

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**PREVALÊNCIA DE *Acanthamoeba* spp. (SARCOMASTIGOPHORA:
ACANTHAMOEBIDAE) EM POPULAÇÕES SILVESTRES DE *Aedes aegypti*
(DIPTERA: CULICIDAE)**

DAYANE ANDRIOTTI OTTA

Porto Alegre
Março/2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**PREVALÊNCIA DE *Acanthamoeba* spp. (SARCOMASTIGOPHORA:
ACANTHAMOEBIIDAE) EM POPULAÇÕES SILVESTRES DE *Aedes aegypti*
(DIPTERA: CULICIDAE)**

DAYANE ANDRIOTTI OTTA
Bacharel em Biomedicina

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. Área de concentração: Microbiologia do Ambiente.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Onilda Santos da Silva

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil
Março/2012

CIP - Catalogação na Publicação

Andriotti Otta, Dayane
Prevalência de *Acanthamoeba* spp.
(Sarcomastigophora: Acanthamoebidae) em populações
silvestres de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) /
Dayane Andriotti Otta. -- 2012.
91 f.

Orientadora: Onilda Santos da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. *Aedes aegypti*. 2. *Acanthamoeba* spp.. I. Santos
da Silva, Onilda, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DAYANE ANDRIOTTI OTTA
BACHAREL EM BIOMEDICINA
FEEVALE

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

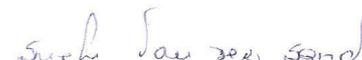
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 01/03/2012
Pela Banca Examinadora


ONILDA SANTOS DA SILVA
Orientadora ICBS/UFRGS

Homologado em: 10/05/2012
Por:


SUELI TERESINHA VAN DER SAND
Coordenadora do PPGMAA/UFRGS


MARILISE BRITTES ROTT
ICBS/UFRGS


SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
PPG FITOSSANIDADE/UFRGS


MARIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA
PPG ENTOMOLOGIA/UFPR


MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter sido meu guia nos momentos de dificuldade, me proporcionando a paz de espírito que necessitava para seguir em frente.

A minha família, que desde a infância me incentivou na busca pelo saber.

Ao querido Adolfo Edgardo Isla Munõz, sempre disponível para ajudar e colaborar com importantes sugestões. Seu companheirismo e compreensão foram fundamentais nesta jornada.

A minha orientadora, Dr^a. Onilda Santos da Silva, que tanto contribuiu para a expansão de meus conhecimentos. Sua dedicação e compromisso para sempre serão lembrados e servirão como premissas em minha vida profissional.

A Dr^a. Marilise Brittes Rott, pela valiosa contribuição neste trabalho, tornando-o viável através de auxílio nos delineamentos experimentais relativos à *Acanthamoeba* spp.

Aos demais professores do laboratório de Parasitologia, a saber, Dr^a. Neusa Saltiél Stobbe, Dr. Carlos Eugênio Silva, Dr^a. Márcia Bohrer Mentz e Dr. João Henrique Corrêa Kanan pela constante partilha de experiências.

Ao Dr. Jaime Figueroa e Dr^a. Denise Hausmann, pelo carinho, estímulo e fundamentais esclarecimentos referentes à biologia molecular.

A colega e amiga, Ana Maris Carlesso, com quem tudo aprendi no âmbito das amebas de vida livre. Seu incentivo serviu como um alicerce, permitindo-me ter a força necessária para superar todos os problemas e obstáculos.

A todos os colegas ao longo destes dois anos, que através da amizade e do apoio, tornaram os meus dias mais felizes.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

PREVALÊNCIA DE *Acanthamoeba* spp. (SARCOMASTIGOPHORA: ACANTHAMOEBIDAE) EM POPULAÇÕES SILVESTRES DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)¹

Autor: Dayane Andriotti Otta

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva

RESUMO

Associações simbióticas, comensais e parasitárias são amplamente relatadas em insetos. Pelo fato de larvas de culicídeos e amebas de vida livre (AVL) habitarem meios aquáticos similares, objetivou-se verificar a prevalência de *Acanthamoeba* spp. em populações silvestres de *Aedes aegypti*. Esta AVL foi investigada em 60 *pools* contendo 10 larvas de *A. aegypti*, as quais foram coletadas através de ovitrampas instaladas em diversos bairros da cidade de Porto Alegre (RS, Brasil). Os isolados de *Acanthamoeba* spp. foram caracterizados morfolologicamente e submetidos à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação do gênero. Ademais, realizou-se análise genotípica e testes presuntivos de patogenicidade para algumas cepas. Entre os *pools*, 54 (90%) foram positivos para AVL, dos quais 47 (87%) isolados eram pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*. Os grupos genotípicos T4, T3 e T5 foram identificados, correspondendo a 14 (53,8%), 10 (38,5%) e dois (7,7%) isolados, respectivamente. De acordo com testes fisiológicos empregados para 14 cepas, 12 (85,7%) foram consideradas não patogênicas e duas (14,3%) foram consideradas com baixo potencial patogênico. Estes resultados servem como base para um maior conhecimento acerca da interação entre estes protozoários e mosquitos vetores, em seu habitat natural. Além disso, é o primeiro estudo dedicado ao isolamento de *Acanthamoeba* spp. a partir de culicídeos coletados do ambiente.

¹Dissertação 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. (91 p.) Março, 2012.

PREVALENCE OF *Acanthamoeba* spp. (SARCOMASTIGOPHORA:
ACANTHAMOEBIDAE) IN WILD POPULATIONS OF *Aedes aegypti* (DIPTERA:
CULICIDAE)¹

Author: Dayane Andriotti Otta
Supervisor: Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva

ABSTRACT

Symbiotic, commensal and parasitic associations are widely reported in insects. By the fact of mosquito larvae and free-living amoebae (FLA) occupy the similar aquatic sites, the aim of this study was to determine the prevalence of *Acanthamoeba* spp. in *Aedes aegypti* larvae collected in the environment. The amoebae were investigated in 60 pools, each containing 10 larvae of *A. aegypti* which were collected by using larvitrap installed in various districts of Porto Alegre (RS, Brazil). *Acanthamoeba* isolates were morphologically characterized and submitted to Polymerase Chain Reaction technique to confirm the genus. In addition, genotype analyses as well as presumptive tests for pathogenicity in some samples were performed. Among the pools, 54 (90%) were positive for FLA. From those isolates, 47 (87%) belong to the genus *Acanthamoeba*. The genotype groups T4, T3 and T5 have been identified corresponding to 14 (53.8%), 10 (38.5%) and two (7.7%) isolates respectively. The physiological tests performed in 14 strains showed that 12 (85.7%) were non pathogenic, while two (14.3%) were considered with low pathogenic potential. These results provide a basis for a better understanding between these protozoan and mosquitoes interaction in their natural habitat. Moreover, this study is the first to report isolation of *Acanthamoeba* spp. from mosquitoes collected in the environment.

¹Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (91 p.) March, 2012.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	<i>Aedes aegypti</i>	4
2.1.1	Referencial histórico e distribuição	4
2.1.2	Biologia e ciclo de vida	5
2.1.3	Morfologia	9
2.1.4	Interações simbióticas, comensais e parasitárias	12
2.2	<i>Acanthamoeba</i> spp.	17
2.2.1	Referencial histórico	17
2.2.2	Ciclo biológico e morfologia	18
2.2.3	Atividade carreadora de microorganismos (“Cavalo de Tróia”)	20
2.2.4	Caracterização morfológica e genotípica	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Área de estudo	26
3.2	Amostragem	28
3.3	Obtenção de larvas de <i>A. aegypti</i>	28
3.4	Desenvolvimento larval em laboratório	30
3.5	Lavagem de larvas de <i>A. aegypti</i>	31
3.6	Isolamento de amebas de vida livre	31
3.7	Obtenção de culturas monoxênicas de amebas de vida livre	32
3.8	Clonagem de amebas de vida livre	33
3.9	Caracterização morfológica dos isolados de <i>Acanthamoeba</i>	34
3.9.1	Teste de exflagelação	34
3.9.2	Análise do tamanho de cistos	34
3.9.3	Tempo de contração de vacúolos pulsáteis	35
3.10	Caracterização molecular dos isolados de <i>Acanthamoeba</i>	35
3.10.1	Extração de DNA genômico	35
3.10.2	Quantificação e pureza do DNA genômico	36
3.10.3	Confirmação do gênero <i>Acanthamoeba</i> por PCR	37
3.10.4	Purificação de bandas do DNA genômico	38
3.10.5	Sequenciamento dos isolados de <i>Acanthamoeba</i>	39
3.10.6	Análise de sequências nucleotídicas	39
3.11	Estimativa da patogenicidade dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> através de testes fisiológicos	40
3.11.1	Teste de termotolerância	40

3.11.2 Teste de osmotolerância	41
3.12 Cepas de referência da ATCC (<i>American Type Culture Collection</i>) para <i>Acanthamoeba</i> spp.	41
3.13 Análise dos dados	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Positividade de armadilhas para larvas de <i>A. aegypti</i>	43
4.2 Isolamento de AVL a partir de larvas de <i>A. aegypti</i>	44
4.3 Caracterização morfológica dos isolados de AVL	48
4.3.1 Teste de exflagelação	48
4.3.2 Identificação e classificação do gênero <i>Acanthamoeba</i> por critérios morfológicos	49
4.4 Caracterização molecular dos isolados de AVL	55
4.4.1 Pureza e concentração do DNA genômico	55
4.4.2 Confirmação do gênero <i>Acanthamoeba</i> por <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	56
4.4.3 Sequenciamento parcial do gene 18S rDNA	61
4.5 Estimativa da patogenicidade dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> através de testes fisiológicos	68
5 CONCLUSÕES	71
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
7 APÊNDICES	83
APÊNDICE I. Sequências nucleotídicas de <i>Acanthamoeba</i> , isoladas de populações silvestres de <i>A. aegypti</i> (sequenciamento parcial do gene 18S rDNA)	83
8 ANEXOS	90
ANEXO I. Preparo de soluções e procedimentos relacionados	90

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1	Fases do desenvolvimento de <i>A. aegypti</i>	6
Figura 2	Aspecto dos espinhos do pécten em <i>A. aegypti</i> , localizados no oitavo segmento do abdome	10
Figura 3	Mesonoto de <i>A. aegypti</i> com desenho em formato de lira	11
Figura 4	Trofozoíto e cistos de <i>Acanthamoeba</i> spp.	19
Figura 5	Localização dos bairros de Porto Alegre (RS, Brasil) incluídos no estudo e seus respectivos índices de infestação predial (IIP) para o mês de janeiro (2010 e 2011)	27
Figura 6	Armadilha instalada em Porto Alegre (RS, Brasil) para obtenção de larvas de <i>A. aegypti</i>	29
Figura 7	Larvas de <i>A. aegypti</i> , coletadas em Porto Alegre (RS, Brasil) e enviadas ao laboratório de parasitologia de UFRGS, acondicionadas em tubo de ensaio	30
Figura 8	Clonagem de AVL. Placa de ANN 1,5% com 16 campos contendo 5 µL de suspensão amebiana	33
Figura 9	Imagem do software Chromas, empregado para a visualização de cromatogramas e sequências nucleotídicas	40
Figura 10	Trofozoítos e cisto do isolado ST1, em placa de ANN 1,5% com sobrecamada de <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	46
Figura 11	Cistos do isolado EE4 contendo contaminação fúngica (hifas)..	47
Figura 12	Cistos do isolado EE4 sem contaminação fúngica, após sucessivos repiques e uso de Fungisona®	47
Figura 13	Isolados de <i>Acanthamoeba</i> spp. corados com tricrômico	54

Figura 14	Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR de <i>Acanthamoeba</i> spp., provenientes de populações naturais de <i>A. aegypti</i>	56
-----------	---	----

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das principais espécies de <i>Acanthamoeba</i> em grupos morfológicos	22
Tabela 2	Classificação genotípica de espécies de <i>Acanthamoeba</i> , segundo Stothard et al., 1998	24
Tabela 3	Armadilhas positivas para larvas de <i>A. aegypti</i> , de acordo com bairro de coleta e semana de observação (ano de 2011)	44
Tabela 4	Número de <i>pools</i> de <i>A. aegypti</i> amostrados de acordo com o local de origem, positividade para AVL e isolados obtidos	45
Tabela 5	Características morfológicas dos cistos de <i>Acanthamoeba</i> spp. e tempo de contração de vacúolos pulsáteis dos trofozoítos	50
Tabela 6	Percentual de identidade entre os isoaldos de <i>Acanthamoeba</i> e cepas de referência para estabelecimento de grupos genotípicos	62
Tabela 7	Máxima identidade entre os isolados de <i>Acanthamoeba</i> e as espécies depositadas no <i>GenBank</i>	66
Tabela 8	Avaliação do crescimento dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> em diferentes condições de temperatura e osmolaridade, através de testes de tolerância	68

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANN	Ágar não-nutriente
ASA.S1	<i>Acanthamoeba-specific amplimer S1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVL	Ameba(s) de vida livre
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cm	Centímetro
DENV	Vírus da dengue
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DPEC	Dietil-pirocarbonato
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilendiamino tetraacético)
FD	Febre da dengue
FHD/ SCD	Febre hemorrágica da dengue/ Síndrome do choque da dengue
IC	Incompatibilidade citoplasmática
IIP	Índice de infestação predial
LIRAA	Levantamento de Índice Rápido de <i>Aedes aegypti</i>
M	Molar
mg	Miligrama

mM	Milimolar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mOsmol	Miliosmol
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)
ng	Nanograma
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
rDNA	Ácido desoxirribonucléico ribossomal
rpm	Rotação por minuto
SAF	<i>Sodium acetate- acetic acid- formalin</i> (Acetato de sódio- ácido acético- formaldeído)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
Tris-HCl	Cloridrato de Tris (hidroximetil)- aminometano
UV	Ultravioleta
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar

1 INTRODUÇÃO

O culicídeo *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), principal vetor do vírus da dengue e da febre amarela urbana no Brasil, caracteriza-se por ser uma espécie domiciliada. Realiza sua postura de ovos (oviposição) em locais com depósito de água limpa, embora já tenha sido evidenciado em ambientes poluídos (Silva et al., 1999). Ademais, apresenta grande capacidade de estabelecer criadouros artificiais dentro e ao redor de residências. Em regiões onde predomina a precariedade no abastecimento de água, torna-se comum o seu armazenamento em recipientes, constituindo, desta forma, os mais adequados criadouros para *A. aegypti* (Becker, 2008). Além disso, pneus em desuso, vasos de plantas e caixas d'água descobertas também representam locais preferenciais para o desenvolvimento deste culicídeo (Neves et al., 2005).

A aptidão para ocupar distintos nichos ecológicos caracteriza estes insetos como um grupo de animais com importante sucesso em sua capacidade adaptativa, o que facilita sua sobrevivência. Além disto, a interferência direta de alguns endossimbiontes parece ser bastante significativa em sua biologia (Brownlie & Johnson, 2009).

Os insetos atuam como hospedeiros de muitos microorganismos, que se desenvolvem e colonizam seus tecidos, especialmente o sistema digestivo. A estes microorganismos são atribuídas inúmeras funções fisiológicas, entre elas o auxílio na digestão de alimentos, nutrição e reprodução de mosquitos (Gaió et al., 2011).

Embora existam estudos que objetivem identificar a diversidade microbiana em culicídeos, há inúmeras lacunas a serem preenchidas. Vários microorganismos compartilham o mesmo habitat aquático das formas larvais de *A. aegypti*, o que possibilita inúmeras interações simbióticas, comensais e parasitárias.

Acanthamoeba spp. (Sarcomastigophora: Acanthamoebidae), pertencente a um grupo denominado amebas de vida livre (AVL), pode estar intimamente relacionada com culicídeos aquáticos. Trata-se de um dos protozoários de maior prevalência no meio ambiente, com ampla distribuição mundial. Estudos evidenciaram seu isolamento a partir do ar (Kingston & Warhurst, 1969), água tratada e natural (Thomas et al., 2008; Stockman et al., 2011; Winck et al., 2011), solo (Kawaguchi et al., 2009), poeira (Niyiyati et al., 2009), ambiente hospitalar (Carlesso et al., 2010), piscinas (Rott & Caumo, 2011), entre outros. Seu isolamento foi realizado, inclusive, em regiões da Antártica (Brown et al., 1982).

Apesar de ser reconhecida como contaminante em culturas de bactérias, de leveduras e de células de mamíferos, além de ter sido isolada de animais e humanos (Khan, 2009), pesquisas acerca da ocorrência de *Acanthamoeba* spp. em mosquitos vetores são escassas.

Em estudo preliminar, Rott et al. (2010) demonstraram a capacidade de *Acanthamoeba polyphaga* em se desenvolver no intestino de larvas, pupas e adultos de *A. aegypti* em condições de laboratório. Entretanto, a presença do protozoário em mosquitos silvestres ainda não foi investigada, não havendo, portanto, estimativas de sua prevalência ou distribuição.

Pelo fato de larvas de culicídeos e AVL habitarem meios aquáticos similares, objetivou-se verificar a prevalência de *Acanthamoeba* em populações silvestres de *A. aegypti*, mediante a identificação morfológica e molecular do protozoário de interesse. Além disso, pretendeu-se submeter alguns isolados amebianos à caracterização genotípica e testes presuntivos de patogenicidade. Sendo assim, este trabalho serve como base para um maior conhecimento acerca da interação entre AVL e mosquitos vetores, em seu habitat natural, elucidando importantes aspectos da biologia destes organismos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Aedes aegypti*

2.1.1 Referencial histórico e distribuição

Aedes aegypti é originário da África, possivelmente da região da Etiópia, e sua distribuição mundial teve início nos trópicos, entre os séculos XVII e XIX, período caracterizado por grande progresso marítimo, industrial e comercial. Durante as navegações, os mosquitos utilizavam a água armazenada nos porões dos navios como local de reprodução. Desta forma, seu ciclo biológico e taxa de dispersão eram mantidos constantes, possibilitando a introdução da espécie em novas regiões quando os navios aportavam (Gubler, 2002). Supõe-se que este culicídeo possa ter primeiramente invadido Portugal e Espanha, antes de chegar ao hemisfério ocidental por intermédio de navios europeus (Tabachnick, 1991). Posteriormente, a disseminação ocorreu por veículos terrestres e aviões (Neves et al., 2005).

Durante as décadas de 1950 e 1960, a espécie foi erradicada em vários países da América, entretanto, devido a falhas estratégicas em seu controle, foi encontrada novamente em 1970. No Brasil, provavelmente os navios negreiros foram responsáveis pela entrada do mosquito no país, conseguindo-se erradicá-lo em 1955. Em 1967 voltou a ser detectado, no

Estado do Pará, com segunda erradicação em 1973. Ocorreu nova aparição em 1976, desta vez em Salvador e, desde então, não houve mais subsídios para eliminá-lo (Fundação Nacional de Saúde, 2002; Tauil, 2002).

Com o transcorrer dos anos, adquiriu ampla abrangência, dispersando-se em regiões tropicais e subtropicais, principalmente entre os limites de latitude 45° Norte e 35° Sul, embora possa ser evidenciado fora destes paralelos, porém sempre em zonas com isoterma de 20°C (Gadelha & Toda, 1985; Consoli & Oliveira, 1994). A distribuição do mosquito também é restringida pela altitude, normalmente não sendo demonstrada em regiões acima de 1.000 metros. Entretanto, foi encontrado previamente na Índia e na Colômbia diante de altura de 2.121 e 2.200 metros, respectivamente, onde a temperatura média anual é de 17°C (PAHO, 1995).

2.1.2 Biologia e ciclo de vida

Os culicídeos são caracterizados por realizar metamorfose completa (holometabolía) durante seu desenvolvimento pós-embrionário, apresentando fases distintas de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1) (Forattini, 2002).

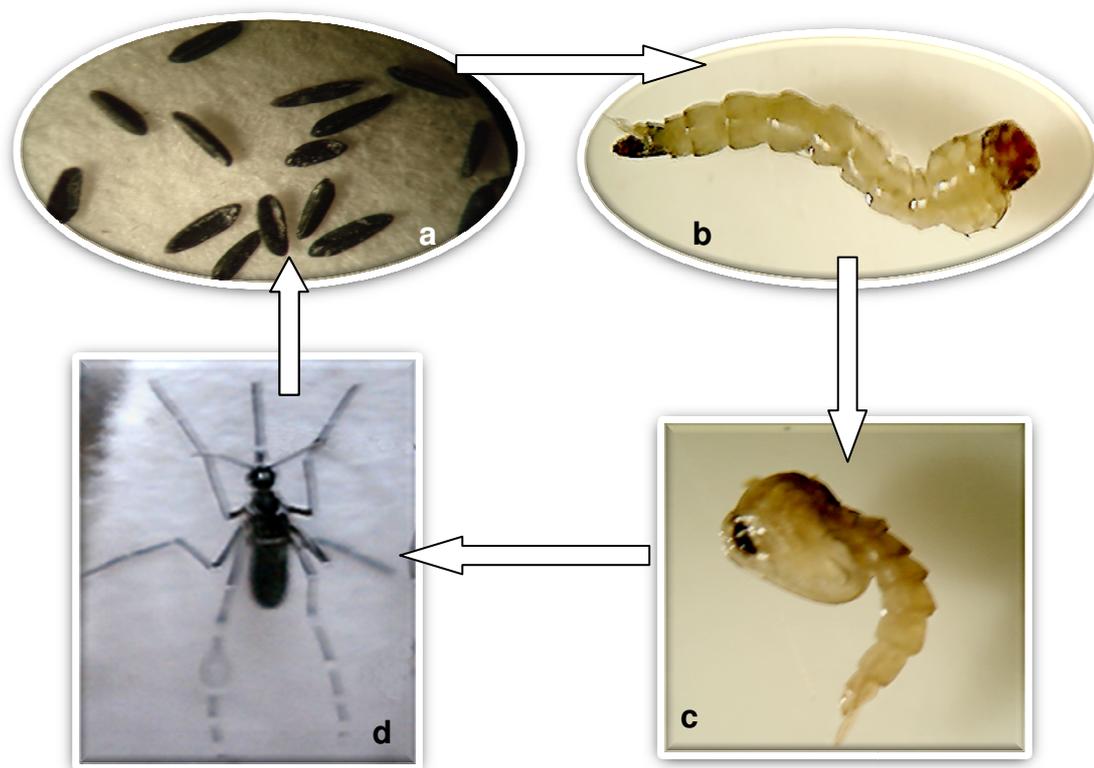


Figura 1. Fases do desenvolvimento de *A. aegypti*. Ovos (a); larva (b); pupa (c); adulto (d).
Fonte: Dayane Otta/ Laboratório de Parasitologia UFRGS

A postura é precedida pela atividade hematofágica, onde a fêmea, normalmente realiza mais de um repasto sanguíneo entre duas oviposições consecutivas, principalmente quando é perturbada antes de estar totalmente ingurgitada. Após a alimentação, a maturação dos ovos (ovogênese) é iniciada, salientando-se que o desenvolvimento dos oócitos somente será concluído diante da completa ingestão de sangue (Barata, 2001). A oviposição é realizada acima do nível da água, com cerca de 10 a 100 ovos sendo depositados por vez (Rey, 1991).

Quanto à eclosão, existem duas possibilidades peculiares: sua ocorrência pode ser observada logo após o fim da embriogênese ou apresentar um período de latência, conhecido como diapausa do ovo. Nesta última

circunstância, a resistência à dessecação representa uma forma de sobrevivência de tais organismos quando os ovos são deixados fora da água (Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 2002).

Uma vez ocorrida a eclosão, o culicídeo assume a forma larval. São observados quatro estádios (L1, L2, L3, L4), os quais são aquáticos, utilizando este ambiente para promover seu crescimento e nutrição (Forattini, 2002).

As formas larvais de culicídeos se alimentam de microorganismos, tais como bactérias, protozoários e algas. Além disso, detritos e partes de vertebrados mortos também constituem importantes fontes alimentares. As partículas passíveis de ingestão por larvas de mosquitos podem ser classificadas, de acordo com suas dimensões, como: ultrafinas ($>0,5 \mu\text{m}$ a $<50 \mu\text{m}$); finas ($>50 \mu\text{m}$ a $<1 \text{mm}$) ou grandes (1 mm). Dependendo da espécie, as larvas obtêm alimento a partir da interface entre o ar e a água, em colunas de água, em raízes submersas de plantas ou sob superfícies minerais e orgânicas presentes em meios aquáticos (Clements, 1992; Merritt et al., 1992).

O comportamento alimentar observado em larvas também pode ser classificado, apresentando caráter *passivo* ou *ativo*. Na forma *passiva*, escovas presentes ao redor da cavidade bucal geram correntes que permitem o acesso a fontes de nutrição. Enquanto o processo *ativo* corresponde à movimentação da larva em busca de alimento, compreendendo: a) *coleta ativa*, onde partículas em suspensão são ingeridas; b) *raspagem*, realizada em substâncias aderidas a superfícies; c) *mordedura*, na qual ocorre a fragmentação de tecidos; d) *predação*, podendo ser caracterizada por canibalismo (Forattini, 2002).

A evolução para a pupa também ocorre em ambiente aquático, correspondendo a uma fase de transição entre a larva e o mosquito. Por este motivo, trata-se de uma forma imatura que não se alimenta. Diferenciam-se por apresentar motilidade, que é rara neste estágio em outros insetos (Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Gállego Berenguer, 2007).

Após a emergência dos adultos, o ciclo de reprodução é iniciado e ocorre a consequente dispersão dos indivíduos, os quais assumem hábitos terrestres (Forattini, 2002). A maior parte dos mosquitos adultos é constituída por metabolismo energético dependente da ingestão de carboidratos, normalmente advindos da natureza por intermédio de seivas, flores e frutos (Nayar et al., 1973). Caracterizam-se por hábitos preferencialmente diurnos, sendo que as fêmeas possuem predileção pelo sangue humano para alimentação, a fim de suprir suas necessidades fisiológicas após a cópula. O pico de atividade ocorre entre às 16 e 18 horas (Gadelha & Toda, 1985; Silva et al., 2002).

Em adição, populações adultas de *A. aegypti* podem sofrer interferência de uma série de fenômenos climáticos, tais como a variabilidade sazonal e anual de temperatura, a umidade atmosférica e a precipitação pluviométrica. Estudos epidemiológicos demonstram que um aumento de dois ou três graus na temperatura equivale a uma duplicação da densidade de *A. aegypti*. A temperatura afeta a duração do ciclo gonotrófico, consistindo em um fator importante para a sazonalidade de culicídeos (Halstead, 2008).

2.1.3 Morfologia

Os ovos de *A. aegypti* apresentam cerca de 1 mm de comprimento, possuindo uma superfície lisa, com ausência de estruturas flutuadoras (Figura 1a). Têm aspecto alongado, com simetria bilateral e casca (cório) dividida em três camadas: (1) membrana vitelina interna bastante delgada, (2) endocório endurecido e espesso (3) e exocório delgado e transparente. Possuem coloração clara no momento da oviposição, tornando-se escuros após alguns minutos (Consoli & Oliveira, 1994).

No que tange às larvas (Figura 1b), estas são caracterizadas morfológicamente de acordo com o exposto: 1) Cabeça grande, com um par de antenas não-segmentadas e peças bucais consistindo de epifaringe, mandíbulas, maxilas, hipofaringe e lábio, sendo que o lábio superior possui duas escovas ou tufo de cerdas; 2) Tórax globuloso, não-segmentado e notavelmente mais amplo do que a cabeça; 3) Abdome formado por nove segmentos. O último, representando a região anal, é composto por quatro papilas anais, parcialmente desenvolvidas. O penúltimo segmento possui os espiráculos, diretamente localizados sobre a região dorsal ou ao término do sifão respiratório, uma estrutura cujo contato direto de sua extremidade com a superfície da água promove a respiração. O sifão respiratório possui uma fileira única de espinhos (pécten), localizada em sua região pósterobasal, sendo as mesmas estruturas espinhosas também observadas no oitavo segmento do abdome (Gállego Berenguer, 2007). O formato dos espinhos do pécten é de grande importância taxonômica, auxiliando a diferenciação entre gêneros e espécies no estágio larval (Figura 2).



Figura 2. Aspecto dos espinhos do pécten em *A. aegypti*, localizados no oitavo segmento do abdome. Microscópio óptico (400X). Barra = 50 μ m. Fonte: Dayane Otta/ Laboratório de Parasitologia UFRGS

As pupas apresentam corpo dividido em duas porções: cefalotórax (cabeça + tórax) e abdome, constituído por oito segmentos (Figura 1c). Caracterizam-se pelo grande desenvolvimento da região cefalotorácica, que contém em sua região dorsal duas trompas respiratórias subcilíndricas ou subcônicas, com o corpo apresentando o aspecto de um sinal de interrogação. O último segmento do abdome mostra duas expansões laminares, denominadas de paletas natatórias (Consoli & Oliveira, 1994; Gállego Berenguer, 2007).

O corpo do adulto é notoriamente composto por cabeça, tórax e abdome (Figura 1d). Externamente, como em todos os mosquitos, o aspecto das antenas facilita a diferenciação do sexo: nos machos, as cerdas são mais longas e volumosas (plumosas), enquanto nas fêmeas estas são curtas e pouco numerosas (pilosas). O principal diferencial de *A. aegypti* é seu aspecto

rajado, de coloração escura e manchas brancas ao longo do corpo. Há a ocorrência de linhas curvas branco-prateadas no tórax (mesonoto), além de linha longitudinal central, compondo um desenho em formato de lira (Figura 3) (Rey, 1991). Quanto à morfologia interna, se destacam as estruturas do canal alimentar, constituído por esôfago, dois divertículos dorsais, um divertículo ventral, glândulas salivares, intestino anterior, médio e posterior (Consoli & Oliveira, 1994).

Em adição, os mecanismos de defesa desenvolvidos por culicídeos merecem destaque. Estrutura particularmente importante para larvas, pupas e adultos diz respeito à membrana peritrófica, que é uma camada acelular delgada que reveste o intestino médio de insetos. Esta estrutura pode envolver microorganismos ingeridos durante o estágio larval, contribuindo para a redução da invasão de patógenos (Moncayo et al., 2005).



Figura 3. Mesonoto de *A. aegypti* com desenho em formato de lira.
Fonte: University of Florida - Florida Medical Entomology Laboratory, 2008.

2.1.4 Interações simbióticas, comensais e parasitárias

Associações simbióticas são amplamente relatadas em insetos que possuem dietas nutricionalmente deficientes, tais como escassez de fonte alimentar sanguínea. Desta maneira, é provável que os microorganismos forneçam nutrientes importantes para seu hospedeiro, uma vez que estes sejam limitados ou inexistentes na dieta ou, ainda, que não possam ser produzidos pelo metabolismo do próprio inseto (Weiss & Aksoy, 2011).

Outro tipo de interação bastante estudada diz respeito ao parasitismo, situação na qual o simbiote impõe prejuízos ao hospedeiro (Brownlie & Johnson, 2009). Por outro lado, muitos microorganismos encontrados em insetos não parecem exercer qualquer impacto significativo e, sua remoção, normalmente, não resulta em nenhum dano ou benefício ao artrópode que o alberga. Estes simbioss são conhecidos como comensais (Bordenstein & Werren, 2000).

Sabe-se que todos os tipos de interação entre organismos merecem atenção adequada, resultando em grande interesse científico nos últimos anos. A elucidação dos mecanismos envolvidos nas relações estabelecidas por *A. aegypti* constitui um fator importante para a caracterização de mosquitos vetores.

A realização de estudo objetivando analisar a diversidade microbiana em *A. aegypti* revelou a colonização bacteriana pelos gêneros *Serratia* (Bizio, 1823) (Proteobacteria: Enterobacteriaceae), *Klebsiella* (Trevisan, 1885) (Proteobacteria: Enterobacteriaceae), *Asaia* (Yamada et al., 2000) (Proteobacteria: Acetobacteriaceae), *Bacillus* (Cohn, 1872) (Firmicutes: Bacillaceae),

Enterococcus (Thiercelin & Jouhaud, 1903) (Firmicutes: Enterococcaceae), *Enterobacter* (Hormaeche & Edwards, 1960) (Proteobacteria: Enterobacteriaceae), *Pantoea* (Gavini et al., 1989) (Proteobacteria: Enterobacteriaceae) e *Kluyvera* (Farmer et al., 1981) (Proteobacteria: Enterobacteriaceae). A maioria dos microorganismos foi oriunda do intestino médio dos culicídeos, a exceção de *Enterobacter* spp., encontrado apenas em ovos, além de *Asaia* spp. e *Pantoea* spp., encontrados em ovos e ovários. Dos isolados leveduriformes, *Pichia* spp. (Hansen, 1904) (Ascomycota: Saccharomycetaceae) foi relatada no intestino médio e *Candida* spp. (Berkhout, 1923) (Ascomycota: Saccharomycetaceae) foi identificada no intestino e ovários (Gusmão et al., 2010).

Em adição, pesquisa realizada em Madagascar também permitiu o isolamento de diferentes bactérias oriundas de *A. aegypti*. Os resultados revelaram a presença de *Acinetobacter* spp. (Brisou & Prévot, 1954) (Proteobacteria: Moraxellaceae), *Staphylococcus saprophyticus* (Fairbrother, 1940) (Firmicutes: Staphylococcaceae), *Pseudomonas* spp. (Migula, 1894) (Proteobacteria: Pseudomonadaceae), *Enterobacter* spp. (Proteobacteria: Enterobacteriaceae) e *Asaia* spp. (Proteobacteria: Acetobacteriaceae). A localização precisa destes microorganismos não foi alvo de investigação (Zouache et al., 2011).

Gusmão et al. (2007) realizaram o primeiro estudo intencionando o isolamento microbiano a partir do divertículo ventral de *A. aegypti*, culminando com a identificação de *Bacillus* spp. (Cohn, 1872), *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872, *Serratia* spp. (Bizio, 1823) e *Pichia caribbica* (Vaughan-

Martini et al., 2005). Cabe ressaltar que o divertículo ventral serve como um compartimento para armazenamento de açúcares, que não possui comunicação direta com o intestino médio de mosquitos. Estas observações sugerem que os organismos encontrados podem desempenhar um papel importante no metabolismo de açúcares e, possivelmente, encontram-se amplamente distribuídos em estruturas internas de culicídeos.

De forma complementar, foi demonstrado que a redução de bactérias intestinais em *A. aegypti*, garantida pela utilização de diferentes antibióticos, afeta a lise de hemácias, provoca retardo na digestão de proteínas, priva o culicídeo de nutrientes essenciais e interfere na maturação de oócitos, resultando na produção reduzida de ovos viáveis (Gaio et al., 2011).

Contribuindo para a variedade de simbioses, distintos protozoários têm sido isolados a partir de mosquitos vetores. As espécies de *Ascogregarina* (Apicomplexa: Lecudinidae) vêm sendo extensivamente estudadas por infectar principalmente culicídeos do gênero *Aedes*, sendo conhecidas por seu caráter espécie-específico (Chen, 1999). Em estudo conduzido na Argentina, verificou-se que 83 (21,2%) de 391 fêmeas adultas de *A. aegypti* coletadas no ambiente estavam infectadas por *Ascogregarina culicis* (Ross), demonstrando sua importante dispersão (Vezzani & Wisnivesky, 2006). No Brasil, a prevalência variou entre 22% a 95% entre larvas coletadas na região amazônica (Dos Passos & Tadei, 2008). A transmissão do parasito em ambiente aquático ocorre quando os estádios larvais ingerem oocistos provenientes da defecação ou morte de adultos. Os trofozoítos de gregarinas alimentam-se intracelularmente no epitélio do intestino médio, apresentando crescimento que

acompanha o desenvolvimento do mosquito. A formação de gametas e de esporozoítos no interior dos tubos de Malpighi, durante as fases de pupa e adulto jovem, resulta na liberação de novos oocistos, reiniciando o ciclo (Morales et al., 2005).

Além da presença de microorganismos que representam associações mutualísticas e comensais, os insetos podem albergar parasitos herdados maternalmente. As espécies mais extensivamente estudadas pertencem ao gênero bacteriano *Wolbachia* (Hertig, 1936) (Proteobacteria: Rickettsiaceae).

Linhagens de *Wolbachia* spp. são capazes de provocar uma série de anormalidades reprodutivas em artrópodes, com grande destaque ao fenômeno da incompatibilidade citoplasmática (IC). A IC resulta em morte embrionária, decorrente da cópula entre uma fêmea de inseto não infectada e um macho infectado por *Wolbachia* spp. Também ocorre quando o macho e a fêmea estão infectados por cepas distintas da bactéria (Weiss & Aksoy, 2011).

Além disso, Kremer et al. (2009) demonstraram que tal bactéria influencia a expressão de ferritina nas células de alguns insetos, entre eles *A. aegypti*, após suplementação de ferro, interferindo significativamente no metabolismo deste mineral. Acredita-se que esta atividade ocorra a fim de suprir as necessidades fisiológicas da *Wolbachia* spp. ou, ainda, que represente um mecanismo importante para a permanência do microrganismo em ambiente intracelular, uma vez que a redução da concentração de ferro lábil protege a célula do estresse oxidativo e da apoptose.

Não obstante, foi relatado recentemente que *Wolbachia* spp. estabelece uma notória interação com o vírus da dengue. A bactéria inibe a replicação viral

e reduz significativamente o seu potencial de transmissão (Bian et al., 2010). Hoffmann et al. (2011) obtiveram sucesso ao liberar, no ambiente, adultos de *A. aegypti* infectados com *Wolbachia*, o que ocasionou a redução da capacidade vetora dos culicídeos. A eficácia baseou-se na transmissão da bactéria à população de insetos silvestres.

Outro tipo de associação, marcadamente parasitária, está relacionada a fungos entomopatogênicos. Alguns gêneros fúngicos têm sido bastante estudados devido a sua atividade nociva contra *A. aegypti*. Entre eles, *Beauveria bassiana* (Vuillemin, 1912) (Ascomycota: Cordycipitaceae) caracteriza-se por promover altas taxas de mortalidade, podendo ser transmitido a fêmeas saudáveis, após acasalamento com machos infectados experimentalmente (García-Munguía et al., 2011).

Metarhizium anisopliae (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Ascomycota: Clavicipitaceae) é outro espécime fúngico que detém considerável atenção devido ao grande potencial infectivo a culicídeos, afetando diretamente sua longevidade (Scholte et al., 2007). Uma observação importante foi feita por Paula et al. (2011), onde se verificou que a linhagem Rockefeller, assim como indivíduos selvagens de *A. aegypti*, apresentavam significativa redução na susceptibilidade à *Metarhizium anisopliae*, imediatamente após o repasto sanguíneo. O mesmo efeito não foi observado no grupo de mosquitos alimentados apenas com sacarose. Este dado indica que o estado nutricional dos culicídeos representa um fator relevante, podendo afetar significativamente a vulnerabilidade de *A. aegypti* frente a microorganismos.

Conforme demonstrado pela literatura, existe grande heterogeneidade de bactérias, fungos e protozoários encontrados neste mosquito vetor, com desempenho de diferentes funções. Desta forma, novas pesquisas são necessárias a fim de reconhecer outros microorganismos que podem ser albergados por populações de *A. aegypti*.

Com base nesta premissa, Rott et al. (2010) comprovaram, em condições laboratoriais controladas, a colonização de *A. aegypti* (linhagem Rockefeller) por *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30872), diante do reisolamento deste protozoário. O microorganismo, até então, não possuía nenhuma relação conhecida com culicídeos vetores e, atualmente, possibilita uma nova perspectiva acerca de sua ocorrência em mosquitos de origem silvestre.

2.2 *Acanthamoeba* spp.

2.2.1 Referencial histórico

O primeiro isolamento de AVL foi realizado por Puschkarew (1913), a partir de poeira, nomeando o protozoário como *Amoeba polyphagus*. Mais tarde, Page (1967), renomeou o isolado como *Acanthamoeba polyphaga*, mantendo-se a designação genérica de *Acanthamoeba*, proposta por Volkonsky, em 1931.

Este grupo adquiriu significância epidemiológica em 1958, ano em que Culbertson evidenciou o crescimento de um microorganismo contaminante em cultura celular, durante o desenvolvimento de vacinas contra a poliomielite. O

material obtido, quando inoculado em ratos e animais, provocava um quadro patológico de encefalite, o qual era responsável pela morte dos animais. A investigação do agente etiológico revelou a presença de uma ameba pertencente ao gênero *Acanthamoeba*, que até então era considerada saprofítica e não patogênica (Culbertson et al., 1958; Culbertson et al., 1959).

Posteriormente, verificou-se que a citopatologia produzida em culturas teciduais de rim de macaco, utilizadas para crescimento de poliovírus, era causada por *Acanthamoeba* spp., e não por um vírus símio, como fora proposto inicialmente (Culbertson, 1971).

Desde então, algumas linhagens do protozoário demonstraram forte relação com o desenvolvimento de processos patológicos. Em 1972, Jager & Stamm relataram o primeiro caso de encefalite amebiana granulomatosa (EAG) em humanos, causada por *Acanthamoeba* spp. Já o primeiro caso de ceratite humana por esta AVL foi reportada por Nagington et al. (1974).

2.2.2 Ciclo biológico e morfologia

O microorganismo apresenta dois estágios distintos durante seu ciclo biológico, correspondendo à fase ativa de trofozoíto, durante a qual é realizada a reprodução, e a fase dormente na forma de cisto (Figura 4) (Khan, 2009).

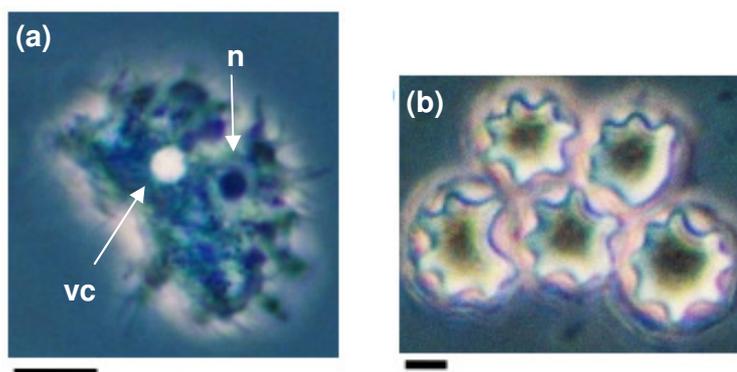


Figura 4. Trofozoíto (a) e cistos (b) de *Acanthamoeba* spp. n: núcleo; vc: vacúolo contrátil. Microscópio de contraste de fase (1000X). Barra = 10 μ m (a) e 5 μ m (b).
Fonte: Karin Caumo/ Laboratório de Parasitologia UFRGS

A dimensão dos trofozoítos varia entre 15 a 50 μ m e alimentam-se de bactérias, algas e leveduras provenientes do seu habitat, embora possam existir axenicamente em líquidos com nutrientes, devido ao mecanismo de pinocitose (Bowers, 1977; Bowers & Olszewski, 1983; Visvesvara et al., 2007).

A forma trofozoítica é caracterizada pela presença de pseudópodes para a locomoção, que apresentam o aspecto de espinhos (acantopódios), um núcleo com nucléolo proeminente, além de possuir vacúolo contrátil e fagocitário. Este estágio predomina enquanto houver condições ótimas de crescimento, tais como fonte alimentar abundante, pH neutro, temperatura adequada (30 °C) e osmolaridade entre 50 a 80 mOsmol. É observado que o tempo de geração difere em 8 a 24 horas entre diferentes espécies/genótipos, período pelo qual a célula passa por uma série de fases distintas, culminando na sua multiplicação, que é assexual e ocorre por fissão binária (Khan, 2009).

Na forma de cisto, a ameba realiza um processo de condensação, dando origem a uma estrutura redonda, com parede celular dupla correspondente ao endocisto e ectocisto, cujas medidas variam de 10 a 25 μ m. Esta condição garante sua sobrevivência diante de situações hostis, nas quais permanecerá

metabolicamente inativa ou com atividade metabólica mínima (Khan, 2006; Visvesvara et al., 2007).

Cabe salientar que, muitas vezes, *Acanthamoeba* spp. é encontrada em associação com biofilmes, o que também pode facilitar sua sobrevivência no ambiente. É notório que microorganismos agrupados em biofilmes são menos susceptíveis aos tratamentos antimicrobianos, incluindo a desinfecção, constituindo uma proteção adicional para AVL (Thomas et al., 2010).

2.2.3 Atividade carreadora de microorganismos (“Cavalo de Tróia”)

Diversos estudos demonstram a habilidade de *Acanthamoeba* spp. em promover um ambiente intracelular adequado para a sobrevivência de inúmeros microorganismos patogênicos. Entre eles, destacam-se *Acinetobacter baumannii* (Bouvet & Grimont, 1986) (Proteobacteria: Moraxellaceae) (Cateau et al., 2011), *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer, 1907) (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) (Scheid & Schwarzenberger, 2011), *Campylobacter jejuni* (Jones et al., 1931) Véron & Chatelain, 1973 (Proteobacteria: Campylobacteraceae) (Axelsson-Olsson et al., 2005), *Chlamydia* spp. (Jones et al., 1945) (Chlamydiae: Chlamydiaceae), *Mycobacterium* spp. (Lehmann & Neumann, 1896) (Actinobacteria: Mycobacteriaceae), *Pseudomonas* spp. (Migula, 1894) (Proteobacteria: Pseudomonadaceae), *Legionella* spp. (Brenner et al., 1979) (Proteobacteria: Legionellaceae) (Declerck et al., 2007; Iovieno et al., 2010), *Vibrio cholerae* (Pacini, 1854) (Proteobacteria: Vibrionaceae) (Sandström et al., 2010), *Escherichia coli* K1 (T. Escherich, 1885) (Proteobacteria: Enterobacteriaceae) (Alsam et al., 2006), *Shigella dysenteriae* (Shiga, 1897)

Castellani & Chalmers, 1919 e *Shigella sonnei* (Levine, 1920) Weldin, 1927 (Proteobacteria: Enterobacteriaceae) (Saeed et al., 2009).

A interação com AVL pode ser benéfica às bactérias patogênicas pela facilidade de escapar da predação e pela possibilidade de crescimento em um protozoário que, normalmente, fagocita e digere espécies de bactérias não-resistentes. Diante da resistência à digestão intracelular, ocorre, possivelmente, sobrevivência no interior de formas císticas, acarretando em proteção para qualquer microorganismo, diante de condições ambientais deletérias. Em adição, o crescimento em trofozoítos permite a manutenção constante da multiplicação intracelular (Thomas et al., 2010).

Apesar da capacidade de albergar inúmeros microorganismos, pesquisas revelam que *Acanthamoeba* spp. não consegue manter algumas bactérias em seu meio intracelular. Neste caso, outros mecanismos podem ser ativados, como na interação entre *Acanthamoeba castellanii* (Sarcomastigophora: Acanthamoebidae) e *Vibrio parahaemolyticus* (Fujino et al., 1951) (Proteobacteria: Vibrionaceae), observada em co-cultivo. Nesta situação, a bactéria apresenta sobrevivência extracelular dependente de fatores produzidos e secretados pelo protozoário (Laskowski-Arce & Orth, 2008).

Embora existam inúmeras evidências de que *Acanthamoeba* spp. atua como um “cavalo de Tróia”, podendo albergar vírus, bactérias, fungos e protozoários, um maior aprofundamento acerca destas interações se faz necessário (Khan, 2009). É importante elucidar qual organismo é beneficiado neste tipo de relação, além de definir a capacidade de transmissão e a

viabilidade de microorganismos entre cepas de *Acanthamoeba* spp. e o ambiente.

2.2.4 Caracterização morfológica e genotípica

O gênero *Acanthamoeba* é dividido em três grupos distintos de acordo com a morfologia e tamanho dos cistos (Pussard & Pons, 1977). Espécies pertencentes ao grupo I são caracterizadas por cistos grandes (> 18 µm) com um endocisto em formato estrelar e ectocisto liso ou enrugado. O grupo II apresenta cistos pequenos (< 18 µm) com endocisto levemente estrelar de aspecto poliédrico, globular ou ovóide, e ectocisto enrugado. Já o grupo III contém cistos menores que 19 µm com endocisto redondo, e ectocisto fino e liso. As espécies representadas por cada grupo morfológico são demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição das principais espécies de *Acanthamoeba* em grupos morfológicos:

Grupo I	Grupo II	Grupo III
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. mauritaniensis</i>	<i>A. palestinensis</i>
<i>A. comandoni</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. culbertsoni</i>
<i>A. echinulata</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. royreba</i>
<i>A. tubiashi*</i>	<i>A. quina</i>	<i>A. lenticulata</i>
	<i>A. divionensis</i>	<i>A. pustulosa</i>
	<i>A. triangularis</i>	
	<i>A. lugdunensis</i>	
	<i>A. griffini</i>	
	<i>A. rhyodes</i>	
	<i>A. paradivionensis</i>	
	<i>A. hatchetti*</i>	

Adaptado de Khan (2006).

* Espécies classificadas posteriormente, por Visvesvara (1991).

Posteriormente, Page (1988) agregou informações relevantes aos dados já existentes, descrevendo o tipo de locomoção e o comportamento de

trofozoítos em distintas temperaturas, resultando na criação de uma chave dicotômica para a identificação de AVL.

Entretanto, ao longo do tempo, foi verificado que a classificação de espécies de *Acanthamoeba* spp., baseada unicamente em características morfológicas, apresentava algumas limitações. Vários estudos demonstraram que uma mesma cepa poderia exibir variações significativas na morfologia de cistos e trofozoítos. Neste contexto, foi de fundamental importância o desenvolvimento de técnicas moleculares para a reclassificação do gênero, principalmente com base na similaridade da região 18S do RNA ribossomal (18S rDNA) (Khan, 2006).

Desde então, a caracterização molecular deste grupo de AVL tem sido realizada de forma constante e progressiva. Stothard et al. (1998) inicialmente propuseram a classificação de espécies de *Acanthamoeba* spp. em 12 genótipos (T1-T12), conforme Tabela 2.

Tabela 2. Classificação genotípica de espécies de *Acanthamoeba*, segundo Stothard et al., 1998.

Genótipo	Espécie	Acesso GenBank
T1	<i>A. castellanii</i>	U07400
T2	<i>A. palestinensis</i> <i>A. pustulosa</i> <i>A. polyphaga</i>	U07411 AF019050 AF019051
T3	<i>A. griffini</i> <i>A. polyphaga</i> <i>A. pearcei</i>	U07412; S81337 AF019052 AF019053
T4	<i>A. castellanii</i> <i>A. lugdunensis</i> / <i>A. polyphaga</i> <i>A. hatchetti</i> <i>A. polyphaga</i> <i>A. culbertsoni</i> <i>A. rhyodes</i>	U07413; U07414; U07416; U07401; U07403; U07405 U07407 AF019060 U07415; AF019061; U07402; AF019056; AF019062 AF019057 U07417; U07406
T5	<i>A. lenticulata</i>	U94741; U94738; U94730; U94732 U94733; U94731; U94735; U94737 U94736; U94740; U94739; U94734
T6	<i>A. palestinensis</i>	AF019063
T7	<i>A. astronyxis</i>	AF019064
T8	<i>A. tubiashi</i>	AF019065
T9	<i>A. comandoni</i>	AF019066
T10	<i>A. culbertsoni</i>	AF019067
T11	<i>A. stevensoni</i> <i>A. hatchetti</i>	AF019069 AF019068
T12	<i>A. healyi</i>	AF019070

De forma complementar, Horn et al. (1999) identificaram duas sequências genotípicas adicionais, T13 e T14, sendo representadas por *Acanthamoeba* sp. UWC9 e *Acanthamoeba* sp. UWE39, respectivamente. Hewett et al. (2003) descreveram o genótipo T15, correspondendo a sequências de *Acanthamoeba jacobsi*. Em 2005, Maghsood et al. propuseram a subdivisão do genótipo T2 em T2a e T2b, em virtude de diferença

correspondente a 4,9% em sequências genóticas deste grupo. Corsaro & Venditti (2010) encontraram evidências de um novo genótipo, T16, enquanto Nuprasert et al., (2010) relataram o último genótipo identificado até o momento, denominado T17.

Cabe salientar que a classificação molecular exige uma divergência de 5% ou mais entre as sequências nucleotídicas de *Acanthamoeba* spp., para estabelecimento dos distintos grupos genotípicos (Khan, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Foram analisadas populações de mosquitos coletadas no município de Porto Alegre, capital do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil), a qual se localiza sob 30° 01' 59" de latitude Sul e 51° 13' 48" de longitude Oeste do Meridiano de Greenwich. Apresenta uma área total de 496,8 Km² e população estimada em 1.409.351 habitantes, de acordo com os últimos dados da Fundação de Economia e Estatística (FEE, 2010).

A coleta de imaturos foi realizada entre os meses de janeiro e fevereiro, compreendendo os anos de 2010 e de 2011. O Levantamento de Índice Rápido de *A. aegypti* (LIRAA) em Porto Alegre, demonstrou que o Índice de Infestação Predial (IIP)¹ médio, verificado em janeiro de 2010 e de 2011, correspondeu a 2,0% e a 2,1%, respectivamente. Conforme o Ministério da Saúde, estes percentuais representam um risco médio para a transmissão de dengue, embora vários locais do município apresentem índices acima de 3,9%, considerados de alto risco (Prefeitura Municipal de Porto Alegre, 2011).

¹ $IIP = \frac{\text{Imóveis positivos}}{\text{Imóveis pesquisados}} \times 100$

Para este estudo, selecionou-se 10 bairros com presença reconhecida do mosquito vetor, a saber: Auxiliadora, Bom Jesus, Cavahada, Camaquã, Cidade Baixa, Cristal, Jardim Carvalho, Jardim Vila Nova, Protásio Alves e Santa Tereza (Figura 5).

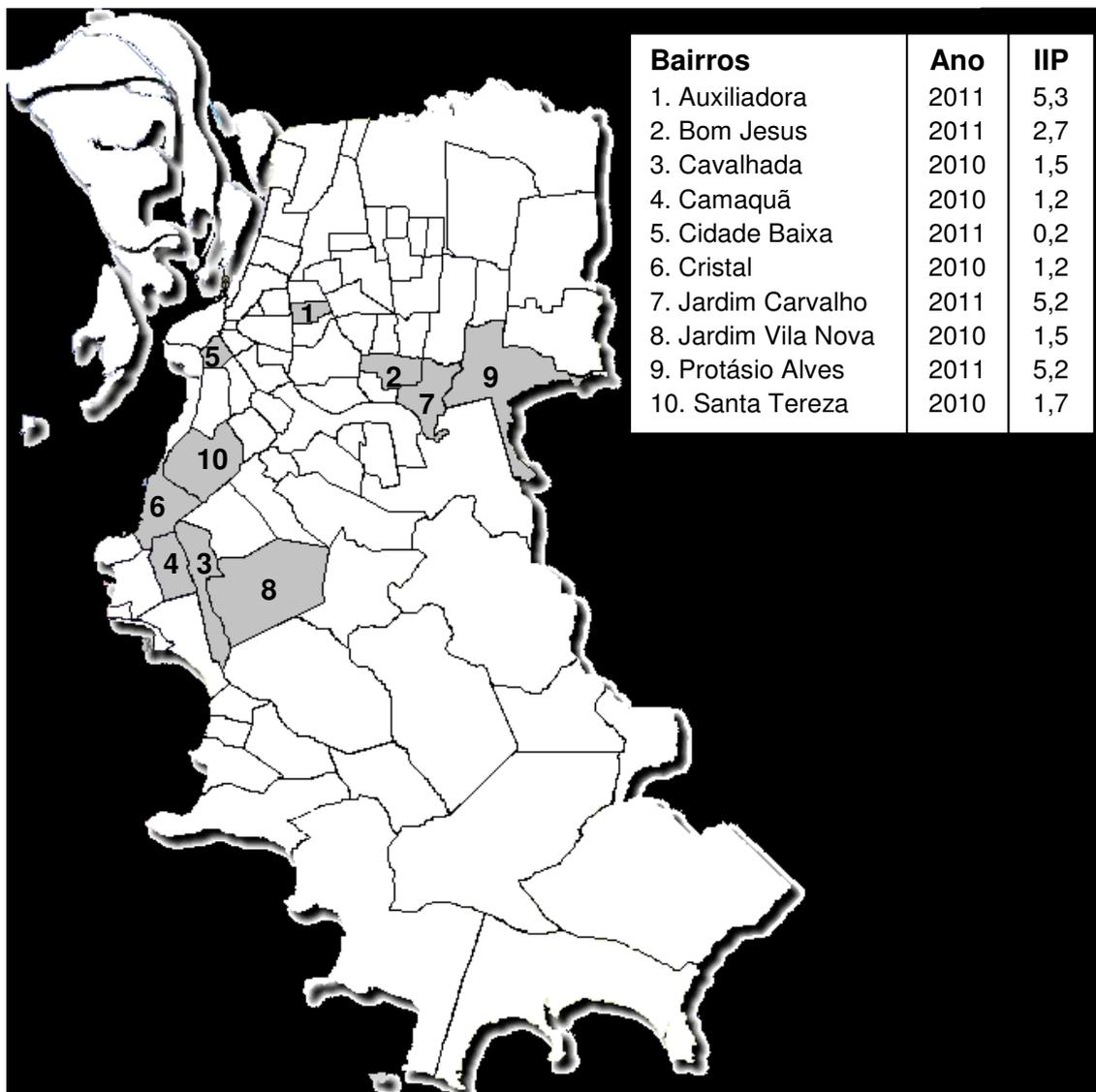


Figura 5. Localização dos bairros de Porto Alegre (RS, Brasil) incluídos no estudo e seus respectivos índices de infestação predial (IIP) para o mês de janeiro (2010 e 2011).

3.2 Amostragem

Como não há dados prévios disponíveis na literatura sobre a prevalência esperada de *Acanthamoeba* spp. em populações silvestres de *A. aegypti*, não foi possível a realização de cálculo para a obtenção do tamanho amostral. Desta forma, o critério de seleção foi a disponibilidade de formas imaturas de culicídeos, com realização de 60 coletas (n = 60), entre janeiro e fevereiro de 2010 e de 2011.

3.3 Obtenção de larvas de *A. aegypti*

O presente estudo foi conduzido com 600 larvas de *A. aegypti*. Para a aquisição de tais espécimes, foram utilizadas armadilhas de oviposição (ovitrapas), compostas por recipientes plásticos na cor preta, com capacidade de 500 mL de líquido, e palhetas de fibra de madeira reconstituída (Eucatex®), com 15 cm de comprimento e 3 cm de largura (Figura 6). As palhetas foram parcialmente submersas em água, para que fosse possível a realização de oviposição na parte imediatamente superior à lâmina d'água, onde a palheta encontrava-se úmida.

As ovitrapas foram depositadas em locais protegidos da incidência solar, localizando-se aproximadamente a 1 metro de distância do solo. Alguns materiais foram utilizados para auxiliar a coleta das formas imaturas, tais como pipeta Pasteur, peneira, concha e lanterna.

Foram distribuídas 32 armadilhas de oviposição em 10 bairros distintos da cidade de Porto Alegre (RS, Brasil). Destas, cinco foram examinadas entre

os meses de janeiro e fevereiro de 2010, enquanto 27 foram instaladas no ano seguinte, entre o mesmo período.

Após sete dias da instalação das armadilhas, as mesmas eram inspecionadas, procedendo-se com o recolhimento das formas larvais existentes em tubos de ensaio limpos e envio imediato ao laboratório (Figura 7). De cada armadilha, 10 larvas do culicídeo eram utilizadas.

A identificação dos espécimes foi realizada microscopicamente, de acordo com chaves taxonômicas (Forattini, 2002), sendo que a observação de características peculiares, relacionadas ao pécten, foi de extrema importância para sua rápida e precisa caracterização.



Figura 6. Armadilha instalada em Porto Alegre (RS, Brasil) para obtenção de larvas de *A. aegypti*. Fonte: Dayane Otta



Figura 7. Larvas de *A. aegypti*, coletadas em Porto Alegre (RS, Brasil) e enviadas ao laboratório de parasitologia de UFRGS, acondicionadas em tubo de ensaio.
Fonte: Dayane Otta/ Laboratório de Parasitologia UFRGS

Os procedimentos empregados para as coletas respeitaram as condições necessárias de segurança, tendo sido aprovadas, previamente, pela Secretaria de Saúde do município de Porto Alegre.

3.4 Desenvolvimento larval em laboratório

As larvas jovens coletadas, pertencentes ao 1º e 2º ínstar, foram mantidas em laboratório, por período de três a quatro dias, a fim de atingirem os estádios adequados para seu processamento. Para estes casos pontuais, o desenvolvimento larval ocorreu em câmara biológica (Tecnal®) com temperatura ajustada de 28 ± 1 °C, umidade relativa de $80 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas, em concordância com Silva et al. (1998). Durante este período, os imaturos permaneceram no mesmo ambiente líquido ao qual foram coletados, sem a oferta de alimentação adicional.

3.5 Lavagem de larvas de *A. aegypti*

Com o intuito de remover todo e qualquer contaminante externo, incluindo linhagens de *Acanthamoeba* spp. que poderiam estar aderidas a sua superfície, as larvas utilizadas passaram por um rigoroso processo de lavagem.

Primeiramente, as formas larvais foram acondicionadas em tubos Falcon estéreis, que foram constituídos por grupos de 10 larvas cada, oriundas da mesma ovitrampa. Em seguida, foram adicionados 5 mL de água destilada estéril gelada, com centrifugação e posterior remoção do volume líquido. Realizou-se lavagem em 2 mL de tampão fosfato pH 7,2 (PBS) e centrifugação por 5 minutos a 1.500 rpm. O procedimento descrito foi repetido por mais duas vezes, totalizando três lavagens. Após, cada *pool* foi transferido para um tubo Eppendorf, onde foi realizada a maceração dos espécimes com micropistilo esterilizado.

3.6 Isolamento de amebas de vida livre

Para o isolamento e cultivo de AVL, foram utilizadas placas de Petri estéreis contendo ágar não-nutriente (ANN) a 1,5% com uma sobrecamada de *Escherichia coli* (ATCC 25922) mortas pelo calor, a 56 °C por 2 horas.

A presença de cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. foi investigada em *pools* contendo 10 larvas de *A. aegypti* pertencentes ao 3º e 4º estágio. As larvas, após a maceração, foram centrifugadas a 1.500 rpm, por 5 minutos, e 50 µL do sedimento foram depositados no centro da placa, servindo como inóculo. O procedimento foi realizado em triplicata.

Após a adição do inóculo, as placas foram vedadas com filme plástico Parafilm® (SPI Supplies, West Chester, PA, USA) e mantidas em estufa bacteriológica, a 30°C. Transcorridas 48 horas, procedia-se com a análise do material ao microscópio óptico para detectar cistos e trofozoítos de AVL, em aumento de 100X. As placas negativas para amebas foram monitoradas por 30 dias e, mantendo-se nesta condição, eram destinadas ao descarte.

Como controle negativo, foram utilizadas larvas de *A. aegypti* pertencentes à linhagem Rockefeller, protegidas do contato com *Acanthamoeba* spp. Os espécimes foram lavados conforme descrito anteriormente, macerados e inoculados em placas de ANN 1,5%. O material foi mantido sob 30°C, com observação microscópica realizada durante o período de 30 dias, visando identificar possíveis materiais e/ou soluções contaminadas pelo protozoário.

3.7 Obtenção de culturas monoxênicas de amebas de vida livre

Diante da evidenciação de amebas em placas de ANN por observação microscópica, foram realizados subcultivos monoxênicos a fim de eliminar espécimes contaminantes, essencialmente compreendidos por bactérias e estruturas fúngicas. Deste modo, o procedimento consistiu na remoção de partes do ágar com melhor visualização de cistos ou trofozoítos de amebas, transferindo-as para outra(s) placa(s), em iguais condições da cultura primária, até a remoção completa dos microorganismos indesejados. Em amostras com intensa contaminação por fungos filamentosos e leveduras, utilizou-se uma sobrecamada de Anfotericina B (Fungizona®).

3.8 Clonagem de amebas de vida livre

A clonagem de trofozoítos de AVL foi realizada para a obtenção de populações geneticamente puras. Inicialmente, obteve-se uma suspensão amebiana de cada isolado, oriunda da remoção de trofozoítos do cultivo monoxênico. Uma alíquota do material (18 μ L) foi depositada em câmara de Fuchs-Rosenthal para a contagem de trofozoítos, sendo a concentração ajustada para 200 trofozoítos/mL, com estimativa de um trofozoíto a cada 5 μ L. Deste modo, a suspensão foi distribuída em volumes de 5 μ L em cada um dos 16 campos, delimitados externamente com caneta retroprojeter, em uma nova placa de ANN 1,5% recoberta por *E. coli* (ATCC 25922) (Figura 8). Após, os campos foram visualizados ao microscópio óptico, em aumento de 100X e, um trofozoíto foi selecionado aleatoriamente para a realização de um subcultivo em nova placa, finalizando o processo de clonagem.

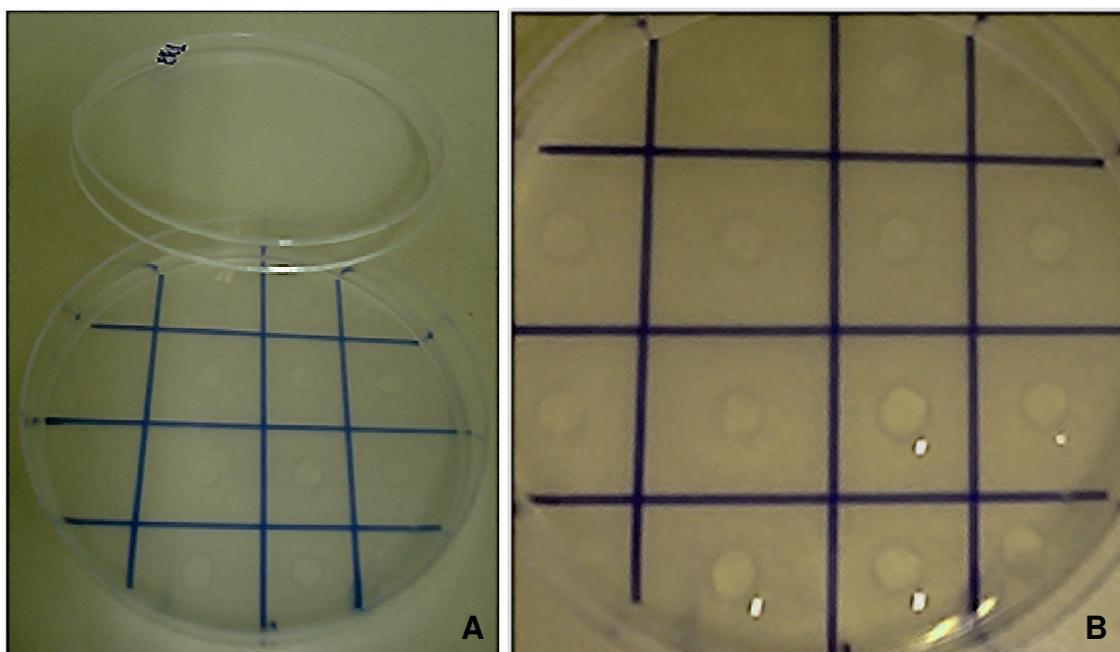


Figura 8. Clonagem de AVL. Placa de ANN 1,5% com 16 campos contendo 5 μ L de suspensão amebiana (A e B). Fonte: Dayane Otta/ Laboratório de Parasitologia UFRGS

3.9 Caracterização morfológica dos isolados de *Acanthamoeba*

3.9.1 Teste de exflagelação

Com o objetivo de excluir a presença de *Naegleria* spp. (Sarcomastigophora: Vahlkampfiidae) entre os isolados, realizou-se o teste de exflagelação. Esta AVL apresenta morfologia semelhante à *Acanthamoeba* spp., entretanto, diferencia-se desta pela emissão de flagelos quando em contato com ambientes líquidos. Sendo assim, uma placa de ANN 1,5% de cada isolado foi acrescida de 10 mL de água destilada estéril, em temperatura ambiente. O líquido foi transferido para frascos de cultura estéreis e incubados a 37°C. O conteúdo dos frascos foi analisado em microscópio óptico invertido a cada 30 minutos, durante 4 horas (De Carli, 2001; Silva & Rosa, 2003).

3.9.2 Análise do tamanho de cistos

Para esta avaliação, cistos de *Acanthamoeba* spp. foram submetidos à coloração por tricrômico, de acordo com Brückner & Garcia (1993). Sendo assim, 3 mL de suspensão amebiana foi centrifugada a 2.500 rpm durante 5 minutos. As lavagens foram repetidas por mais duas vezes, utilizando-se PBS. O sedimento foi ressuspenso em solução salina de Page e, posteriormente, acrescido de fixador acetato de sódio - ácido acético - formaldeído (SAF), desenvolvido por Junod (1972).

Uma alíquota de 100 µL foi transferida a uma lâmina de microscopia, com secagem em estufa bacteriológica a 37°C, por três horas. A coloração por

tricolor foi realizada em cubas de *Coplin* e, após estarem secas, as lâminas foram observadas em microscópio óptico, com aumento de 1000X.

A análise de cistos baseou-se na observação de suas medidas e de sua dupla parede, conforme descrito por Pussard & Pons (1977) e Page (1988). Foi realizada avaliação morfométrica de 10 cistos em ocular milimetrada, para a obtenção de uma média aritmética.

Eventual consulta acerca do preparo dos reativos pode ser realizada no ANEXO I.

3.9.3 Tempo de contração de vacúolos pulsáteis

A fim de verificar o tempo de contração de vacúolos pulsáteis, realizaram-se contagens cronometradas a partir de trofozoítos, em culturas monoxênicas. As observações foram feitas em microscópio óptico, diante de aumento de 100X. Cada contagem teve início a partir do fechamento do vacúolo, com encerramento após a abertura total e novo fechamento do mesmo (De Carli, 2001). As contagens foram realizadas em 10 trofozoítos de cada isolado, procedendo-se com o cálculo para a obtenção de uma média aritmética.

3.10 Caracterização molecular dos isolados de *Acanthamoeba*

3.10.1 Extração de DNA genômico

Para a realização da extração de DNA genômico, utilizou-se suspensão com 1.000.000 trofozoítos/mL, os quais foram submetidos a três processos de

lavagem para recuperação do sedimento, com centrifugações a 2.500 rpm por 10 minutos. Os procedimentos foram realizados de acordo com protocolo de Aljanabi & Martinez (1997), com algumas modificações.

Inicialmente, os sedimentos foram suspensos em 400 μ L de tampão TEN (0,4 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA pH 8,0), com agitação em vórtex por 10 a 15 segundos. Após, foram adicionados 40 μ L de dodecil sulfato de sódio 20% (SDS) (concentração final de 2%) e 8 μ L de proteinase K 20 mg/mL (concentração final de 400 μ g/mL), sendo homogeneizados e incubados a 56°C por período mínimo de 1 hora. Em seguida, 300 μ L de NaCl (6 M) foram acrescentados em cada amostra, com agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugação por 20 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 700 μ L de isopropanol foram adicionados, procedendo-se com a incubação do material a -20°C por 1 hora. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 12.000 rpm e, após, o sedimento foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado, desta vez durante 10 minutos a 12.000 rpm. Finalmente, o material foi desidratado sob temperatura ambiente e ressuspenso em 60 μ L de água ultra-pura autoclavada. O DNA obtido foi imediatamente utilizado para ensaios de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou armazenado a -20°C até posterior utilização.

3.10.2 Quantificação e pureza do DNA genômico

A quantificação e a qualidade das amostras de DNA extraídas foram mensuradas a partir de espectrofotômetro (NanoVue - GE Healthcare) em comprimento de onda de 260 nm e razão entre 260/280 nm. A taxa entre as

leituras em 260 nm e 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) fornece uma estimativa da pureza do ácido nucléico. Preparações puras de DNA contêm OD_{260}/OD_{280} com valores próximos a 1,8 (Sambrook et al., 1989). Também utilizou-se gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, uma vez que a corrida em gel é uma ferramenta valiosa para verificar a integridade do material genético.

3.10.3 Confirmação do gênero *Acanthamoeba* por PCR

A confirmação do gênero *Acanthamoeba* foi realizada pela *Polymerase Chain Reaction* (PCR), de acordo com Booton et al. (2004). Para o emprego da técnica, foram utilizados os *primers* específicos JDP, que apresentam as seguintes sequências oligonucleotídicas:

JDP1 (Forward): 5' – GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA – 3'

JDP2 (Reverse): 5' – TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA – 3'

Para isolados de *Acanthamoeba*, os *primers* JDP amplificam um fragmento de 423-551 pb da região 18S do rDNA, denominado *Acanthamoeba-specific amplimer S1* (ASA.S1), conforme proposto por Schroeder et al. (2001).

Cada reação foi realizada com volumes de 25 μL , contendo DNA molde, 0,2 mM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 0,4 μM de cada oligonucleotídeo (InvitrogenTM), 1,5 mM de MgCl_2 , Tampão de reação 5X (*5X Green/Colorless GoTaq® DNA Polymerase*), 1U de *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega) e água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) (Ambion®) em quantidade suficiente para completar o volume.

As condições de PCR incluíram uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 67 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, com uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72 °C.

Os fragmentos amplificados foram separados, por eletroforese, em gel de agarose corado com brometo de etídio 2% e visualizados em transluminador ultravioleta. O controle negativo abrangeu todos os reagentes, com exceção do DNA, além de ser utilizada *E. coli* (ATCC 25922) para tal finalidade.

3.10.4 Purificação de bandas do DNA genômico

As bandas de DNA genômico de alguns isolados, observadas em luz ultravioleta, foram removidas do gel de agarose e purificadas com o kit comercial *PureLink™ Quick Gel Extraction* (Invitrogen™). As instruções do fabricante foram seguidas com algumas adaptações. Primeiramente, 400 mg do gel de agarose contendo DNA foi dissolvido em 1,2 mL de tampão, denominado *Buffer L3*, a 50°C. O gel dissolvido foi centrifugado a 12.000 xg por 1 minuto, em tubo com coluna, com posterior adição de 500 µL de tampão de lavagem *Wash Buffer W1*, contendo etanol. Em seguida, realizou-se centrifugação a 12.000 xg por 2 minutos, sendo o procedimento repetido por três vezes. O material foi eluído em 30 µL do tampão de eluição *Elution Buffer E5*, incubado por 20 minutos em temperatura ambiente e submetido à nova centrifugação, concluindo o processo de purificação. As amostras de DNA purificadas foram quantificadas e distribuídas em tubos criogênicos, estando aptas para o sequenciamento.

3.10.5 Sequenciamento dos isolados de *Acanthamoeba*

Parte representativa dos isolados de *Acanthamoeba* tiveram seus fragmentos genômicos enviados à empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul) para realização da técnica de sequenciamento. As reações foram conduzidas com o kit *BigDyeTM Terminator* (Applied Biosystems), a partir de sequenciador automático ABI 3730XL. Foram enviados 50 ng de DNA purificado de 26 amostras, além de *primers* JDP1 e JDP2 na concentração de 10 pmol.

3.10.6 Análise de sequências nucleotídicas

As sequências obtidas foram visualizadas com auxílio do programa Chromas versão 2.24 (Technelysium Pty Ltd) (Figura 9), analisadas com ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e editadas manualmente com o software BioEdit versão 7.0.9.0 (Hall, 1999). A comparação com o banco de dados nucleotídicos do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foi realizada por intermédio do programa BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para a determinação de grupos genotípicos, levou-se em consideração o maior índice de similaridade entre as sequências deste estudo e as sequências correspondentes às espécies publicadas por Stothard et al. (1998).

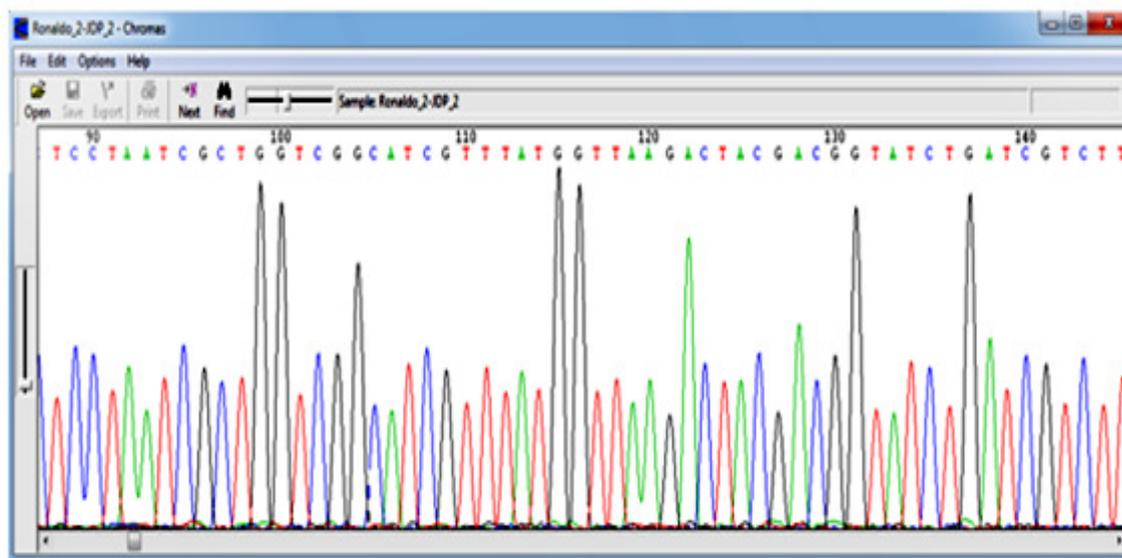


Figura 9. Imagem do software Chromas, empregado para a visualização de cromatogramas e seqüências nucleotídicas. Fonte: Dayane Otta/ Laboratório de Parasitologia UFRGS

3.11 Estimativa da patogenicidade dos isolados de *Acanthamoeba* através de testes fisiológicos

Dentre os isolados de *Acanthamoeba* spp. obtidos, 14 foram submetidos a análises fisiológicas, fornecendo uma perspectiva de seu comportamento frente a diferentes temperaturas (teste de termotolerância) e concentração osmolar (teste de osmotolerância). As metodologias foram descritas por Khan et al. (2001), relatando a importância dos estudos de tolerância para a avaliação do potencial patogênico de AVL.

3.11.1 Teste de termotolerância

Para análises de termotolerância, preparou-se uma suspensão amebiana de cada isolado, onde cerca de 1.000 trofozoítos, em 30 µL, foram inoculados no centro de placas de ANN 1,5%, recobertas por *E. coli* (ATCC 25922). As placas foram incubadas em três temperaturas distintas: 30°C

(controle positivo), 37°C e 42°C por 10 dias. O crescimento dos microorganismos foi classificado como intenso, moderado, discreto ou negativo, diante da contagem de cistos e de trofozoítos presentes a uma distância de 20 mm do inóculo, em cinco campos microscópicos distintos (aumento de 100X). Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.11.2 Teste de osmotolerância

Para mensurar a influência de diferentes osmolaridades sobre o crescimento dos isolados, foram utilizadas placas de ANN 1,5%, recobertas por *E. coli* (ATCC 25922), contendo concentrações de 0,5 e 1,0 M de manitol. Cerca de 1.000 trofozoítos, em 30 µL, foram inoculados no centro das placas, com incubação a 30°C por 10 dias. Para controle do crescimento amebiano, foram utilizadas placas de ANN 1,5% sob as mesmas condições de incubação, porém, com ausência de manitol. O crescimento dos microorganismos foi classificado como intenso, moderado, discreto ou negativo, diante da contagem de cistos e de trofozoítos presentes a uma distância de 20 mm do inóculo, em cinco campos microscópicos distintos (aumento de 100X). Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.12 Cepas de referência da ATCC (*American Type Culture Collection*) para *Acanthamoeba* spp.

Duas cepas de referência foram utilizadas como controle positivo para os experimentos deste estudo, a saber, *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461, isolada de ceratite amebiana humana (origem clínica) e *Acanthamoeba*

polyphaga ATCC 30872, isolada de massa d'água de um lago (origem ambiental). Tais microorganismos são mantidos e cultivados no laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.13 Análise dos dados

Os dados foram avaliados mediante o emprego de estatística descritiva, compreendendo cálculos de média, desvio-padrão e percentuais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Positividade de armadilhas para larvas de *A. aegypti*

Todas as armadilhas estabelecidas no ano de 2010 foram positivas para larvas de *A. aegypti* em uma única ocasião, constituindo unicatas. Assim, coletou-se larvas de *A. aegypti* nos bairros Camaquã, Cavalhada, Cristal, Jardim Vila Nova e Santa Tereza.

Nas armadilhas instaladas em 2011, foram observados diferentes níveis de positividade a cada semana avaliada. O número de ovitrampas positivas foi maior na 7ª semana de observação (12/44,4%), enquanto os menores índices foram verificados nas quatro semanas iniciais de inspeção, correspondentes ao mês de janeiro de 2011 (Tabela 3).

Tabela 3. Armadilhas positivas para larvas de *A. aegypti*, de acordo com bairro de coleta e semana de observação (ano de 2011).

Bairro	Armadilhas instaladas	Semanas de observação							
		Janeiro				Fevereiro			
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a
Número de armadilhas positivas									
Auxiliadora	8	1	1	2	3	2	3	7	2
Bom Jesus	4	1	0	0	0	1	1	0	2
Cidade Baixa	1	0	0	0	0	0	0	0	1
J. Carvalho	4	0	1	1	1	3	2	1	1
Protásio Alves	10	1	3	1	0	4	3	4	2
Total (n)	27	3	5	4	4	10	9	12	8
Total (%)	100	11,1	18,5	14,8	14,8	37,0	33,3	44,4	29,6

Os meses do verão implicam, sabidamente, em condições favoráveis para o desenvolvimento de *A. aegypti*, facilitando seu encontro em grandes metrópoles. Em 2011, a temperatura média em Porto Alegre foi de 26°C, nos meses de janeiro e fevereiro, com precipitação pluviométrica média de 91,7 mm e 141,1 mm, respectivamente (Metroclima, 2011). Tais condições permitiram a coleta de um número satisfatório de larvas de *A. aegypti*.

4.2 Isolamento de AVL a partir de larvas de *A. aegypti*

Dos 60 *pools* de larvas de *A. aegypti* investigados, 54 (90%) albergavam AVL. Os isolados foram oriundos de culicídeos coletados em 17 locais distintos, compreendendo estabelecimentos comerciais e residências (Tabela 4).

Tabela 4. Número de *pools* de *A. aegypti* amostrados de acordo com o local de origem, positividade para AVL e isolados obtidos.

<i>Pools</i> de <i>A. aegypti</i>	Origem		Amostras AVL	Isolados AVL
	Bairro	Local		
7	Auxiliadora	Condomínio Residencial	7+	CA1-7
10	Auxiliadora	Estacionamento privado	8+	EE1-8
3	Auxiliadora	Estacionamento público	3+	EC1-3
1	Auxiliadora	Academia	1+	AC1
5	Bom Jesus	Condomínio Residencial	4+	CB1-4
1	Camaquã	Residência	1+	CAM1
1	Cavanhada	Residência	1+	CAV1
1	Cidade Baixa	Residência	1+	CIB1
1	Cristal	Residência	1+	CR1
8	Jardim Carvalho	Comércio	6+	COM1-6
2	Jardim Carvalho	Oficina Mecânica	2+	OF1-2
1	Jardim Vila Nova	Residência	1+	JVN1
9	Protásio Alves	Floricultura	8+	FL1-8
3	Protásio Alves	Auto-peças descoberta	3+	ROB1-3
4	Protásio Alves	Auto-peças coberta	4+	RON1-4
2	Protásio Alves	Posto de combustível	2+	PO1-2
1	Santa Tereza	Comércio	1+	ST1
60 pools	10 bairros	17 locais	54 isolados AVL	

O isolamento de amebas foi realizado entre o 3º e 5º dia após a inoculação do macerado de larvas de *A. aegypti*, em placas de ANN 1,5%. A única exceção constituiu-se no isolado EE5, cujo crescimento foi evidenciado no 26º dia da inoculação, e que posteriormente, demonstrou não pertencer ao gênero *Acanthamoeba*.

Os isolados, em geral, apresentavam trofozoítos característicos (Figura 10a), com vacúolos pulsáteis bastante definidos, além de acantopódios e núcleo evidente. As formas trofozoíticas persistiam por três a cinco dias, sendo progressivamente substituídas pelo estágio cístico (Figura 10b).

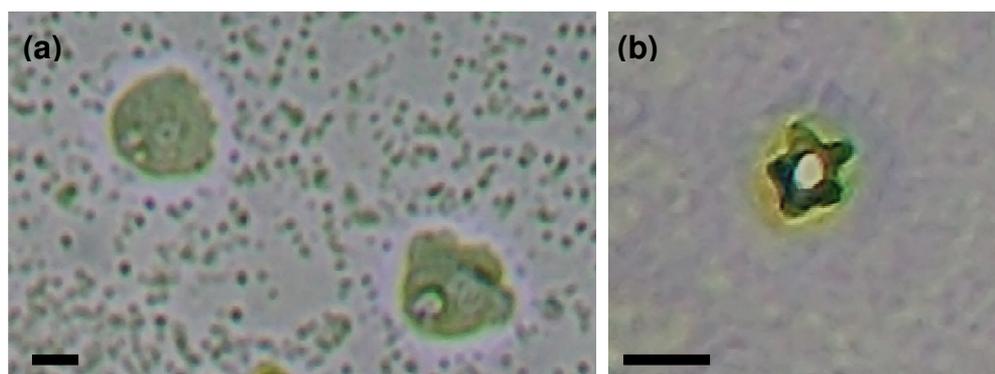


Figura 10. Trofozoítos (a) e cisto (b) do isolado ST1, em placa de ANN 1,5% com sobrecamada de *E. coli* (ATCC 25922). Microscópio óptico (100X). Barra = 10 μ m. Fonte: Dayane Otta/ Laboratório de Parasitologia UFRGS

A presença de contaminantes foi marcante em todas as placas com inóculo primário, abrangendo intenso número de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Figura 11). Sabe-se que as formas larvais de mosquitos contêm uma grande quantidade de microorganismos em seu interior, sendo este um aspecto relevante para o nível de contaminação verificado. A realização de repiques, a cada três dias, foi indispensável para a rápida redução de organismos indesejáveis, prosseguindo-se com o procedimento até a remoção completa dos mesmos (Figura 12).



Figura 11. Cistos do isolado EE4 contendo contaminação fúngica (hifas).
Microscópio óptico (100X). Barra = 60 μ m.
Fonte: Dayane Otta/ Laboratório de Parasitologia UFRGS

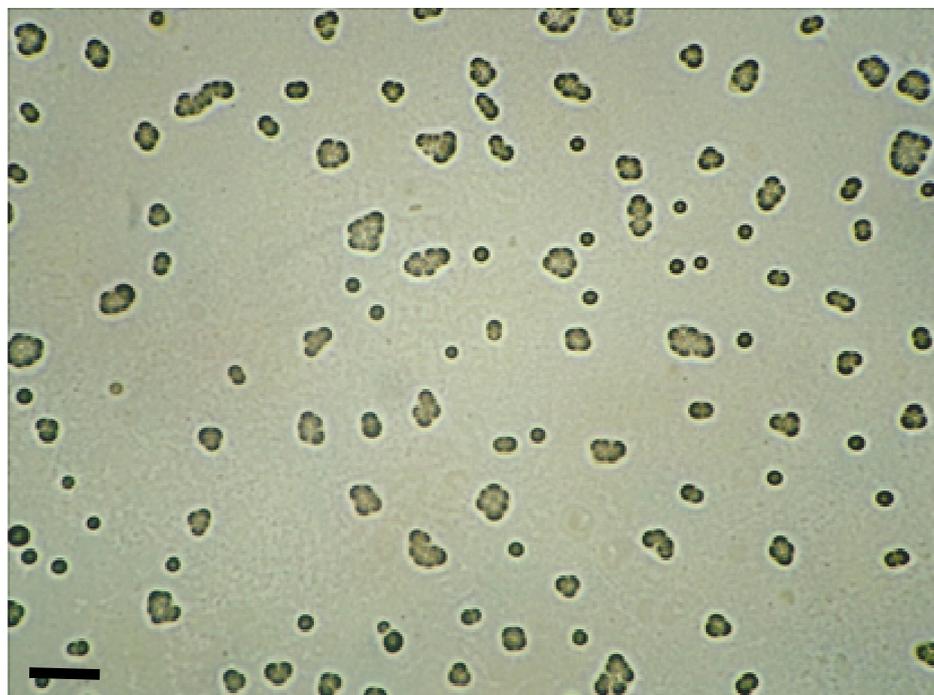


Figura 12. Cistos do isolado EE4 sem contaminação fúngica, após sucessivos repiques e uso de Fungisona®. Microscópio óptico (100X). Barra = 60 μ m.
Fonte: Dayane Otta/ Laboratório de Parasitologia UFRGS

Em adição, 12 amostras (22,2%) apresentaram presença concomitante de AVL e protozoários ciliados. A identificação de tais organismos ciliados não foi alvo de estudo, embora algumas pesquisas demonstrem seu papel na biologia de culicídeos. Eisenberg et al. (2000) realizaram estudo sobre a interação entre *Aedes sierrensis* (Diptera: Culicidae) e *Paramecium aurelia* (Ciliophora: Parameciidae), evidenciando que estes protozoários são capazes de persistir à intensa predação larval, servindo como um recurso alimentar estável e constante para as larvas.

Entre os *pools* de larvas de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller, utilizados como controle negativo, nenhum apresentou crescimento de AVL em placas de ANN 1,5%. Este dado revela a ausência de contaminação laboratorial pelo protozoário, demonstrando que todos os isolados amebianos foram oriundos do ambiente.

4.3 Caracterização morfológica dos isolados de AVL

4.3.1 Teste de exflagelação

Todos os isolados de AVL mostraram-se negativos para o teste de exflagelação, indicando a ausência de *Naegleria* spp. entre as amostras. Este grupo de amebas é caracterizado pela capacidade de seu trofozoíto em assumir uma forma flagelada durante o ciclo biológico. Tais organismos estão distribuídos mundialmente e podem ser encontrados em solo e em ambientes aquáticos (Schuster & Visvesvara, 2004).

Naegleria fowleri (Sarcomastigophora: Vahlkampfiidae) é uma espécie que detém considerável atenção, pois é considerada altamente patogênica para humanos e, por isso, concentra grande parte do interesse científico acerca deste gênero. Além disso, *Naegleria australiensis* e *Naegleria italica* são capazes de provocar infecção em camundongos (Visvesvara et al., 2007). Já em insetos, a presença desta AVL não é conhecida.

Cabe salientar que o teste de exflagelação pode resultar em alguns resultados falso-negativos, uma vez que os parâmetros para exflagelação de *Naegleria* spp. são bastante variáveis, e nem todos os isolados emitem flagelos em condições de laboratório (Behets et al., 2003). Por exemplo, Edagawa et al. (2009), entre 261 isolados distintos de *Naegleria* spp., evidenciaram que apenas 131 destes eram capazes de formar flagelos (50,2%). Por este motivo, a caracterização molecular de AVL é de suma importância, sendo representada neste estudo pela minuciosa pesquisa e identificação de *Acanthamoeba* spp., que é o gênero predominante em amostras ambientais.

4.3.2 Identificação e classificação do gênero *Acanthamoeba* por critérios morfológicos

Os isolados que apresentaram características fenotípicas compatíveis com *Acanthamoeba* spp. em cultivo monoxênico, foram selecionados para a realização de estudo morfológico. A coloração de tricrômico evidenciou cistos peculiares, com ectocisto e endocisto delimitados, possuindo medidas que se enquadravam ao gênero de interesse. Quanto aos trofozoítos, foi avaliado o tempo de contração de vacúolos pulsáteis para cada isolado (Tabela 5).

Tabela 5. Características morfológicas dos cistos de *Acanthamoeba* spp. e tempo de contração de vacúolos pulsáteis dos trofozoítos.

Isolado	Tamanho médio dos cistos (μm)* \pm desvio padrão	Formato do Endocisto	Formato do Ectocisto	Tempo de contração de vacúolos** \pm desvio padrão
AC1	15,8 \pm 1,2	Poligonal	Rugoso	30,9 \pm 3,5
CA1	14,6 \pm 1,3	Poligonal	Rugoso	36,5 \pm 2,9
CA2	14,4 \pm 1,9	Poligonal e estrelado	Rugoso e liso	38,7 \pm 2,8
CA3	15,5 \pm 0,9	Poligonal e estrelado	Rugoso e liso	38,6 \pm 3,4
CA4	15,3 \pm 1,5	Poligonal	Rugoso	36,2 \pm 1,8
CA5	14,9 \pm 1,7	Poligonal	Rugoso	39,5 \pm 3,1
CA6	14,2 \pm 0,5	Poligonal e estrelado	Rugoso e liso	31,9 \pm 3,6
CAV1	15,3 \pm 1,5	Poligonal	Rugoso	34,1 \pm 3,4
CAM1	15,9 \pm 1,3	Estrelado	Liso	37,2 \pm 3,4
CB1	16,2 \pm 1,1	Poligonal e estrelado	Rugoso e liso	31,1 \pm 3,3
CB2	15,7 \pm 0,8	Esférico	Liso	34,6 \pm 3,0
CB3	15,0 \pm 1,6	Poligonal	Rugoso	29,8 \pm 2,1
CB4	14,1 \pm 1,2	Estrelado	Liso	30,7 \pm 2,5
CIB1	16,4 \pm 0,5	Poligonal e estrelado	Rugoso e liso	32,0 \pm 2,2
COM1	14,3 \pm 0,6	Poligonal	Rugoso	35,4 \pm 3,9
COM2	15,9 \pm 1,1	Poligonal	Rugoso	36,9 \pm 3,4

Tabela 5 (continuação). Características morfológicas dos cistos de *Acanthamoeba* spp. e tempo de contração de vacúolos pulsáteis dos trofozoítos.

Isolado	Tamanho médio dos cistos (μm)* \pm desvio padrão	Formato do Endocisto	Formato do Ectocisto	Tempo de contração de vacúolos** \pm desvio padrão
COM5	14,2 \pm 1,5	Poligonal	Rugoso	35,1 \pm 3,6
CR1	11,2 \pm 0,7	Esférico	Rugoso	28,2 \pm 3,6
EC1	15,2 \pm 1,0	Poligonal	Rugoso	26,0 \pm 4,1
EC2	12,1 \pm 0,8	Poligonal	Rugoso	24,8 \pm 2,3
EC3	15,7 \pm 0,9	Poligonal	Rugoso	30,4 \pm 3,2
EE1	14,9 \pm 1,3	Poligonal	Rugoso	37,8 \pm 2,3
EE2	15,2 \pm 0,9	Esférico	Rugoso	39,8 \pm 2,9
EE3	16,5 \pm 1,1	Poligonal	Rugoso	33,4 \pm 3,3
EE4	16,4 \pm 0,8	Poligonal	Rugoso	30,1 \pm 3,7
EE6	14,3 \pm 1,4	Poligonal e triangular	Rugoso	34,0 \pm 4,0
EE8	13,4 \pm 1,2	Estrelado	Liso	48,7 \pm 3,2
FL1	16,6 \pm 1,1	Esférico	Liso	34,0 \pm 2,4
FL2	16,4 \pm 0,9	Poligonal e estrelado	Rugoso e liso	37,1 \pm 2,3
FL3	14,8 \pm 0,6	Poligonal	Rugoso	35,2 \pm 2,9
FL4	15,3 \pm 1,4	Esférico	Liso	31,4 \pm 1,8
FL5	16,7 \pm 1,0	Poligonal	Rugoso	30,3 \pm 2,6

Tabela 5 (continuação). Características morfológicas dos cistos de *Acanthamoeba* spp. e tempo de contração de vacúolos pulsáteis dos trofozoítos.

Isolado	Tamanho médio dos cistos (μm)* \pm desvio padrão	Formato do Endocisto	Formato do Ectocisto	Tempo de contração de vacúolos** \pm desvio padrão
FL6	15,3 \pm 0,7	Estrelado	Liso	35,5 \pm 2,3
FL7	16,1 \pm 0,9	Poligonal e estrelado	Rugoso e liso	33,8 \pm 2,9
FL8	14,3 \pm 1,3	Poligonal	Rugoso	33,5 \pm 2,2
JVN1	15,7 \pm 1,6	Esférico	Liso	35,9 \pm 3,3
OF1	15,2 \pm 1,1	Poligonal e estrelado	Rugoso e liso	39,9 \pm 3,6
OF2	15,8 \pm 1,3	Estrelado	Liso	32,4 \pm 5,0
PO2	14,9 \pm 1,7	Poligonal	Rugoso	29,3 \pm 1,9
ROB1	17,3 \pm 0,8	Poligonal	Rugoso	35,4 \pm 2,7
ROB2	16,6 \pm 1,1	Poligonal e estrelado	Rugoso e liso	39,2 \pm 2,5
ROB3	15,4 \pm 0,9	Estrelado	Liso	37,8 \pm 2,8
RON1	14,1 \pm 1,3	Estrelado	Liso	35,6 \pm 3,1
RON2	16,8 \pm 1,0	Poligonal	Rugoso	37,9 \pm 3,4
RON3	15,1 \pm 0,7	Poligonal	Rugoso	33,1 \pm 2,2
RON4	15,7 \pm 1,6	Estrelado	Liso	39,5 \pm 3,6
ST1	14,2 \pm 0,9	Estrelado	Liso	35,4 \pm 3,5

* Média determinada pela medida de 10 cistos de cada isolado.

** Média determinada pela cronometragem do tempo de contração de vacúolos em 10 trofozoítos de cada isolado (segundos).

Com base na observação de trofozoítos, verificou-se que a maioria dos isolados apresentaram tempo de contração de vacúolos inferior aos relatados por De Carli (2001), o qual descreveu intervalos que oscilavam entre 45 e 50 segundos para *Acanthamoeba* spp. Deste modo, apenas o isolado EE8 foi concordante com os dados da literatura. Em contrapartida, a análise morfológica de cistos forneceu todas as evidências necessárias para a identificação do gênero, onde 47 (87%) isolados demonstraram pertencer ao gênero *Acanthamoeba*.

A partir da observação das formas císticas, foi possível realizar a classificação inicial das amebas, de acordo com os grupos morfológicos estabelecidos por Pussard & Pons (1977). O grupo taxonômico II foi o mais prevalente, correspondendo a 43 (91,5%) isolados, enquanto características típicas do grupo III foram encontradas em 4 (8,5%) cepas (CB2, FL1, FL4 e JVN1). O diâmetro dos cistos variou de 11,2 a 17,3 μm .

A disparidade dos isolados, quanto ao endocisto e ectocisto, permitiu a diferenciação dos dois grupamentos taxonômicos encontrados no presente estudo, uma vez que as diferenças mais pronunciadas estão baseadas na morfologia destas estruturas. Algumas células submetidas à coloração por tricrômico podem ser visualizadas na Figura 13.

O aspecto heterogêneo observado em alguns cistos, do mesmo isolado, também foi uma observação importante. Algumas amostras contemplavam cistos com duas morfologias distintas, apesar do emprego da técnica de clonagem. Dentre os isolados de *Acanthamoeba* spp., 9 (19,15%) apresentaram associação de cistos poligonais e estrelados, enquanto 1 (2,1%)

continha cistos poligonais e triangulares. Estes resultados sugerem que as formas císticas deste protozoário podem apresentar algumas variações quanto à morfologia, sendo inerentes e específicas para cada isolado.

Estudos anteriores demonstraram que cistos de *Acanthamoeba* sofrem influência direta do ambiente ao qual se desenvolvem, podendo apresentar-se sob distintas formas (Sawyer, 1971; Stratford & Griffiths, 1978). Estas evidências serviram como subsídios para questionar a utilização da estrutura de cistos como critério taxonômico. Desta maneira, os métodos moleculares disponíveis atualmente servem como importante ferramenta na identificação precisa de *Acanthamoeba* spp.

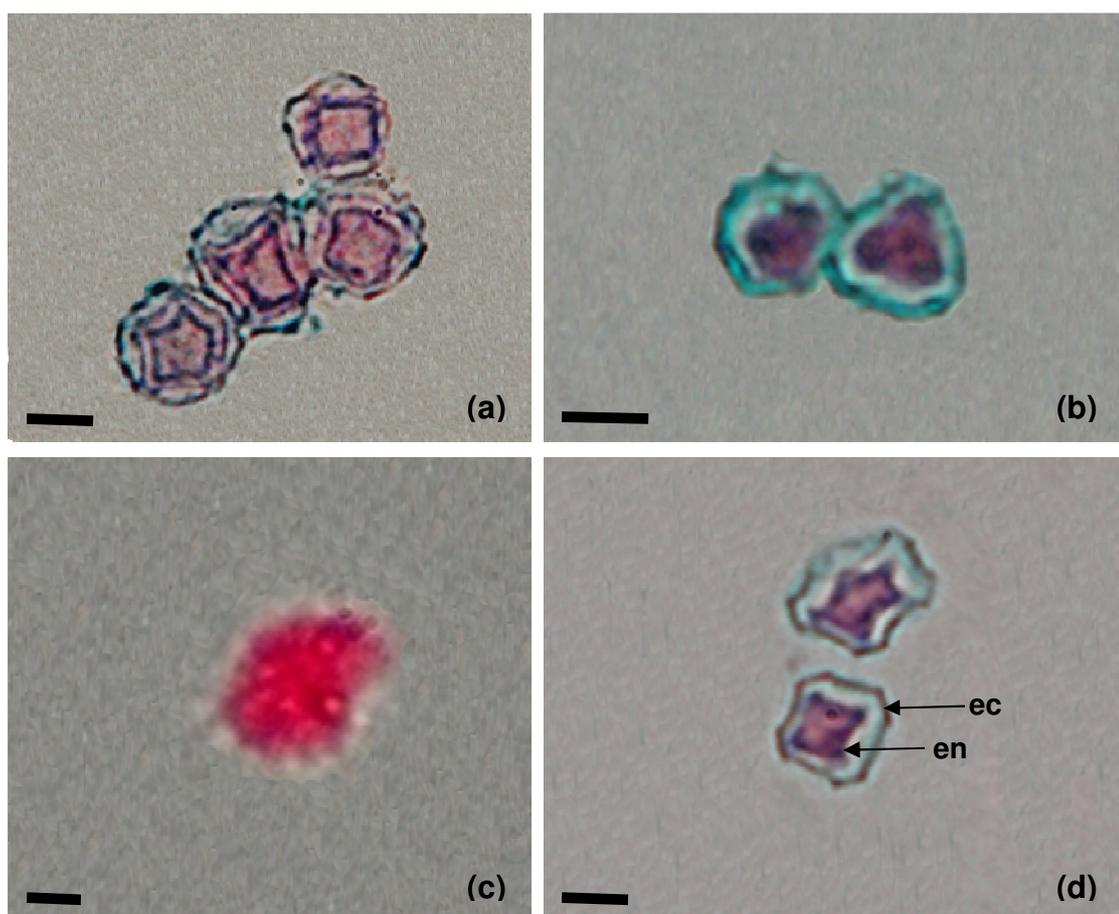


Figura 13. Isolados de *Acanthamoeba* spp. corados com tricrômico. Cistos do isolado FL2 (a), cistos do isolado EE6 (b), trofozoíto do isolado FL6 (c), cistos do isolado CB4 (d). Microscópio óptico (1000X). en: endocisto; ec: ectocisto. Barra = 10 μ m. Fonte: Dayane Otta/ Laboratório de Parasitologia UFRGS.

4.4 Caracterização molecular dos isolados de AVL

4.4.1 Pureza e concentração do DNA genômico

Todos os isolados de AVL foram submetidos à técnica de extração de DNA genômico, para posterior realização de análises moleculares.

As amostras de DNA apresentaram índices satisfatórios de pureza, com relação 260/280 oscilando entre 1,429 e 2,146, o que evidencia sua alta qualidade. Em relação à concentração do material genético, os resultados demonstraram grande eficiência da extração de DNA em trofozoítos, com valor máximo de 526,5 ng/μL, entre os isolados. As menores concentrações corresponderam a 3,5 ng/μL, 6,5 ng/μL e 11,8 ng/μL. Estes limítrofes inferiores podem ter sido observados em função de quantidade significativa de cistos presentes nas amostras (isolados COM5, RON3 e COM1, respectivamente), o que ratificaria a dificuldade existente na obtenção de material genético a partir de cistos de AVL.

Goldschmidt et al. (2008) evidenciaram a resistência de cistos de *Acanthamoeba* spp. a diversos métodos clássicos de extração de DNA. Na forma cística, os reativos empregados não são eficientes para promover a liberação de DNA. Tal fato ocorre devido a presença de dupla parede celular em cistos, composta pelo ectocisto e endocisto, a qual impede a devida lise das células e, conseqüentemente, a disponibilidade do conteúdo genético.

4.4.2 Confirmação do gênero *Acanthamoeba* por *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Dos 54 isolados de AVL obtidos neste estudo, 47 (87%) foram confirmados como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* pela técnica de PCR, em concordância com os resultados da análise morfológica. O padrão das bandas é demonstrado na Figura 14.

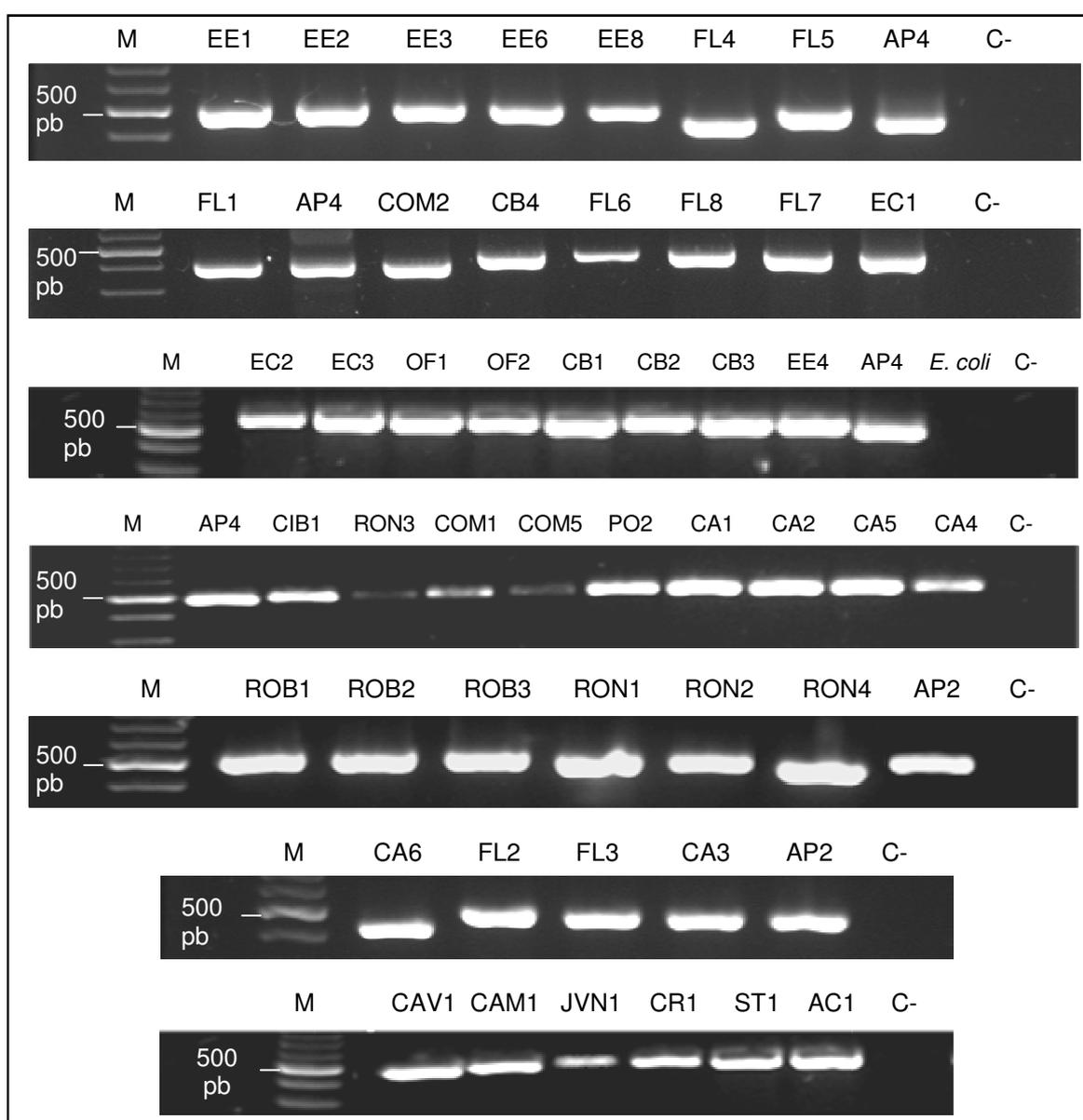


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR de *Acanthamoeba* spp., provenientes de populações naturais de *A. aegypti*. (M) Marcador de peso molecular (100 pb), (AP2) *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461, (AP4) *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30872, (*E.coli*) *Escherichia coli* ATCC 25922, (C-) Controle negativo.

Pesquisas apontam a técnica de PCR como valiosa ferramenta para a identificação de *Acanthamoeba* spp., uma vez que 1 a 10 trofozoítos são suficientes para garantir sua detecção (Schroeder et al., 2001). Neste estudo, a metodologia empregada mostrou-se bastante sensível, sendo que a concentração mínima de DNA utilizada, de 3,5 ng/ μ L, apresentou amplificação visível em gel de agarose. Como o esperado, a intensidade da banda foi inferior aos isolados que continham grandes concentrações de DNA extraído.

Esta é a primeira pesquisa dedicada ao isolamento de *Acanthamoeba* spp. em populações silvestres de *A. aegypti*. Anteriormente, Rott et al. (2010) descreveram a interação entre os dois organismos, diante de condições experimentais controladas. No estudo supracitado, uma suspensão de 1×10^6 trofozoítos/mL de *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30872) foi oferecida como fonte alimentar para cepas Rockefeller de *A. aegypti*. Como resultado, a inoculação de material macerado em placas de ANN 1,5%, com sobrecamada de *E. coli* (ATCC 25922), possibilitou o re-isolamento de *Acanthamoeba polyphaga* em larvas, pupas e adultos. Tais observações sugerem que o protozoário é capaz de evadir os mecanismos de proteção de mosquitos vetores, ultrapassando a barreira representada pela membrana peritrófica.

Mortazavi et al. (2010) também pesquisaram a interação entre *Acanthamoeba* spp. e insetos, porém, utilizando gafanhotos como modelo de estudo acerca da patogênese deste protozoário. Os resultados demonstraram alterações degenerativas em vários tecidos, ocorrendo invasão do sistema nervoso central, levando a uma mortalidade de 100% dos gafanhotos estudados ao 11^o dia de infecção. Os protozoários empregados foram

representados por isolados clínicos de *Acanthamoeba* spp., pertencentes aos genótipos T1 e T4, sendo injetados no hemoceloma abdominal dos gafanhotos. Tais microorganismos foram encontrados na hemolinfa durante todo o curso da infecção e apresentaram facilidade em atravessar a barreira hemato-encefálica dos insetos.

Em contraponto à inexistência de outros trabalhos similares que relacionem insetos e AVL, é possível encontrar vasta literatura sobre o isolamento e caracterização de *Acanthamoeba* spp. em distintos habitats naturais. Cabe ressaltar que o ambiente aquático é compartilhado por larvas de culicídeos e AVL. Ademais, partículas de poeira e de solo também podem conter este grupo de protozoários. A veiculação de partículas sólidas em água pode ocorrer por ação de ventos e de chuvas, constituindo uma possível fonte adicional de contato entre *Acanthamoeba* spp. e *A. aegypti*.

A fim de corroborar os dados de prevalência de *Acanthamoeba* spp., inúmeros pesquisadores de diversos países, reúnem esforços para contribuir na caracterização ambiental deste protozoário. Stockman et al. (2011), entre os anos de 1990 e 1992, coletaram um total de 2.454 amostras de água, em 467 domicílios localizadas em Ohio (Estados Unidos). A detecção de amebas foi realizada em 371 (79%) residências, em uma ou mais amostras de água, com 237 (51%) correspondendo à *Acanthamoeba* spp.

No Brasil, Winck et al. (2011) investigaram a ocorrência da ameba em 136 amostras de água de torneira, em Porto Alegre (RS), constatando que 31 (22,79%) continham AVL. Destes isolados, 13 foram classificados como *Acanthamoeba* spp., de acordo com características fenotípicas e análises

moleculares. De maneira similar, Caumo & Rott (2011) também desenvolveram um estudo na cidade de Porto Alegre, analisando 65 amostras de água de piscina. Os resultados demonstraram a presença de AVL em 13 destas (20%), sendo que todas foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*.

Com igual importância, diversos estudos revelam a presença desta AVL em poeira, proveniente de distintas fontes. Carlesso et al. (2010) pesquisaram a presença de *Acanthamoeba* spp. em 135 amostras de poeira e/ou biofilme, oriundos de ambiente hospitalar, em Porto Alegre (RS). Destas, 47 (35%) foram positivas para AVL, com 31 (23%) correspondendo ao gênero de interesse. O mesmo percentual foi encontrado por Chan et al. (2011), na Malásia, ao investigar a presença de *Acanthamoeba* spp. em 87 amostras de poeira proveniente de ar-condicionado. A positividade foi observada em 20 amostras (23%).

De acordo com o exposto, verifica-se que a ocorrência de *Acanthamoeba* spp. em amostras de água e de poeira é amplamente citada na literatura científica. De modo a contribuir com os dados já existentes, o presente estudo agrega subsídios relevantes para a caracterização desta AVL, uma vez que sua presença em amostras ambientais de culicídeos era desconhecida.

O elevado percentual de positividade para *Acanthamoeba* spp. em populações de *A. aegypti*, encontrado neste estudo, reflete a intensa exposição natural entre culicídeos e o protozoário de interesse. O compartilhamento dos mesmos habitats certamente exerceu influência adaptativa significativa para

estes organismos, estabelecendo-se relações harmônicas que, provavelmente, favorecem a sobrevivência e o desenvolvimento de *A. aegypti*.

Em estudos de laboratório, Saucedo et al. (2010) (dados não publicados) encontraram associação positiva entre fêmeas do culicídeo (linhagem Rockefeller) alimentadas com *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30872) e número médio de ovos. O grupo alimentado (n=10) realizou a ovipostura de 3.345 ovos/mês, enquanto o grupo controle (n=10), isento de alimentação com amebas, ovipôs 2.544 ovos/mês. Tais resultados sugerem que esta AVL pode fornecer um importante aporte alimentar para *A. aegypti* no ambiente, contribuindo para sua reprodução.

Ademais, as dimensões de cistos (10 a 25 μm) e trofozoítos (15 a 50 μm) de *Acanthamoeba* spp. são compatíveis com o tamanho de partículas alimentares classificadas como ultrafinas, cujas medidas variam de 0,5 a 50 μm . Estas partículas são as principais fontes nutricionais para formas larvais de mosquitos, uma vez que são facilmente ingeridas através do processo de filtração (Forattini, 2002). Sendo assim, os imaturos não encontrariam nenhuma barreira física para utilizar *Acanthamoeba* spp. como alimento.

Estudos mais abrangentes demonstram que os culicídeos exercem intensa atividade predatória sobre protozoários. Östman et al. (2008) evidenciaram que zonas tratadas com *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) (Goldberg & Margalit, 1977), utilizado para garantir a mortalidade de populações larvais de mosquitos, proporcionaram um aumento médio de 4,5 vezes na densidade de protozoários heterotróficos. Além disso, a riqueza taxonômica de tais protozoários apresentou aumento médio de 60% quando

comparado com áreas não-tratadas com Bti. Desta forma, a interação entre estes organismos ganha maior destaque, uma vez que diversos protozoários também podem constituir-se em relevantes fontes alimentares para culicídeos.

4.4.3 Sequenciamento parcial do gene 18S rDNA

O sequenciamento de 26 amostras deste estudo resultou na obtenção de fragmentos com 326 a 440 pares de base. O alinhamento das sequências com o banco de dados nucleotídicos do NCBI (GenBank), através do programa BLAST, evidenciou que os isolados apresentam identidade igual ou superior a 95% com pelo menos uma cepa de referência utilizada por Stothard et al. (1998), permitindo sua classificação em grupos genotípicos (Tabela 6). As sequências nucleotídicas foram depositadas no GenBank sob os números de acesso JQ418494 – JQ418519, podendo ser visualizadas no Apêndice 1.

Tabela 6. Percentual de identidade entre os isolados de *Acanthamoeba* e cepas de referência para estabelecimento de grupos genotípicos.

Isolado	Grupo genotípico*	Acesso ao GenBank	Percentual de identidade
AC1	T4	U07403.1 AF019056.1	97%
CAM1	T3	S81337.1 AF019053.1	99%
CAV1	T3	S81337.1 AF019053.1	99%
CB1	T3	AF019053.1	98%
CR1	T3	AF019053.1 S81337.1	99%
EC2	T3	AF019053.1	99%
EE1	T4	U07407.1	99%
EE2	T4	U07407.1	99%
EE3	T4	U07407.1 U07403.1	98%
EE4	T4	U07407.1	99%
EE6	T4	U07407.1	99%
EE8	T4	U07407.1	99%
FL1	T5	U94730.1; U94732.1 U94733.1; U94731.1 U94735.1; U94737.1	99%
FL2	T4	U07413.1; U07406.1 U07403.1 AF019061.1	99%
FL3	T4	AF019060.1 AF019061.1	98%
FL4	T5	U94733.1; U94735.1 U94737.1; U94736.1 U94740.1; U94734.1	97%

Tabela 6 (continuação). Percentual de identidade entre os isolados de *Acanthamoeba* e cepas de referência para estabelecimento de grupos genotípicos.

Isolado	Grupo genotípico*	Acesso ao GenBank	Percentual de identidade
FL5	T3	AF019053.1 S81337.1	99%
OF1	T3	AF019053.1 S81337.1	98%
OF2	T4	AF019056.1 U07403.1	95%
ROB1	T4	U07413.1 AF019057.1	97%
ROB2	T4	U07413.1	96%
ROB3	T4	U07405.1; U07402.1 U07415.1; U07414.1 AF019057.1	98%
RON1	T3	S81337.1	99%
RON2	T4	U07407.1; U07403.1	99%
RON4	T3	S81337.1	99%
ST1	T3	S81337.1 AF019053.1	97%

* De acordo com Stothard et al. (1998).

Foram identificados três grupos genotípicos distintos, T4, T3 e T5, correspondendo a 14 (53,8%), 10 (38,5%) e 2 (7,7%) isolados, respectivamente. Os resultados obtidos estão em concordância com diversos estudos que relatam estes genótipos, porém com isolamento a partir de água e de poeira, duas fontes diretas que garantem o contato de culicídeos com o referido protozoário.

Magliano et al. (2009) isolaram um espécime potencialmente patogênico de *Acanthamoeba* spp. em água de torneira de São Paulo (SP, Brasil), pertencente ao genótipo T4. Já em estudo conduzido em Porto Alegre (RS, Brasil), Caumo et al. (2011), entre 13 isolados *Acanthamoeba* provenientes de água de piscina, verificaram os genótipos T5, T4 e T3, em nove (69,2%), três (23,1%) e um (7,7%) isolado, respectivamente.

Quanto à análise de poeira e biofilmes, Carlesso et al. (2010), em estudo igualmente realizado na cidade de Porto Alegre, porém em ambiente hospitalar, evidenciaram três isolados pertencentes ao genótipo T4 e um isolado do genótipo T3, ambos originários de amostras de poeira. Já o grupo T5 foi encontrado em duas amostras de biofilme.

Além de trabalhos realizados no Brasil, pesquisadores de diversos países contribuem para a caracterização genotípica desta AVL. A análise filogenética de 37 sequências nucleotídicas de *Acanthamoeba* spp., cujos protozoários foram obtidos de rios e estações de tratamento de água, no Japão, mostrou a distribuição dos genótipos T3 (56,8%), T4 (13,5%), T5 (8,1%) e T13 (18,9%) (Edagawa et al., 2009).

Já a análise de diferentes fontes de poeira provenientes do Irã, obtidas a partir de um centro de oftalmologia, de sistemas de ventilação e de plantas, demonstrou a presença dos genótipos T4 (84,6%), T5 (7,6%) e T11 (7,6%), entre 13 isolados (Niyiyati et al., 2009). Tais resultados coincidem com o presente estudo, onde figurou o genótipo T4 como mais prevalente.

É interessante observar que a maior parte das pesquisas demonstra considerável diversidade de genótipos *Acanthamoeba* identificados, variando

com os pontos amostrados e locais investigados. Entretanto, os grupos genotípicos T3, T4 e T5, verificados neste estudo, são frequentemente relacionados a amostras de água e de poeira, independente da origem e condições de isolamento.

De acordo com o exposto, os dados existentes na literatura demonstram que os genótipos encontrados possuem diferentes níveis de distribuição no ambiente, tornando qualquer organismo susceptível em seu habitat, tal como ocorre com *A. aegypti*.

Ao que se refere à identificação dos isolados em nível de espécie, foi possível sugerir a identidade das amostras CB1, EC2, EE1, EE2, EE4, EE6, EE8, FL1, FL4, RON1 e RON4. O restante dos isolados apresentou máxima similaridade com duas ou mais espécies de *Acanthamoeba*, impossibilitando uma maior diferenciação de tais isolados. *A. polyphaga* ATCC 30872 (AP4) foi utilizada como controle da técnica de sequenciamento (Tabela 7).

Tabela 7. Máxima identidade entre os isolados de *Acanthamoeba* e as espécies depositadas no *GenBank*.

Isolado	Espécies sugeridas	Acesso ao GenBank	Máxima identidade
AC1	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	AF534139.1	98%
	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	AF534135.1	
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	AY237735.1	
	<i>Acanthamoeba rhyodes</i>	AF260720.1	
	<i>Acanthamoeba lugdunensis</i>	AF260718.1	
CAM1	<i>Acanthamoeba pearcei</i>	AF019053.1	99%
	<i>Acanthamoeba griffini</i>	GU597017.1; S81337.1	
CAV1	<i>Acanthamoeba pearcei</i>	AF019053.1	99%
	<i>Acanthamoeba griffini</i>	S81337.1; GU553135.1	
CB1	<i>Acanthamoeba griffini</i>	HQ007040.1	99%
CR1	<i>Acanthamoeba pearcei</i>	AF019053.1	99%
	<i>Acanthamoeba griffini</i>	GU553135.1; S81337.1	
EC2	<i>Acanthamoeba pearcei</i>	AF019053.1	99%
EE1	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	GU596994.1 AY026243.1; U07407.1	99%
EE2	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	DQ013363.1; U07407.1	99%
EE3	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	JF437606.1	98%
	<i>Acanthamoeba rhyodes</i>	AF260720.1	
	<i>Acanthamoeba lugdunensis</i>	AF260718.1	
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	AY026243.1 DQ013363.1	
EE4	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	AY026243.1; U07407.1	99%
EE6	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	AY026243.1; U07407.1	99%
EE8	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	AY026243.1; U07407.1	99%
FL1	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	U94741.1; U94740.1 U94738.1; U94737.1	99%
FL2	<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	AF260722.1	99%
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	AF019061.1	
	<i>Acanthamoeba rhyodes</i>	U07406.1	
	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	AF260724.1; U07403.1	
FL3	<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	AF260722.1	98%
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	AF019061.1	
		GU596996.1	

Tabela 7 (continuação). Máxima identidade entre os isolados de *Acanthamoeba* e as espécies depositadas no *GenBank*.

Isolado	Espécies sugeridas	Acesso ao GenBank	Máxima identidade
FL4	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	EF176005.1 GU573877.1	97%
FL5	<i>Acanthamoeba pearcei</i> <i>Acanthamoeba griffini</i>	AF019053.1 GU597017.1; S81337.1	99%
OF1	<i>Acanthamoeba pearcei</i> <i>Acanthamoeba griffini</i>	AF019053.1 GU597017.1; S81337.1	98%
OF2	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Acanthamoeba castellanii</i>	AF019056.1 JF437606.1 EF554328.1	95%
ROB1	<i>Acanthamoeba quina</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Acanthamoeba</i> <i>palestinensis</i>	AY703023.1 AF260725.1 AF260719.1	99%
ROB2	<i>Acanthamoeba quina</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Acanthamoeba</i> <i>palestinensis</i>	AY703023.1 AF260725.1 AF260719.1	97%
ROB3	<i>Acanthamoeba hatchetti</i> <i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	AF260723.1 U07405.1; U07414.1 U07402.1; U07415.1 AF019057.1	98%
RON1	<i>Acanthamoeba griffini</i>	GU597017.1; S81337.1	99%
RON2	<i>Acanthamoeba triangularis</i> <i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Acanthamoeba hatchetti</i> <i>Acanthamoeba rhyodes</i> <i>Acanthamoeba lugdunensis</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	AF316547.2 EF554328.1 AF260723.1 AF260720.1 AF260718.1 U07407.1	99%
RON4	<i>Acanthamoeba griffini</i>	GU597017.1; S81337.1	99%
ST1	<i>Acanthamoeba pearcei</i> <i>Acanthamoeba griffini</i>	AF019053.1 GU597017.1; S81337.1	97%
AP4	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	AY026244.1	100%

4.5 Estimativa da patogenicidade dos isolados de *Acanthamoeba* através de testes fisiológicos

A fim de predizer o potencial de patogenicidade existente entre os isolados de *Acanthamoeba*, selecionou-se 14 cepas para a realização de testes de termotolerância e osmotolerância. Todos os isolados apresentaram crescimento a 37°C e a 0,5 M de manitol, dois (14,3%) demonstraram crescimento a 1,0 M, enquanto nenhum foi capaz de desenvolver-se a 42°C (Tabela 8).

Tabela 8. Avaliação do crescimento dos isolados de *Acanthamoeba* em diferentes condições de temperatura e osmolaridade, através de testes fisiológicos*.

Isolado	Termotolerância		Osmotolerância	
	37°C	42°C	0,5 M	1,0 M
CAM1	+++	-	+++	-
CAV1	+++	-	+++	-
CB1	++	-	+++	-
CR1	+++	-	+++	-
EC1	+++	-	+++	++
FL1	+++	-	+++	-
FL2	++	-	+++	-
FL4	+++	-	+++	-
FL5	+++	-	+++	-
FL6	+++	-	+++	+++
FL7	+++	-	+++	-
FL8	+	-	+++	-
JVN1	+++	-	+++	-
ST1	+++	-	+++	-
AP2 ^a	+++	++	+++	++
AP4 ^b	+++	-	+++	-

* Crescimento: +++, intenso (> 30 trofozoítos/cistos); ++, moderado (20 a 30 trofozoítos/cistos); +, discreto (1 a 19 trofozoítos/cistos); -, negativo.

^a *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461; ^b *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30872

De acordo com os resultados obtidos, 12 (85,7%) isolados foram considerados não patogênicos, e dois (14,3%), correspondentes aos isolados EC1 e FL6, foram considerados com baixo potencial patogênico, uma vez que apresentaram crescimento significativo diante da concentração de 1,0 M de manitol, diferentemente dos demais.

Inúmeros estudos demonstram que o crescimento de *Acanthamoeba* spp. em altas temperaturas e osmolaridades relaciona-se fortemente com a patogenicidade destas AVL. Griffin (1972) obteve resultados que foram importantes para evidenciar este comportamento. Na ocasião, cepas de *Acanthamoeba* spp. patogênicas para camundongos toleraram temperaturas elevadas, enquanto espécies não patogênicas desenvolveram-se até 37°C ou temperaturas inferiores. Os mecanismos precisos pelos quais as cepas patogênicas deste protozoário se adaptam a tais situações extremas, mantendo suas atividades metabólicas, ainda permanecem desconhecidos (Khan, 2003).

A ausência de patogenicidade entre os isolados de *Acanthamoeba* testadas apóia as evidências de que esta AVL desempenha um papel importante para a nutrição de culicídeos aquáticos. Entretanto, as vias que garantem sua sobrevivência, permitindo ao protozoário resistir às defesas imunes de *A. aegypti*, devem ser esclarecidas.

Apesar dos resultados no presente estudo, não se exclui a possibilidade de que a ameba possa exercer algum impacto negativo quando associada a determinados endossimbiontes. Algumas pesquisas sugerem que a presença de bactérias intracelulares pode aumentar a virulência de *Acanthamoeba* spp.

Por exemplo, Fritsche et al. (1998) demonstraram que isolados de *Acanthamoeba* spp. infectados com endossimbiontes têm capacidade estatisticamente maior de produzir efeito citopático em comparação com amebas não infectadas. Portanto, microorganismos carregados por esta AVL devem ser criteriosamente investigados, uma vez que podem interferir no ciclo de vida de culicídeos, provocando danos para este e outros organismos.

5 CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo a evidenciar que populações silvestres de *A. aegypti* albergam *Acanthamoeba* spp., com elevada prevalência em formas larvais. As altas taxas de isolamento desta AVL indicam o frequente contato destes microorganismos com culicídeos aquáticos no ambiente.

A análise fenotípica dos isolados de *Acanthamoeba* spp. demonstrou a ocorrência dos grupos morfológicos II e III, com a confirmação do gênero realizada pelo emprego da técnica de PCR. Esta ferramenta molecular mostrou-se altamente sensível, promovendo a detecção satisfatória de *Acanthamoeba* spp. diante de pequenas concentrações de DNA genômico.

O sequenciamento de parte dos isolados amebianos revelou a presença de três grupos genotípicos, T3, T4 e T5. Estes genótipos são comumente relacionados com amostras de água e de poeira, as quais representam importantes fontes de contato entre culicídeos e AVL em habitats naturais.

Dentre os isolados de *Acanthamoeba* spp. selecionados para a realização de testes fisiológicos, nenhum foi capaz de desenvolver-se em ambas situações de temperatura e concentração osmolar elevadas. Estes resultados indicam a ausência de cepas com elevado potencial patogênico, entre as amebas analisadas. Entretanto, é necessário explorar a

presença intracelular de alguns endossimbiontes deste protozoário, uma vez que podem desencadear prejuízos a culicídeos.

O presente estudo servirá como subsídio para novas pesquisas, como importante perspectiva de investigação acerca da biologia de culicídeos e suas interações no ambiente. O aprofundamento científico da relação estabelecida entre *A. aegypti* e *Acanthamoeba* spp. se faz necessário a fim de melhor esclarecer uma possível influência deste protozoário sobre a nutrição, reprodução e desenvolvimento de mosquitos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.

ALSAM, S. et al. *Escherichia coli* interactions with *Acanthamoeba*: a symbiosis with environmental and clinical implications. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 55, n. 6, p. 689-694, 2006.

AXELSSON-OLSSON, D. et al. Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 987-992, 2005.

BARATA, E. A. M de F. et al. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 3, 2001.

BECKER, N. Influence of climate change on mosquito development and mosquito-borne diseases in Europe. **Parasitology Research**, Berlin, v. 103, n. 1, p. 19-28, 2008.

BEHETS, J. et al. Detection of *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri*: a comparison of flagellation tests, ELISA and PCR. **Water Science & Technology**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 117-122, 2003.

BIAN, G. et al. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 4, 2010.

BOOTON, G. C. et al. Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 51, n. 2, p. 192-200, 2004.

BORDENSTEIN, S. R.; WERREN, J. H. Do *Wolbachia* influence fecundity in *Nasonia vitripennis*? **Heredity**, Edinburgh, v. 84, p. 54-62, 2000.

BOWERS, B. Comparison of pinocytosis and phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. **Experimental Cell Research**, New York, v. 110, n. 2, p. 409-417, 1977.

BOWERS, B.; OLSZEWSKI, T. E. *Acanthamoeba* discriminates internally between digestible and indigestible particles. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 97, n. 2, p. 317-322, 1983.

BROWN, T. J.; CURSONS, R. T. M.; KEYS, E. A. Amoebae from Antarctic soil and water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 44, n. 2, p. 491-493, 1982.

BROWNLIE, J. C.; JOHNSON K. N. Symbiont-mediated protection in insect hosts. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 17, n. 8, p. 348-354, 2009.

BRÜCKNER, D.; GARCIA, L. S. **Diagnostic medical parasitology**. 2. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1993. 700 p.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 228 p.

CARLESSO, A. M. et al. Potentially Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from a Hospital in Brazil. **Current Microbiology**, New York, v. 60, n. 3, p. 185-190, 2010.

CATEAU, E. et al. *Acanthamoeba* sp. promotes the survival and growth of *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 319, n. 1, p. 19-25, 2011.

CAUMO, K.; ROTT, M. B. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. **Acta Tropica**, Bissel, v. 117, n. 3, p. 233-235, 2011.

CHAN, L. L. et al. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. **Acta Tropica**, Bissel, v. 117, n. 1, p. 23-30, 2011.

CHEN, W. J. The life cycle of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae). **Parasitology Today**, Cambridge, v. 15, n. 4, p. 153-156, 1999.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction**. London: Chapman & Hall, v. 1, 1992.

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

CULBERTSON, C. G.; SMITH, J. W.; MINNER, J. R. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. **Science**, Washington, v. 127, n. 3313, p. 1506, 1958.

CULBERTSON, C. G. et al. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. **American Journal of Pathology**, New York, v. 35, n. 1, p. 185-197, 1959.

CULBERTSON, C. G. The pathogenicity of soil amebas. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 25, p. 231-254, 1971.

DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica – Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 156-206, 2001.

DECLERCK, P. et al. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. **Water Research**, Oxford, v. 41, n. 14, p. 3159-3167, 2007.

DOS PASSOS, R. A.; TADEI, W. P. Parasitism of *Ascogregarina taiwanensis* and *Ascogregarina culicis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in larvae of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Manaus, Amazon region, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 97, n. 3, p. 230-236, 2008.

EDAGAWA, A. et al. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. **Parasitology Research**, Berlin, v. 105, n. 4, p. 1109-1117, 2009.

EISENBERG, J. N. S.; WASHBURN, J. O.; SCHREIBER, S. J. Generalist feeding behaviors of *Aedes sierrensis* larvae and their effects on protozoan populations. **Ecology**, v. 81, n. 4, p. 921-935, 2000.

FEE. FUNDAÇÃO DE ECONOMIA E ESTATÍSTICA. **Municípios do Rio Grande do Sul com mais de 100 mil habitantes - Porto Alegre**. Disponível em: <http://www.fee.tche.br/sitefee/pt/content/resumo/pop_estado_mapa2_municipio.php?municipio=Porto+Alegre&id=298>. Acesso em: 11 out. 2011.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**: Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, v. 2, 2002. 864 p.

FRITSCHÉ, T. R.; SOBEK, D.; GAUTOM, R. K. Enhancement of in vitro cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp. following acquisition of bacterial endosymbionts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 166, n. 2, p. 231-236, 1998.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Controle Nacional de Controle da Dengue (PNCD)**. 1. ed. Brasília: FUNASA, 2002. 34 p.

GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, Rio de Janeiro, v. 37, p. 29-36, 1985.

GAIO, A. de O. et al. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). **Parasites & Vectors**, London, v. 4, n. 105, 2011.

GÁLLEGO BERENQUER, J. **Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario**. Barcelona: Edicions Universitat Barcelona, v. 1, 2007. 516 p.

GARCÍA-MUNGUÍA, A. M. et al. Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, n. 24, 2010.

GOLDSCHMIDT, P. et al. Resistance of *Acanthamoeba* to classic DNA extraction methods used for the diagnosis of corneal infections. **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 92, n. 1, p. 112-115, 2008.

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

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.

GUSMÃO, D. S. et al. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 8, p. 919-924, 2007.

GUSMÃO, D. S. et al. Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. **Acta Tropica**, Bissel, v. 115, n. 3, p. 275-281, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.

HALSTEAD, S. B. Dengue Virus–Mosquito Interactions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 53, p. 273-291, 2008.

HEWETT, M. K. et al. Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). **Acta Protozoologica**, Warszawa, v. 42, p. 325-329, 2003.

HOFFMANN, A. A. et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 454-457, 2011.

HORN, M. et al. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 357-367, 1999.

IOVIENO, A. et al. Detection of bacterial endosymbionts in clinical *Acanthamoeba* isolates. **Ophthalmology**, v. 117, n. 3, p. 445-452, 452.e1-3 2010.

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. **Lancet**, London, v. 300, n. 7791, p. 1343-1345, 1972.

JUNOD, C. Technique coprologique nouvelle essentiellement destinee a la concentration des trophozoites d'amebes. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, Paris, v. 65, n. 3, p. 390-398, 1972.

KAWAGUCHI, K. et al. Prevalence of *Helicobacter* and *Acanthamoeba* in natural environment. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 465-471, 2009.

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

KHAN, N. A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 34, n. 6, p. 277-285, 2003.

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

KHAN, N. A. ***Acanthamoeba***: Biology and Pathogenesis. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. 290 p.

KINGSTON, D.; WARHURST, D. C. Isolation of amoebae from the air. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 2, n. 1, p. 27-36, 1969.

KREMER, N. et al. *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 10, 2009.

LASKOWSKI-ARCE, M. A.; ORTH, K. *Acanthamoeba castellanii* promotes the survival of *Vibrio parahaemolyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 23, p. 7183-7188, 2008.

MAGHSOOD, A. H. et al. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 54, n. 8, p. 755-759, 2005.

MAGLIANO, A. C. M. et al. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. **Experimental Parasitology**, New York, v. 123, n. 3, p. 231-235, 2009.

MERRITT, R. W.; DADD, R. H.; WALKER, E. D. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 349-376, 1992.

METROCLIMA. **Monitoramento do Volume de Chuva da Capital**. Disponível em: <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/metroclima/default.php?p_secao=16>. Acesso em: 17 out. 2011.

MONCAYO, A. C. et al. Meconial peritrophic matrix structure, formation, and meconial degeneration in mosquito pupae/pharate adults: histological and ultrastructural aspects. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 42, n. 6, p. 939-944, 2005.

MORALES, M. E. et al. Differential identification of *Ascogregarina* species (Apicomplexa: Lecudinidae) in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by polymerase chain reaction. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 6, p. 1352-1356, 2005.

MORTAZAVI, P. N. et al. *Acanthamoeba* produces disseminated infection in locusts and traverses the locust blood-brain barrier to invade the central nervous system. **BMC Microbiology**, London, v. 10, n.186, 2010.

NAGINGTON, J. et al. Amoebic infections of the eye. **Lancet**, London, v. 304, n. 7896, p. 1537-1540, 1974.

NAYAR, J. K.; SAMARAWICKREMA, W. A.; SAUERMAN, D. M. Photoperiodic control of eggs hatching in the mosquito *Mansonia titillans*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 66, n. 4, p. 831-835, 1973.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 495 p.

NIYYATI, M. et al. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains from dust sources in Iran. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 103, n. 4, p. 425-427, 2009.

NUPRASERT, W. et al. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 12, p. 4636-4640, 2010.

ÖSTMAN, Ö.; LUNDSTRÖM, J. O.; VINNERSTEN, T. Z. P. Effects of mosquito larvae removal with *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) on natural protozoan communities. **Hydrobiologia**, n. 607, n. 1, p. 231-235, 2008.

PAGE, F. C. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. **Journal of Protozoology**, New York, v. 14, n. 4, p. 709-724, 1967.

PAGE, F. C. **A new key to freshwater and soil Gymnamoebae**. Ambleside: Freshwater Biological Association, 1988. 122 p.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control = Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for the Prevention and Control**. Washington: OPS, n. 548, 1995. 110 p.

PAULA, A. R. et al. Susceptibility of adult female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, n. 91, 2011.

PREFEITURA MUNICIPAL DE PORTO ALEGRE. Programa municipal de prevenção à dengue: Resultados do Levantamento de Índice Rápido de *Aedes aegypti* (LIRAA) de janeiro de 2011. **Relatório LIRAA**, 2011.

PUSCHKAREW, B. M. Über die Verbreitung der Süsswasser-protozoen durch die Luft. **Archiv für Protistenkunde**, v. 23, p. 323-362, 1913.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**, Dijon, v. 13, n. 4, p. 557-598, 1977.

REY, L. **Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 731 p.

ROTT, M. B. et al. Susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to *Acanthamoeba polyphaga* (Sarcomastigophora: Acanthamoebidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, n. 1, p. 195-198, 2010.

SAEED, A. et al. *Acanthamoeba castellanii* an environmental host for *Shigella dysenteriae* and *Shigella sonnei*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 191, n. 1, p. 83-88, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

SANDSTRÖM, G.; SAEED, A.; ABD, H. *Acanthamoeba polyphaga* is a possible host for *Vibrio cholerae* in aquatic environments. **Experimental Parasitology**, New York, v. 126, n. 1, p. 65-68, 2010.

SAWYER, T. K. *Acanthamoeba griffini*, a new species of marine amoeba. **Journal of Protozoology**, New York, v. 18, n. 4, p. 650-654, 1971.

SCHEID, P. L.; SCHWARZENBERGER, R. Free-living amoebae as vectors of cryptosporidia. **Parasitology Research**, Berlin, v. 109, n. 2, p. 499-504, 2011.

SCHOLTE, E. J.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Acta Tropica**, Bielefeld, v. 102, n. 3, p. 151-158, 2007.

SCHROEDER, J. M. et al. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 5, p. 1903-1911, 2001.

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

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G.; LIRA, K. S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v. 27, n. 1, p. 53-63, 1998.

SILVA, H. H. G. et al. Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. **Entomologia y Vectores**, Rio de Janeiro, v. 6, p. 383-391, 1999.

SILVA, I. G. et al. Atividade de espécies de culicíneos sinantrópicos em uma cidade brasileira com transmissão de dengue. **Entomologia y Vectores**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 15-24, 2002.

SILVA, M. A.; ROSA, J. A. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 242-246, 2003.

STOCKMAN, L. J. et al. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA—1990–1992. **Parasitology Research**, Berlin, v. 108, n. 3, p. 621-627, 2011.

STOTHARD, D. R. et al. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18s rRNA gene sequence types. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 45, n. 1, p. 45-54, 1998.

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

TABACHNICK, W. J. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease: The yellow fever mosquito. **American Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 14-24, 1991.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos no controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

THOMAS, V. et al. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 10, p. 2728–2745, 2008.

THOMAS, V. et al. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 34, p. 231-259, 2010.

UNIVERSITY OF FLORIDA. Florida Medical Entomology Laboratory. **Aedes aegypti: Adult.** 2008. Disponível em: <http://fmel.ifas.ufl.edu/key/genus/aedes_aeg.shtml>. Acesso em: 26 out. 2011.

VEZZANI, D.; WISNIVESKY, C. Prevalence and seasonality of *Ascogregarina culicis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in natural populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from temperate Argentina. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 91, n. 3, p. 183-187, 2006.

VISVESVARA, G. S. Classification of *Acanthamoeba*. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 13, n. 5, p. 369-372, 1991.

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

VOLKONSKY, M. *Hartmanella castellanii* Douglas, et classification des hartmannelles. **Archives de Zoologie Experimentale et Generale**, Paris, v. 72, p. 317-339, 1931.

WEISS, B.; AKSOY, S. Microbiome influences on insect host vector competence. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 11, p. 514-522, 2011.

WINCK, M. A. T.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. Prevalence of *Acanthamoeba* from Tap Water in Rio Grande do Sul, Brazil. **Current Microbiology**, New York, v. 63, n. 5, p. 464-469, 2011.

ZOUACHE, K. et al. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 377-389, 2011.

APÊNCIDES

APÊNDICE I. Sequências nucleotídicas de *Acanthamoeba* spp., isoladas de populações silvestres de *A. aegypti* (sequenciamento parcial do gene 18S rDNA).

>AC1 (GenBank: JQ418494)

TTCACCGGGGTACGGGCTAAGCCGCCCCGCGCCGGCCAGAAAGACCGACGCCAAGGACGACCGCACCGATGGTGGTGTGTTTTGTA
TTCAACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTT
GATTAATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTTCGAGAAGTTAATCTTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATATTAATG
CCCCAACTATCCCTATTAATCATTACCCTAGTCCTCGCGCTGCCAAAACCAACTGAAAATAGGAGGACAGGGTCCTATTCCACTATC
CCATGCGAATGTATTTTTTCGGCGGAAAATTGGAGTTGTCT

>CAM1 (GenBank: JQ418495)

CCGCGGGCCGGCGAGCAAGCCGTCCCGATGATGCCGCCTTGTGAGCGACACACCAAAGACGACCGCAATGCGCATGGTGGTGTGTTT
TGTATTCAACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGT
TCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTTCGAGAAGTTAATCTTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATATT
AATGCCCCCAACTATCCCTATTAATCATTACCCTGGTCCTCGCGGCAAACCAACTGAAAATAGGAGGACAGGGTCCTATTCCATTATC
CCATGCTAATGTATTTCGGTGGCAGAAAATTGGATCTGCCTGCTTTGAACACTCTAATTATTTTCACGGTAAACAATCTAGCGCCACA

>CAV1 (GenBank: JQ418496)

TCCTCGGGGCCAGGCCGAGCTTAGCCGTCCCGATGATGCCGCCTTGTGAAGCGACACACCAAAGACGACCGCAATGCGCATGGTG
GTGTTTTGTATTCAACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAAC
TTTCGTTCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTTCGAGAAGTTAATCTTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTA
AATATTAATGCCCCCAACTATCCCTATTAATCATTACCCTGGTCCTCGCGGCAAACCAACTGAAAATAGGAGGACAGGGTCCTATTCC
ATTATCCCATGCTAATGTATTTCGGTGGCAGAAAATTGGATCTGCCTGCTTTGAACACTCTAATTTTTTTCACGGTAAACGATCTGGGCC

>CB1 (GenBank: JQ418497)

GGCCATAGCCCGTCCCGATTGATGGCCGCCTTTGGTGAAGCGAACACACCCAAAAGACGACCGCAATGCGCATGGTGGTGTGTTTTGTAT
TCAACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTTG
ATTAATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTTCGCAGAAGTTAATCTTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATTATAATGC
CCCCAACTATCCCAATTAATCATTACCCTGGTCCTCGCGGCAAACCAACAGAAAAAAAAAACGACTGGG

>CR1 (GenBank: JQ418498)

CTAGGGAGTCCTGCGAGCTAGCCGTCCCGATGATGCCGCCTTGTGAGCGACACACCCAAAGACGACCGCAATGCGCATGGTGGTGTGTT
TTGTATTCAACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCG
TTCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTTCGCAGAAGTTAATCTTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATATT
AATGCCCCCAACTATCCCTATTAATCATTACCCTGGTCCTCGCGGCAAACCAACTGAAAATANGCGGACAGGGTCCTATTCCATTATC
CCATGCTAATGTATTAGGTGGCAGAAAACCTGGAGGA

>EC2 (GenBank: JQ418499)

TACAATCGGGAGCCTGCGAGCTAGCCGTCCCGATGATGCCGCCTTGTGAGCGACACACCCAAAGACGACCGCAATGCGCATGGTGGT
GTTTTGTATTCAACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTT
TCGTTCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTTCGCAGAAGTTAATCTTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTA
TATTAATGCCCCCAACTATCCCTATTAATCATCACCCCTGGTCCTCTCGGCAAACAACCTGA

>EE1 (GenBank: JQ418500)

TATCGCTGTCACAGCAGGCAGATCCATTTTCTGCCACCGAAAACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCA
GTTGGTTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTG
GATTTATGAAAGATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA
GATACCGTTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGTGCGGTGCTCC
TTGGCGTCGGTTTCGGCCGGCGCGGGGGCGGCTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCCTAGCAGCTTTGTGAGA

>EE2 (GenBank: JQ418501)

CTAGGGGGCACGGGCTAGCCGCCCGCGCCGGCCGAACCGACGCCAAGGACGACCGCACCGATGGTGGTGTGTTTTGTATTCAACGT
CTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTTGATTAATG
AAAACATCCTTGGCAGATGCTTTCGCAGAAGTTAATCTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATATTAATGCCCCCAAC
TATCCCTATTAATCATTACCCTAGTCCTCGCGCTGCCAAAACCAACTGAAAATAGGAGGACAGGGTCCTATTCCATTATCCCATGCTAA
TGTATTCGGTGGCAGAAAATTGGATCTGCCTGCTTTGAACACTCTAATTTTTTTCACGGTAAACAGATCTGGGCCAAA

>EE3 (GenBank: JQ418502)

GTTTCGGGGCCCGGGGCTAGCCGCCCGCGCCGGCCCGAAACCGACGCCAAGGACGACCGCACCGATGGTGGTGTGTTTTGTATTC
AACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTTGAT
TAATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTCGCAGAAGTTAATCTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATATTAATGCC
CCAACATCCCTATTAATCATTACCCTAGTCCTCGCGCTGCCAAAACCAACTGAAAATAGGAGGACAGGGTCCTATTCCATTATCCCAT
GCTAATGTATTCGGTGGCAGAAAATTGGATCTGCCTGCTTTGAACACTCTAATTTTTTTCACGGGAAACGAACCGGGGCCAAAAA

>EE4 (GenBank: JQ418503)

TTACGGGGCACGGGGCTAGCCGCCCGCGCCGGCCCGAAACCGACGCCAAGGACGACCGCACCGATGGTGGTGTGTTTTGTATTC
AACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTTGAT
TAATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTCGCAGAAGTTAATCTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATATTAATGCC
CCAACATCCCTATTAATCATTACCCTAGTCCTCGCGCTGCCAAAACCAACTGAAAATAGGAGGACAGGGTCCTATTCCATTATCCCAT
GCTAATGTATTCGGTGGCAGAAAATTGGATCTGCCTGCTTTGAACACTCTAATTTTTTTCACGGTAAACGATTCTGGGCCA

>EE6 (GenBank: JQ418504)

TCATGGGCACGGGCTTAGCCGCCCGCGCCGGCCGAACCGACGCCAAGGACGACCGCACCGATGGTGGTGTGTTTTGTATTCAACGT
CTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTTGATTAATG
AAAACATCCTTGGCAGATGCTTTCGCAGAAGTTAATCTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATATTAATGCCCCCAAC
TATCCCTATTAATCATTACCCTAGTCCTCGCGCTGCCAAAACCAACTGAAAATAGGAGGACAGGGTCCTATTCCATTATCCCATGCTAA
TGTATTCGGTGGCAGAAAATTGGATCTGCCTGCTTTGAACACTCTAATTTTTTTCACGGTAAACGATCTGGGCC

>EE8 (GenBank: JQ418505)

AATTTGGGTGTCCGTGGCTAGCCGCCCGCGCCGGCCGAAACCGACGCCAAGGACGACCCGCACCGATGGTGGTGTGTTTGTATTCAA
CGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTTGATTA
ATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTCGCAGAAGTTAATCTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATTAATGCCCCC
AACTATCCCTATTAATCATTACCCTAGTCCTCGCGCTGCCAAAACCAACTGAAAATAGGAGGACAGGGTCCTATTCCATTATCCCATGC
TAATGTATTCCGGTGGCACAAAATTGGATCTGCCTGCTTTGAACACTCTAATTTTTTTCACGGTAAACGATCTGGGG

>FL1 (GenBank: JQ418506)

TTCACTTTACCCGAAAGGATTACAGCGGTGTTTTGTATTCAACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACG
GTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGCAAACGCTTTCGCAGAAGTTAATCTTTCATAA
ATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATTAATGCCCCCAACTATCCCTATTAATCATTACCCTGATATAACCTCGCTGTAAACAAA
ACCAACTGAAAATAGGAGGTCAGGGTCCTATTCCATTATCCCATGCTAATGTATTCCGGTGGCAGGAAAAATATCTGCCCGCTTTGAAC
ACTCTAATTTTTTTCACGGTAAACGATCTGGGCCCCAAAATTGGGA

>FL2 (GenBank: JQ418507)

AGACCAAACCGCCAAGGACAACCGCGCCGATGGTGGTGTGTTTTGTATTCAACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAA
GACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTCGCAGAAGTTA
ATCTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATTAATGCCCCCAACTATCCCTATTAATCATTACCCTAGTCCTCGCGCT
GCCAAAACCAACTGAAAATAGGAGGACAGGGTCCTATTCCATTATCCCATGCTAATGTATTCCGGTGGCAGAAAATTGGATCTGCCTGC
TTTGAACACTCTAATTTTTTTCACGGTAAACATTCTGGGCCAAAATG

>FL3 (GenBank: JQ418508)

TAAGAGTCAGCAGGCAATCCATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGG
TTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTA
TGAAAGATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACC
GTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGCGCGGTTCGTCCTTGGCG
TTGTCCGCTTACGGCTGGCGGCGGAGGGCGGTTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCCTAGCAGCTTTGTGAGA

>FL4 (GenBank: JQ418509)

TCAAACATTACCCCGAAGGATTAACAGCGGTGTTTTGTATTCAACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTAC
GACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGCAAACGCTTTCGCAGAAGTTAATCTTT
CATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATATTAATGCCCCCAACTATCCCTATTAATCATTACCCTGATATAACCTCGCTGTAA
ACAAAACCAACTGAAAATACGACGTCAGGGTCTATTCCATTATCCCAGGCTAATGTAATCGGAGGCCGAAAACCTCCCGCCCGCG

>FL5 (GenBank: JQ418510)

TGCCGAGCTTAGCCGTCCCGATGATGCCGCCTTGTGAGCGACACACCAAAGACGACCGCAATGCGCATGGTGGTGTGTTTTGTATTCAA
CGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTTGATTA
ATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTCGCAGAAGTTAATCTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATATTAATGCCCC
AACTATCCCTATTAATCATTACCCTGGTCTCGCGGCAAACCAACTGAAAATAGGAGGAAGGGTC

>OF1 (GenBank: JQ418511)

TTAATGCCGAGCTTAGCCGTCCCGATGATGCCGCCTTGTGAGCGACACACCAAAGACGACCGCAATGCGCATGGTGGTGTGTTTTGTAT
TCAACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTTG
ATTAATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTCGCAGAAGTTAATCTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATATTAATGC
CCCCAACTATCCCTATTAATCATTACCCTGGTCTCGCGGCAAAAAAACTAAAAAAAATGAGGGA

>OF2 (GenBank: JQ418512)

TCCGAGGTGCACCGGGGCTCAGCCCGCCCCGCGCCCGGCCCCCGAAAGACCGACGCCAAGGACGACCGCGCCGATGGTGGTGTGTT
TTGTATTCAACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCG
TTCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTCGCAGAAGTTAATCTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTAATATT
AATGCCCCCAACTATCCCTATTAATAACTAAACCCGAGCCCGCGCGGCCAAAAGAAACAGTAAAAACAA

>ROB1 (GenBank: JQ418513)

CAGTTCAGCATGCAGATCCATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTT
TTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTAT
GAAAGATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCG
TCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGTGCGGTGTCCTTGGCGT
CTCGGTCCTTACGGGGCCGGGGCGGGGGTGGCTTAGGCCGGTGGCACCGGAGAATGACTCCCCTTTGAGATAATGAGA

>ROB2 (GenBank: JQ418514)

TGGGGGTCAGCAGCAGATCCATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGG
TTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTA
TGAAAGATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACC
GTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGTGCGGTGTCCTTGGCG
TCTCGGTCCTTACGGGGCCGGGGGGCGGGGGAGGCTGATGCCGGCGGCACCGGAGACCGCCTCCCCATGAGATAGTGAGA

>ROB3 (GenBank: JQ418515)

TAGTCCATTCAGCATGCAGATCCATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTT
GGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGAT
TTATGAAAGATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA
CCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGTGCGGTGTCCTTGG
CGTCTCGGTTTCTGCCGGGGCGCGGGGGCGGGTTAGGCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCCTACCAGCTTGTGATAATGAGA

>RON1 (GenBank: JQ418516)

TTTGCCAGGTCCAGCATGCAGATCCATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCA
GTTGGTTTTGCCGCGAGGACCAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATT
TATGAAAGATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA
CCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATGCGCATTGCGGTGTCCTT
GGTGTGTCGCTCACAAGGCGGCATCATCGGGACGGCTTAGCTCGCATGGCACCGGTGAATGACTCCCCTAGCAGCTTGGTGAGGA

>RON2 (GenBank: JQ418517)

TTTACGTCAGCAGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGG
 TTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTA
 TGAAAGATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACC
 GTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGTGCGGTTCGTCTTGGCG
 TCGGTTTCGGCCGGCGCGGGGGCGGCTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCCTAGCAGCTTGTGAGA

>RON4 (GenBank: JQ418518)

GTATTGGGGGTCAGCAGCAGATCCATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAG
 TTGGTTTGCCGCGAGGACCAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTT
 ATGAAAGATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATAC
 CGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATGCGCATTGCGGTTCGTCTTTG
 GTGTGTCGCTCACAAGGCGGCATCATCGGGACGGCTTAGCTCGCATGGCACCGGTGAATGACTCCCCTAGCAGCTTGTGAGA

>ST1 (GenBank: JQ418519)

TCACTCGGAGCAAGGCCGAGCTTAGCCGTCCCGATGATGCCGCCTTGTGAGCGACACACCAAAGACGACCGCAATGCGCATGGTGG
 TGTTTTGTATTCAACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACT
 TTCGTTCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGCAGATGCTTTCGCAGAAGTTAATCTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTA
 ATATACTGCCCCATCTATCCCTTTAATCATTTCCTGGCCTTCGATGCAAACCTTCTAAAATATACTGCGTTCA

>AP4 (*Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30872)

TTACGTAGGGTCAACATTATCGCGCAAGGAGTAACAGCGGTGTTTTGTATTCAACGTCTCCTAATCGCTGGTCGGCATCGTTTATGGT
 TAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTCGTTCTTGATTAATGAACGCTTGGCGTTGCAATTGCGTGGCTGTG
 GTTTAAGATTTTCCCTTCATTGGT

ANEXOS

ANEXO I. Preparo de soluções e procedimentos relacionados.

Solução salina de Page

Preparo:

Componentes	Quantidades
Cloreto de sódio (NaCl)	120 mg
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ . 7 H ₂ O)	4 mg
Hidrogenofosfato dissódico anidro (Na ₂ HPO ₄)	142 mg
Diidrogenofosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	136 mg
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ . H ₂ O)*	4 mg
Água destilada	1000 mL

* Último componente a ser dissolvido no preparo da solução.

Após a dissolução de todos os componentes, o pH foi ajustado em $6,2 \pm 0,2$, com posterior esterilização em autoclave (121 °C/ 15 minutos).

Ágar não-nutriente (ANN)

Preparo:

Componentes	Quantidades
Solução salina de Page (1X)	100 mL
Ágar bacteriológico	1,5 g

A dissolução completa do ágar bacteriológico em solução salina de Page foi realizada mediante aquecimento em microondas, seguido de esterilização em autoclave (121 °C/ 15 minutos).

Fixador SAF**Preparo (Junod, 1972):**

Componentes	Volumes
Acetato de sódio (C ₂ H ₃ O ₂ Na. 3H ₂ O)	1,5 g
Ácido acético glacial (C ₂ H ₄ O ₂)	2,0 mL
Formaldeído 37-40% (HCHO)	4,0 mL
Água destilada	92,5 mL

Coloração de tricrômico**Preparo do corante (Brückner & Garcia, 1993):**

Componentes	Valores
Cromotrope 2R	0,6 g
“Light Green” SF	0,3 g
Ácido fosfotúngstico	0,7 g
Ácido acético glacial P.A.	1,0 mL
Água destilada	100 mL

Etapas para coloração:

As lâminas foram expostas aos seguintes reativos, com tempos cronometrados:

- Álcool 70% durante 5 minutos;
- Álcool 70% iodado durante 1 minuto;
- Álcool 70% 70% durante 5 minutos;
- Corante tricrômico durante 13 minutos;
- Álcool 90% acidificado por 1 a 3 segundos;
- Álcool 100% por tempo suficiente para limpar a lâmina;
- Álcool 100% (duas cubas) durante 3 minutos cada;
- Xileno durante 10 minutos.