbiology, v. 41, n. 1, p. 453-455, 2003.

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. EUA: Journal of Clinical Microbiology, v. 43, n. 4, p. 1689-1693, 2005.

CALIXTO, P. H. M.; TRINDADE, F. R.; BALLARINI, A. J.; DIAS, C. A. G. DE M.; CAMPOS, C. E. C.; OLIVEIRA, J. C. S. DE. **Aspectos biológicos das principais amebas de vida-livre de importância médica.** Macapá, AP: Biota Amazônica, v. 4, n. 2, p. 124-129, 2014.

CARLI, G. A. de. **Parasitologia clínica:** seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas. 2ª ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2011.

CARNT, N.; STAPLETON, F. **Strategies for prevention of contact lens-related *Acanthamoeba keratitis*: a review.** Reino Unido: Ophthalmic and Physiological Optics, v. 36, n. 2, p. 77-92, 2015.

CASTRLLÓN, J. C.; OROZCO, L. P. ***Acanthamoeba* spp. como parasitos patógenos y oportunistas.** Chile: Revista Chilena de Infectología, v. 30, n. 2, p. 147-155, 2013.

CATEAU, E.; MAISONNEUVE, E.; PEGUILHAN, S.; QUELLARD, N.; HECHARD, Y.; RODIER, H. M. ***Stenotrophomonas maltophilia* and *Vermamoeba vermiformis* relationships: Bacterial multiplication and protection in amoebal-derived structures.** França: Research in Microbiology, v. 165, n. 10, p. 847-851, 2014.

CENTENO, M.; RIVERA, F.; CERVA, L.; TSUTSUMI, V.; GALLEGOS, E.; CALDERÓN, A.; ORTIZ, R.; BONILLA, P.; RAMÍREZ, E.; SUÁREZ, G. ***Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia.** EUA: Archives of Medical Research, v. 27, n. 4, p. 579-586, 1996.

CERVA, L. **Amoebic meningoencephalitis: axenic culture of *Naegleria*.** EUA: Science, v. 163, n. 3867, p. 576, 1969.

CERVA, L. **Experimental infection of laboratory animals by the pathogenic *Naegleria gruberi* strain Vitek.** República Tcheca: Folia Parasitologica, v. 18, p. 171-178, 1971.

COOK, G. C. **Effect of global warming on the distribution of parasitic and other infectious diseases: a review.** Reino Unido: Journal of the Royal Society of Medicine, v. 85, p. 688-691, 1992.

COPE, J. R.; LANDA, J.; NETHERCUT, H.; COLLIER, S. A.; GLASER, C.; MOSER, M.; PUTTAGUNTA, R.; YODER, J. S.; ALI, I. K.; ROY, S. L. **The Epidemiology and Clinical Features of *Balamuthia mandrillaris* Disease in the United States, 1974-2016.** Reino Unido: Clinical Infectious Diseases, v. 68, n. 11, p. 1815-1822, 2019.

DELAFONT, V.; RODIER, M.; MAISONNEUVE, E.; CATEAU, E. ***Vermamoeba vermiformis*: a Free-Living Amoeba of Interest.** EUA: Microbial Ecology, v. 76, n. 4, p. 991-1001, 2018.

DIEHL, M. L.; PAES, J.; ROTT, M. B. **Single cell cloning of free-living amoebae with isolated square agar.** Alemanha: Parasitology Research v. 120, p. 3331-3333, 2021.

FARRA, A.; BEKONDI, C.; TRICOU, V.; MBECKO, J. R.; TALARMIN, A. **Free-living amoebae isolated in the Central African Republic: epidemiological and molecular aspects.** Nigéria: Pan African Medical Journal, v. 26, n. 57, 2017.

FOWLER, M.; CARTER, R. F. **Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.:** a preliminary report. Reino Unido: British Medical Journal, v. 2, p. 740-743, 1965.

GAJDATSY, A. D.; KOSMIN, A.; BARRETT, G. D. **Coexistent adenoviral keratoconjunctivitis and *Acanthamoeba* keratitis.** Reino Unido: Clinical and Experimental Ophthalmology, v. 28, n. 6, p. 434-436, 2000.

GELMAN, B. B.; RAUF, S. J.; NADER, R.; POPOV, V.; BOKOWSKI, J.; CHALJUB, G.; NAUTA, H.W. **Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*.** EUA: JAMA - Journal of the American Medical Association, v. 285, n. 19, p. 2450-2451, 2001.

GREUB, G.; RAOULT, D. **Microorganisms resistant to free-living amoebae.** EUA: Clinical Microbiology Reviews, v. 17, n. 2, p. 413-433, 2004.

HENKER, L. C.; CRUZ, R. A. S. da.; SILVA, F. S. da.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L.; UZAL, F. A.; PAVARINI, S. P. **Meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* in cattle in southern Brazil**. Jaboticabal, SP: Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, v. 28, n. 3, p. 514-517, 2019.

HIDROWEB, Agência Nacional de Águas (ANA). **Estação Pluviométrica de Porto Alegre**. Disponível em: <<http://www.snirh.gov.br/hidroweb/serieshistoricas>>. Acesso em: 5 mai 2022.

INOUE, T.; ASARI, S.; TAHARA, K.; HAYASHI, K.; KIRITOSHI, A.; SHIMOMURA Y. ***Acanthamoeba keratitis with symbiosis of Hartmannella amoeba***. EUA: American Journal of Ophthalmology, v. 125, n. 5, p. 721-723, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – INMET. **Dados Históricos Anuais**. Disponível em: <<https://portal.inmet.gov.br/dadoshistoricos>>. Acesso em: 5 mai 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Cidade Porto Alegre**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rs/porto-alegre.html>>. Acesso em: 14 fev 2022.

JAGER, B. V.; STAMM, W. P. **Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease**. Reino Unido: The Lancet, v. 300, n. 7791, p. 1343-1345, 1972.

JAVANMARD, E; NIYYATI, M; LORENZO-MORALES, J; LASJERDI, Z; BEHNIAFAR, H; MIRJALALI, H. **Molecular identification of waterborne free living amoebae (*Acanthamoeba*, *Naegleria* and *Vermamoeba*) isolated from municipal drinking water and environmental sources, Semnan province, north half of Iran**. EUA: Experimental Parasitology, v. 183, p. 240-244, 2017.

JONCKHEERE, J. F. de. **Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria***. Alemanha: Protist, v. 55, n. 1, p. 89-103, 2004.

JONCKHEERE, J. F. de. **What do we know by now about the genus *Naegleria*?** EUA: Experimental Parasitology, v. 145, p. S2-S9, 2014.

JONES, D. B.; VISVESVARA, G. S.; ROBINSON, N. M. ***Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis.** Reino Unido: Transactions of the Ophthalmological Societies of the United Kingdom, v. 95, n. 2, p. 221-232, 1975.

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

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

KUIPER, M. W.; VALSTER, R. M.; WULLINGS, B. A.; BOONSTRA, H.; SMIDT, H.; KOOIJ, D. van der. **Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using Real-Time PCR.** EUA: Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 9, 2006.

LORENZO-MORALES, J.; CORONADO-ÁLVAREZ, N.; MARTÍNEZ-CARRETERO, E.; MACIVER, S. K.; VALLADARES, B. **Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain.** EUA: American Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 77, n. 4, p. 753-756, 2007.

LORENZO-MORALES, J.; MARTÍNEZ-CARRETERO, E.; BATISTA, N.; ÁLVAREZ-MARÍN, J.; BAHAYA, Y.; WALOCHNIK, J.; VALLADARES, B. **Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*.** Alemanha: Parasitology Research, v. 102, n. 1, p. 167-169, 2007.

LOVIENO, A.; LEDEE, D. R.; MILLER, D.; ALFONSO, E. C. **Detection of bacterial endosymbionts in clinical *Acanthamoeba* isolates.** EUA: Ophthalmology, v. 117, n. 3, p. 445-452, 2010.

LOZANO-ALARCÓN, F.; BRADLEY, G. A.; HOUSER, B. S.; VISVESVARA, G. S. **Primary Amebic Meningoencephalitis Due to *Naegleria fowleri* in a South American Tapir.** EUA: Veterinary Pathology, v. 34, n. 3, p. 239-243, 1997.

MAJID, M. A. A.; MAHBOOB, T.; MONG, B. G. J.; JATURAS, N.; RICHARD, R. L. TIAN-CHYE, T.; PHIMPHILA, A.; MAHAPHONH, P.; AYE, K. N.; AUNG, W. L.; CHUAH, J.; ZIEGLER, A. D.; YASIRI, A.; SAWANGJAROEN, N.; LIM, Y. A. L.; NISSAPATORN, V. **Pathogenic waterborne free-living amoebae: an update from selected southeast asian countries.** EUA: Plos One, v. 12, n. 5, 2017.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. **Acanthamoeba spp. as agent of disease in humans.** EUA: Clinical Microbiology Reviews, v. 16, n. 2, 2003.

MARTINEZ, A. J. **Infection of the central nervous system due to Acanthamoeba.** EUA: Reviews of Infections Diseases, v. 13, p. S399-S402, 1991.

MENEGAT, R.; PORTO, M.L.; CARRARO, C.C.; FERNANDES, L.A.A. (Coords.). **Atlas ambiental de Porto Alegre.** 3ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/atlas/atlas_digital.html>. 2006.

NAGINTON, J.; WATSON, P. G.; PLAYFAIR, T. J.; MCGILL, J.; JONES, B. R.; STEELE, A. D. McG. **Amoebic infection of the eye.** Reino Unido: The Lancet, v. 304, n. 7896, p. 1537-1540, 1974.

NICOLODI, João Luiz. **O padrão de ondas no Lago Guaíba e sua influência nos processos de sedimentação.** 2007. 195 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/10817>>.

PAGE, F. C. **A new key to freshwater and soil amoebae.** Reino Unido: Freshwater Biological Association Scientific, p. 122, 1988.

PAGE, F. C.; SIEMENSMA, F. J. **Nackte Rhizopoda und Heliozoa.** Alemanha: Gustav Fischer Verlag, v. 2, 1991.

PAGE, F. C. **Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species of Hartmannella and 3 of Vahlkampfia.** EUA: The Journal of Protozoology, v. 14, n. 3, p. 499-521, 1967.

PAGNIER, I.; VALLES, C.; RAOULT, D.; SCOLA, B. la. **Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water**. EUA: Microbial Pathogenesis, v. 80, p. 14-20, 2015.

PANDA, A.; KHALIL, S.; MIRDHA, B. R.; SINGH, Y.; KAUSHIK, S. **Prevalence of *Naegleria fowleri* in environmental samples from northern part of India**. EUA: Plos One, v. 10, n. 10, 2015.

PATZ, J. A. **Effects of environmental change on emerging parasitic diseases**. Reino Unido: International Journal for Parasitology, v. 20, p. 1395-1405, 2000.

PÉLANDAKIS, M.; SERRE, S.; PERNIN, P. **Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri***. Reino Unido: Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 47, n. 2, p. 116-121, 2000.

PICKUP, Z. L.; PICKUP, R.; PARRY, J. D. **Growth of *Acanthamoeba* and *Hartmannella vermiformis* on live, heat-killed and DTAF-stained bacterial prey**. Reino Unido: FEMS Microbiology Ecology, v. 61, n. 2, p. 264-272, 2007.

PIMENTEL, L. A.; DANTAS, A. F.; UZAL, F.; RIET-CORREA, F. **Meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in cattle of northeast Brazil**. Países Baixos: Research in Veterinary Science, v. 93, n. 2, p. 811-812, 2012.

PUSSARD, M.; PONS, R. **Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida)**. França: Protistologica, v. 13, p. 557-598, 1977.

QVARNSTROM, Y.; SILVA, A. J. da; SCHUSTER, F. L.; GELMAN, B. B.; VISVESVARA, G. S. **Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis**. EUA: The Journal of Infectious Diseases, v. 199, n. 8, p. 1139-1142, 2009.

RODRÍGUEZ-ZARAGOZA S. **Ecology of free-living amoebae**. Reino Unido: Critical Reviews in Microbiology, v. 20, n. 3, p. 225-241, 1994.

SANTOS, D. L. dos; KWITKO, S.; MARINHO, D. R.; ARAÚJO, B. S. de; LOCATELLI, C. I.; ROTT, M. B. ***Acanthamoeba* keratitis in Porto Alegre (southern**

Brazil): 28 cases and risk factors. Alemanha: Parasitology Research, v. 117, p. 747-750, 2018.

SCHEID, P.; SCHWARZENBERGER, R. ***Acanthamoeba* spp. as vehicle and reservoir of adenoviruses.** Alemanha: Parasitology Research, v. 111, p. 479-485, 2012

SCHEID, P. L.; LÂM, T.; SINSCH, U.; BALCZUN, C. ***Vermamoeba vermiformis* as etiological agent of a painful ulcer close to the eye.** Alemanha: Parasitology Research, v. 118, n. 6, p. 1999-2004, 2019.

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

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. **Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*.** Reino Unido: Parasites and Vectors. v. 5, n. 6, 2012.

SILVA, M. A.; ROSA, J. A. **Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais.** São Paulo, SP: Revista de Saúde Pública, v. 37, p. 242-246, 2003.

SMIRNOV, A. V.; CHAO, E.; NASSONOVA, E. S.; CAVALIER-SMITH, T. **A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: Lobosa).** Alemanha: Protist v. 162, n. 4, p. 545-570, 2011.

STAGGEMEIER, R.; ARANTES, T.; CAUMO, K. S.; ROTT, M. B.; SPILKI, F. R. **Detection and quantification of human adenovirus genomes in *Acanthamoeba* isolated from swimming pools.** Rio de Janeiro, RJ: Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 88, p. 635-641, 2016.

STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUK, J. D.; MALLIARIS, S. D.; CASADEVALL, A. **Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*.** EUA: Infection and Immunity, v. 72, n. 6, p. 3478-3488, 2004.

TRABELSI, H.; DENDANA, F.; SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; CHEIKHROUHOU, F.; NEJI, S.; MAKNI, F.; AYADI, A. **Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review.** França: Pathologie Biologie, v. 60, n. 6, p. 399-405, 2012.

VISVESVARA, G. S. **Classification of Acanthamoeba.** EUA: Reviews of Infections Diseases, v. 13, p. S369-S372, 1991.

VISVESVARA, G. S.; MARTINEZ, A. J.; SCHUSTER, F. L.; LEITCH, G. J.; WALLACE, S. V.; SAWYER, T. K.; ANDERSON, M. **Leptomyxid ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals.** EUA: Journal of Clinical Microbiology, v. 28, n. 12, p. 2750-2756, 1990.

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

VISVESVARA, G. S.; SCHUSTER, F. L. **Opportunistic free-living amebae, part I.** EUA: Clinical Microbiology Newsletter, v. 30, n. 20, p. 151-158, 2008a.

VISVESVARA, G. S.; SCHUSTER, F. L. **Opportunistic free-living amebae, part II.** EUA: Clinical Microbiology Newsletter, v. 30, n. 21, p. 159-166, 2008b.

VISVESVARA, G. S.; SCHUSTER, F. L.; MARTINEZ, A. J. ***Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals.** Reino Unido: Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 40, n. 4, p. 504-514, 1993.

VISVESVARA, G. S.; SRIRAM, R.; QVARNSTROM, Y.; BANDYOPADHYAY, K.; SILVA, A. J. da; PIENIAZEK, N. J.; CABRAL, G. A. ***Paravahlkampfia francianae* n. sp. masquerading as an agent of primary amoebic meningoencephalitis.** EUA: The Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 56, n. 4, p. 357-366, 2009.

WALOCHNIK, J.; WYLEZICH, C.; MICHEL, R. **The genus *Sappinia*: history, phylogeny and medical relevance.** EUA: Experimental Parasitology, v. 126, p. 4-13, 2010.

WEISBURG, W. G.; BARNS S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE. D. J. **16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study**. *EUA: Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WINIECKA-KRUSNELL, J.; DELLACASA-LINDBERG, I.; DUBEY, J. P.; BARRAGAN, A. ***Toxoplasma gondii*: uptake and survival of oocysts in free-living amoebae**. *EUA: Experimental Parasitology*, v. 121, n. 2, p. 124-131, 2009.

WYLEZICH, C.; WALOCHNIK, J.; MICHEL, R. **High genetic diversity of *Sappinia*-like strains (Amoebozoa, Thecamoebidae) revealed by SSU rRNA investigations**. *Alemanha: Parasitology Research*, v. 105, n. 3, p. 869-873, 2009.

APÊNDICE A

Descrição dos pontos de coleta

Ponto do Arroio Dilúvio	Latitude	Longitude	pH	Temperatura da água (°C)
1	30° 6' 3.44" S	51° 4' 57.60" O	6	21
2	30° 4' 44.43" S	51° 7' 2.63" O	7	30
3	30° 4' 14.77 "S	51° 8' 17.18" O	7	30
4	30° 3' 21.08 "S	51° 9' 34.82" O	7	30
5	30° 3' 29.20" S	51° 11' 1.56" O	7	30
6	30° 2' 54.75" S	51° 11' 47.23" O	6	30
7	30° 2' 51.05" S	51° 12' 50.03" O	7	30
8	30° 2' 51.21" S	51° 13' 48.54" O	7	30

Ponto do Lago Guaíba	Latitude	Longitude	pH	Temperatura da água (°C)
1	30° 14' 34.20 "S	51° 4' 42.68" O	7	25
2	30° 12' 52.39 "S	51° 10' 48.59" O	6	27
3	30° 12' 36.09" S	51° 11' 59.75" O	6	29
4	30° 9' 14.41 "S	51° 13' 32.21" O	6	27
5	30° 8' 16.67 "S	51° 13' 50.56" O	6	26
6	30° 7' 25.46" S	51° 15' 19.66" O	6	25
7	30° 7' 17.36" S	51° 15' 41.14" O	6	26
8	30° 5' 45.52" S	51° 15' 12.81" O	6	27
9	30° 4' 33.75" S	51° 14' 39.32" O	6	26

APÊNDICE B

Protocolo de Extração de DNA Genômico para Amebas de Vida Livre

Material:

- Caixa de isopor com gelo
- PBS 1X (Solução de tampão fosfato-salina)
- Raspador de células
- Micropipeta de 1000 μ L e 20 μ L
- Ponteira de 1000 μ L e 20 μ L
- Tubo Falcon de 15mL
- Tubo Eppendorf de 2mL
- Proteinase K
- SDS 20% (Docedil Sulfato de Sódio)
- Precipitação proteica (3M acetato de potássio com 6,6 M ácido acético glacial)
- Etanol absoluto 99% gelado
- Etanol 70% gelado
- TE (10mM de Tris HCl e 1mM de EDTA)
- RNase

Metodologia:

- 1) Coloque a placa com as amebas invertida sobre o gelo
- 2) Adicione 3mL de PBS 1X dentro da placa
- 3) Após 10 minutos, use um raspador de células para desprender as amebas da superfície do ágar
- 4) Com o auxílio de uma micropipeta retire todo o conteúdo de PBS 1X e passe para um tubo Falcon de 15mL
- 5) Centrifugue o tubo à 1800rpm por 10 minutos
- 6) Descarte o sobrenadante, restando apenas o pellet

- 7) Ressuspenda o pellet adicionando ao tubo, 500 μ L de PBS 1X (certifique que o pellet conseguiu se homogeneizar, caso não tenha sido, homogeneíze gentilmente de maneira manual)
- 8) Colete 300 μ L do conteúdo e transfira para um tubo Eppendorf de 2mL
- 9) Adicione 2,2 μ L de proteinase K e 500 μ L de SDS 20% no Eppendorf
- 10) Homogeneíze no vórtex e incube em banho-maria por 1 hora e 30 minutos à 60°C
- 11) Adicione no microtubo, 800 μ L de clorofórmio e agite no vórtex
- 12) Adicione 350 μ L de precipitação proteica e chacoalhe 3 vezes o microtubo manualmente
- 13) Submeta o microtubo à uma centrifugação de 11000rpm por 5 minutos
- 14) Transfira o sobrenadante (aproximadamente 1mL) à um novo tubo Eppendorf de 2mL e descarte o antigo contendo o restante do conteúdo
- 15) Adicione 1mL de etanol absoluto gelado e homogeneíze por inversão durante 2 minutos
- 16) Centrifugue novamente o microtubo, por 15 minutos à 11000rpm
- 17) Retire o sobrenadante (aproximadamente 2mL) e descarte
- 18) Adicione 1mL de etanol 70% gelado ao microtubo contendo o pellet
- 19) Centrifugue o microtubo à 11000rpm por 2 minutos
- 20) Despreze o sobrenadante (aproximadamente 1mL)
- 21) Inverta o Eppendorf e deixe o pellet secar por 10 minutos
- 22) Adicione no microtubo, 30 μ L de TE e 3 μ L de RNase
- 23) Incube-o à 37°C por 1 hora

Obs.: As etapas de 1 ao 8 devem ser realizadas em um ambiente estéril de capela de fluxo laminar.

APÊNDICE C

Concentração dos DNA dos clones

Tabela i. Quantificação do DNA extraído do Arroio Dilúvio

Ponto	Clone	Taxa A260/A280	Taxa A260/A230	Concentração (ng/ μ L)
1	A	1,607	1,186	61,79
	B	1,597	1,086	56,03
	C	1,341	1,142	101,70
2	A	1,707	1,241	107,00
	B	1,569	0,577	10,75
	C	1,533	0,549	9,87
3	A	1,613	1,222	42,36
	B	1,440	1,118	143,86
4	A	1,410	1,053	59,81
	B	1,619	1,130	68,17
	C	1,552	1,155	59,33
5	A	1,426	1,162	95,97
	B	1,722	1,244	109,78
6	A	1,775	1,231	85,43
	B	1,548	0,825	13,59
7	A	1,282	1,095	544,68
	B	1,666	0,902	15,90
	C	1,474	1,125	39,74
8	A	1,762	0,778	11,00
	B	1,786	1,231	32,77
	C	1,649	1,224	38,14

Tabela ii. Quantificação do DNA extraído do Lago Guaíba

Ponto	Clone	Taxa A260/A280	Taxa A260/A230	Concentração (ng/μL)
1	A	1,469	1,160	73,35
	B	1,460	1,287	118,77
	C	1,618	1,282	71,49
2	A	1,297	1,201	102,11
	B	1,630	1,105	38,53
	C	1,778	1,193	20,11
3	A	1,791	1,400	81,53
	B	1,698	1,418	76,90
	C	1,615	1,278	54,83
4	A	1,697	1,344	68,71
	B	1,907	1,358	43,26
	C	1,534	1,347	88,71
5	A	1,477	1,168	57,14
	B	1,532	1,217	52,84
	C	1,591	1,294	75,56
6	A	1,522	1,238	86,20
	B	1,694	1,041	49,13
	C	1,726	1,309	68,17
7	A	1,726	1,369	65,90
	B	1,597	1,303	75,27
	C	1,573	1,298	62,30
8	A	1,625	1,341	106,14
	B	1,721	1,331	75,14
	C	1,785	1,311	72,34
9	A	1,824	1,367	35,43

ANEXO A

Autorização de Pesquisa



PREFEITURA MUNICIPAL DE PORTO ALEGRE
SECRETARIA MUNICIPAL DO MEIO AMBIENTE, URBANISMO E SUSTENTABILIDADE
DIRETORIA DE ÁREAS VERDES
COORDENAÇÃO DE GESTÃO DE ÁREAS VERDES
UNIDADE DE PROTEÇÃO DO AMBIENTE NATURAL

AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA – UPAN nº 011/2022

Pesquisador: BRENDA TEIXEIRA SCARDINI MARINHO
Instituição: INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - UFRGS
Orientadora: Dra. MARILISE BRITTES ROTT
Expediente SEI: 22.0.000098966-9
Unidade de Conservação: PARQUE NATURAL MUNICIPAL SAINT'HILAIRE

Autorizo **BRENDA TEIXEIRA SCARDINI MARINHO** a realizar a pesquisa intitulada **"ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE PATOGÊNICAS EM AMBIENTES AQUÁTICOS NA GRANDE PORTO ALEGRE - RS"**, nos termos deste documento.

Observações:

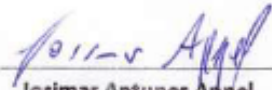
O pesquisador, colaboradores e auxiliares comprometem-se, a:

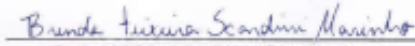
- Seguir as orientações escritas ou verbais da administração durante as incursões na área da Unidade de Conservação;
- Apresentar um cronograma de incursões no Parque;
- Agendar previamente as visitas técnicas de pesquisa pelo telefone ou e-mail com antecedência mínima de 72 horas;
- Deslocar-se pelo interior do Parque às suas expensas, podendo a administração do Parque auxiliar no deslocamento, caso haja disponibilidade e seja autorizado pela administração;
- Fornecer os resultados da pesquisa à administração da Unidade de Conservação, assim que concluída;
- Caso seja solicitado pelo Parque, o pesquisador deverá disponibilizar à administração os dados coletados e seus resultados na forma de relatório, mesmo que a pesquisa não venha a ser concluída;
- Apresentar o projeto de forma oral para o Conselho da Unidade de Conservação, ou eventos organizados pela SMAMUS, caso seja solicitado;
- Ao término da pesquisa enviar à administração tese, dissertação, monografia e/ou publicações que forem produzidas a partir da pesquisa realizada;
- Toda e qualquer alteração que venha ocorrer no decorrer da pesquisa deverá ser informada à unidade de conservação (metodologia, local, amostragem e etc);
- Renovar a presente autorização no prazo de um ano, caso necessário.

A administração da Unidade de Conservação se compromete em:

- Acompanhar com pelo menos um funcionário as incursões a campo sempre que agendadas com antecedência de 72 horas, quando houver disponibilidade.
- Dispor das instalações da sede do Parque para a realização e divulgação da pesquisa.

Porto Alegre, 09 de agosto de 2022.


Josimar Antunes Appel
Matr. 206560
Gestor Parque N M Saint'Hilaire
Porto Alegre - SMAMUS


Brenda Teixeira Scardini Marinho
RG 3.317.287 - ES F: (27) 9 9525-6555
brenda.scardini@hotmail.com
R. Laurindo, 416, apt. 207, Santana, Porto Alegre-RS

ANEXO B

Solução Salina de PAGE (CARLI, 2011) - Adaptado

Reagentes	Concentração 10X
Cloreto de Sódio (NaCl)	1,2 g
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,04 g
Hidrogenofosfato Dissódico Anidro (Na ₂ HPO ₄)	1,42 g
Diidrogenofosfato de Potássio (KH ₂ PO ₄)	1,36 g
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,04 g
Água Destilada (Tipo III)	1000 mL

Modo de Preparo:

Em um Becker de 1000 mL homogeneize os reagentes em água destilada com o auxílio de um bastão de vidro. Deixe a mistura por aproximadamente 10 minutos em vórtex para uma total dissolução dos reagentes.

Verifique o pH. Se necessário ajuste para 7,4.

Esterilize em autoclave a 121° C por 15 minutos e armazene entre 4° C.

Para uma solução de PAGE 1X é necessário diluir 10 mL da solução 10X em 900 mL de água destilada.