

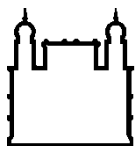
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Medicina Tropical

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE
PRESENTES NO MICROBIOMA INTESTINAL DE PRIMATAS NÃO
HUMANOS**

IGOR RODRIGUES CARDOSO

Rio de Janeiro
Fevereiro/2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Igor Rodrigues Cardoso

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE
PRESENTES NO MICROBIOMA INTESTINAL DE PRIMATAS NÃO HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

Orientador (es): Prof. Dra. Helena Lúcia Carneiro Santos
Prof. Dra. Helena Keiko Toma

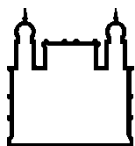
RIO DE JANEIRO
Fevereiro/2021

Cardoso, Igor.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE
PRESENTES NO MICROBIOMA INTESTINAL DE PRIMATAS NÃO
HUMANOS / Igor Cardoso. - Rio de Janeiro, 2021.

XV, 94f f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Medicina Tropical, 2021.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: Igor Rodrigues Cardoso

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE
PRESENTES NO MICROBIOMA INTESTINAL DE PRIMATAS NÃO HUMANOS**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Helena Lúcia Carneiro Santos
Prof. Dra. Helena Keiko Toma**

Aprovada em: 22 /02/ 2021

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Martha Cecilia Suárez Mutis – Presidente/Revisora - Instituto Oswaldo Cruz/

FIOCRUZ Prof. Dr. Tatiana Kugelmeier – Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Jose Mauro Peralta – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (UFRJ)

Prof. Dr. Alda Maria da Cruz - Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ - Suplente interno

Prof. Dr. Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior - Universidade Federal Fluminense – Suplente externo

Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2021

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais e avós, ao meu irmão,
sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Helena Lúcia Carneiro Santos e Helena Keiko Toma, pela compreensão, dedicação, auxílio e companheirismo, pelas broncas e conversas, que serviram de base para meu crescimento profissional e pessoal.

À Dra Helena Lúcia Carneiro Santos, pelas “noites de microscopia” em que as amebas se tornavam “estrelas”. Por toda sua dedicação e paciência.

À Dra Claudia Mansini d’Avila Levy pela oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório integrado de estudos em Protozoologia (LEIP).

A Deus e a espiritualidade, que foram meus pilares nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Paulo Roberto Pires Cardoso e Mary Rodrigues Cardoso, pela vida, pelo apoio emocional, financeiro e logístico, os quais possibilitaram toda a minha jornada acadêmica. Ao meu irmão Gabriel Rodrigues Cardoso, pelo carinho, apoio emocional e pelas caronas. E aos meus avôs Antero Gomes Cardoso e Etelvina de Jesus, pelo carinho, descontração e diversão.

À minha madrinha Cláudia Cristina Cardoso e a todos os meus tios e primos, por toda a minha formação ética e moral, frutos do convívio familiar.

À minha segunda mãe Camila, por todo apoio emocional e espiritual.

Aos meus amigos: Alexandre Santos, Emanuely Oliveira, João Pires, pela companhia, alegria e momentos de descontração.

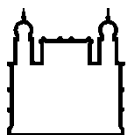
Aos amigos e companheiros de trabalho: Amanda Caetano, Andréia, Carol Boucinha, Clezia Siqueira, Júlia Castro e Rhagner Bonono pela “coorientação” e convívio. A Sheila Medeiros e pelas caronas e conselhos, ao Vitor Vidal pelas orientações e Dra Karina Mastropasqua Rebello, por todo apoio profissional e ajuda na elaboração desta dissertação.

À Dra Martha e a toda equipe da pós-graduação pela oportunidade, e apoio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2021

“Às vezes é necessário perder o chão para descobrir que é possível voar”



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

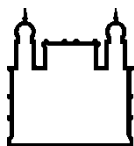
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE NO MICROBIOMA INTESTINAL DE PRIMATAS NÃO HUMANOS

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Igor Rodrigues Cardoso

Amebas de vida livre (AVLs) são protozoários cosmopolitas amplamente encontrados em ambientes de água doce, naturais e artificiais, no solo e em poeira. Notoriamente, algumas espécies dos gêneros *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia* spp., *Sappinia* spp. e *Naegleria* spp., são potencialmente patogênicas para o ser humano e para outros animais e são consideradas carreadoras de microrganismos por meio de relações transitórias ou simbióticas. A presença de AVLs no microbioma intestinal tem sido aventada, mas pouco explorada. Assim, este estudo teve como objetivo realizar a caracterização morfológica e molecular de AVLs isoladas do microbioma intestinal de primatas não humanos (PNHs). Para tanto, amostras de fezes de PNHs foram diluídas, filtradas e semeadas em meio ágar-não nutriente. As análises morfológicas foram realizadas por observação direta no microscópico invertido e pelas técnicas de coloração Giemsa, Panótico® e Tricrômico. Para a identificação molecular dos isolados foi empregada a reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido da reação de sequenciamento para o alvo molecular 18S rDNA, mitocondrial SSU-rDNA, COI e ITS. Foram coletadas 96 amostras de PNHs do serviço de Criação de Primatas não Humanos (SCPrim) do Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos (ICTB, Fiocruz) e cinco amostras de *Callithrix* spp. de vida livre, da Estação Biológica FIOCRUZ Mata Atlântica. Das 101 amostras de fezes analisadas, 46 foram positivas para AVLs na cultura. As análises morfológicas revelaram que 17 amostras apresentaram majoritariamente cistos com formatos poligonais e/ou trofozoítos com projeções, do tipo acantopódios, representando uma sinapomorfia do gênero *Acanthamoeba*. As demais amostras, apresentaram cistos arredondados e/ou trofozoítos com pseudópodos tipo lobópodes, três amostras apresentaram a forma flagelar, sugestiva do gênero *Naegleria*. As técnicas de coloração, Giemsa e Panótico® foram eficientes para evidenciar as estruturas citoplasmáticas das formas trofozoítos e cistos. Todavia, a coloração por Panótico® destacou-se por ser simples, rápida e evidenciou os acantopódios, não observados por meio da coloração de Giemsa. Das 46 amostras positivas, 28 foram amplificadas pela PCR para o alvo 18S do rDNA específico para o gênero *Acanthamoeba* spp e 33 amostras foram amplificadas quando utilizamos os NA1 e NA2 (amplifica *Vermamoeba* spp. e *Vanella* spp.). O sequenciamento de DNA revelou a presença de *Acanthamoeba*, genótipo T4 em quatro amostras e, em uma amostra identificamos *Vermamoeba vermiformis*. Todavia, não obtivemos êxito no sequenciamento das demais amostras em virtude da presença de picos duplos e da obtenção de sequências curtas. Os resultados obtidos mostram-nos notavelmente um velho inimigo apresentando novos desafios. A presença de AVLs no intestino de PNHs precisa ser investigada, com potencial relevância para estudos futuros sobre a homeostase intestinal, imunologia da mucosa e potencial patogênico das AVLs e seus organismos intracelulares, podendo ser considerado um campo emergente de suma importância para a saúde pública.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FREE-LIVING AMOEBAS PRESENT IN THE GUT MICROBIOME OF NON HUMAN PRIMATES

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINE

Igor Rodrigues Cardoso

Free-living amoebae (FLA) are cosmopolitan protozoa widely found in freshwater, natural and artificial environments, in soil and in dust. Notoriously, some species of the genera *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia* spp., *Sappinia* spp. and *Naegleria* spp., are potentially pathogenic for humans and other animals and are considered carriers of microorganisms through transient or symbiotic relationships. The presence of FLA in the intestinal microbiome has been suggested, but little explored. Thus, this study aimed to perform the morphological and molecular characterization of FLAs isolated from the intestinal microbiome of non-human primates (PNHs). For that, stool samples from PNHs were diluted, filtered and seeded on non-nutrient agar medium. Morphological analyzes were performed by direct observation in the inverted microscope and by Giemsa, Panotic® and Trichrome staining techniques. For the molecular identification of the isolates, the polymerase chain reaction (PCR) was used, followed by the sequencing reaction for the molecular target 18S rDNA, mitochondrial SSU-rDNA, COI and ITS. 96 samples of PNHs were collected from the Non-Human Primate breeding service (SCPrim) of the Institute of Biomodel Science and Technology (ICTB, FioCruz) and five samples of free-living *Callithrix* spp., from the FIOCRUZ Mata Atlântica Biological Station. Of the 101 stool samples analyzed, 46 were positive in the culture. The morphological analyzes revealed that 17 samples presented mainly cysts with polygonal and / or trophozoite shapes with projections, of the acantopodia type, representing a synapomorphy of the genus *Acanthamoeba* spp. The remaining samples presented rounded and / or trophozoite cysts with lobopod-type pseudopodia, three samples presented the flagellar shape, suggestive of the *Naegleria* spp. genus. The staining techniques, Panotic® staining show us to be simple, fast and efficient. Of the 46 positive samples, 28 were amplified by PCR for the 18S rDNA target specific to the genus *Acanthamoeba* spp. and 33 samples were amplified when using NA1 and NA2 (amplifies *Vermamoeba* spp. and *Vanella* spp). DNA sequencing revealed the presence of *Acanthamoeba* spp., T4 genotype in four samples and, in one sample, we identified *Vermamoeba vermiformis*. However, we were not successful in sequencing the other samples due to the presence of double peaks and short sequences. The results obtained show us remarkably an old enemy presenting new challenges. The presence of FLAs in the PNH intestine needs to be investigated, with potential relevance for future studies on intestinal homeostasis, mucosal immunology and pathogenic potential of FLAs and their intracellular organisms, which can be considered an emerging field of paramount importance for public health.

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

1-INTRODUÇÃO	1
1.1 Breve Histórico.....	4
1.2 Taxonomia das amebas de vida livre (AVLs).....	5
1.3 Epidemiologia das infecções causadas por AVLs.....	6
1.4 Características morfológicas das principais AVLs de importância médica...9	
1.5 Quadros clínicos e tratamento de infecções causadas por AVLs.....21	
1.5.1 Encefalite amebiana granulomatosa (EAG) causada por <i>Acanthamoeba</i> spp.....21	
1.5.2 Ceratite Amebiana causada por <i>Acanthamoeba</i> spp.....22	
1.5.3 Encefalite amebiana granulomatosa ou encefalite amebiana causada por <i>Balamuthia mandrillaris</i> (EAG).....23	
1.5.4 Lesões cutâneas ocasionadas por <i>Balamuthia mandrillaris</i>24	
1.5.5 Meningoencefalite amebiana primária (MAP) causada por <i>Naegleria fowleri</i>25	
1.5.6 Encefalite causada por <i>Sappinea diploidea</i>26	
1.6 Diagnóstico de infecções causadas por AVLs.....	27
1.7 Infecções por AVLs em animais e uso de primatas não humanos (PNHs)..28	
2- JUSTIFICATIVA.....	32
3- HIPÓTESE.....	34
4- OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo geral.....	35
4.2 Objetivos específicos.....	35
5- MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 Amostragem.....	36
5.2 Preparo das amostras.....	36
5.3 Cultivo das amostras.....	37
5.4 Repiques e manutenção das células.....	39
5.4.1 Axenização por meio de filtração.....	39
5.4.2 Axenização após incubação com HCl.....	39
5.4.3 Axenização após a adição de antifúngicos.....	40
5.5 Caracterização morfológica dos isolados obtidos.....	40

5.5.1	Fixação das amostras.....	40
5.5.2	Padronização das técnicas de coloração.....	41
5.6	Caracterização molecular e análise filogenética dos isolados.....	42
5.6.1	Extração de DNA.....	42
5.6.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	42
5.6.3	Detecção do produto amplificado.....	44
5.6.4	Purificação do produto amplificado e sequenciamento de DNA.....	44
6-	RESULTADOS	45
6.1	Técnica de coloração de Giemsa.....	52
6.1.2	Coloração pela técnica de Panótico®.....	57
6.1.3	Coloração pela técnica de Tricômio de Masson.....	61
6.2	Caracterização molecular dos isolados.....	62
7-	DISCUSSÃO	66
8-	CONCLUSÕES	76
9-	PERSPECTIVAS	77
10-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
11-	ANEXOS E APÊNDICES	92

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Árvore filogenética dos Eucariotos, de acordo com a nova classificação em supergrupos.....	5
FIGURA 2: Representação esquemática da taxonomia dos principais gêneros de Amebas de Vida livre.....	6
FIGURA 3: Casos de Map reportados no mundo até 2017.....	9
FIGURA 4: Formas evolutivas do gênero <i>Acanthamoeba</i> spp.....	10
FIGURA 5: Ilustração das diferentes morfologias de um cisto de <i>Acanthamoeba</i> sp.....	11
FIGURA 6: Formas evolutivas de <i>B. mandrillaris</i>	13
FIGURA 7: Microscopia eletrônica de varredura de um trofozoíta de <i>N. fowleri</i> exibindo depressões corpóreas (indicadas por setas.....	13
FIGURA 8: Microscopia de contraste interferencial de fase, exibindo as formas evolutivas de <i>N. fowleri</i>	14
FIGURA 9: Morfologia do gênero <i>Leptomyxa</i>	16
FIGURA 10: Microscopia de contraste diferencial de fase de <i>S. diploidea</i> mostrando suas formas evolutivas	17
FIGURA 11: Trofozoítas (a e b) e cistos (c) de <i>Vahlkampfia</i> spp.....	17
FIGURA 12: Microscopia de contraste interferencial de fase mostrando a diversidade de espécies de <i>Vannella</i> spp.....	19
FIGURA 13: Microscopia de campo claro evidenciando um cisto de <i>Vannella</i> spp.....	20
FIGURA 14: Trofozoítas de <i>Vermamoeba vermiformis</i>	20
FIGURA 15: Cisto de <i>Vermamoeba vermiformis</i>	21
FIGURA 16: Lesão cerebral (a) e pulmonar (b) em um paciente com EAG.....	22
FIGURA 17: Fotografias comparando um olho saudável com olhos com diferentes manifestações clínicas de ceratite amebiana.....	23
FIGURA 18: Cérebro com lesões características de EAG causadas por <i>B. mandrillaris</i>	24
FIGURA 19: Lesões cutâneas causadas por <i>B. mandrillaris</i> e cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina evidenciando trofozoítas na lesão.....	24
FIGURA 20: Mecanismo de invasão de <i>N. fowleri</i>	26
FIGURA 21: Imagem de <i>M. mulatta</i>	30
FIGURA 22: Imagem de <i>M. fascicularis</i>	30
FIGURA 23: Fotografia de <i>Saimiri</i> sp.....	31
FIGURA 24: Fotografia de <i>Callithrix</i> sp.....	32
FIGURA 25: Cultivo em placa de petri contendo ágar-PAGE.....	38
FIGURA 26: Fluxograma de trabalho mostrando as etapas do isolamento e identificação de AVLS.....	38
FIGURA 27: Microscopia óptica evidenciando a diversidade de AVLS presentes no trato gastrointestinal de PNHS.....	46
FIGURA 28: Fotomicrografias ópticas mostrando as formas trofozoítas em processo de divisão celular.....	47
FIGURA 29: Microscopia óptica direta, em foco formação e contração do vacúolo contrátil, de uma AVL.....	48
FIGURA 30: Microscopia óptica de campo claro mostrando o processo inicial de exflagelação de um trofozoíta de <i>Naegleria</i> spp. (amostra AM41)	49

FIGURA 31: Diferentes formas trofozoítas de AVLs, isoladas de fezes de PNHs, evidenciadas em microscopia de contraste de fase.....	50
FIGURA 32: Microscopia óptica, (DIC) evidenciando amebas com formato arbóreo, fagocitando cistos de outras amebas, indicados pelas setas.....	51
FIGURA 33: Formas císticas encontradas nas amostras de fezes de PNHs evidenciados por DIC.....	52
FIGURA 34: Formas flageladas coradas pelo Giemsa.....	53
FIGURA 35: Trofozoítas com morfologia sugestiva do gênero <i>Vannella</i> spp.....	54
FIGURA 36: Microscopia óptica mostrando trofozoítos do gênero <i>Naegleria</i> , em diferentes estágios de exflagelação, corados pelo Giemsa.....	55
FIGURA 37: Trofozoítos de AVLs corados pelo Giemsa.....	56
FIGURA 38: Cistos de AVLs corados pelo Giemsa.....	56
FIGURA 39: Microfotografia de trofozoíto corado pela técnica de panóptico.....	57
FIGURA 40: Trofozoítos com morfologia sugestiva do gênero <i>Acanthamoeba</i> , corados pelo Panótico.....	58
FIGURA 41: Formas flutuantes e trofozoítos em forma de leque com morfologia sugestiva de <i>Vannella</i> spp., corados por panótico.....	59
FIGURA 42: Diferentes morfologias das AVLs encontradas nas amostras de fezes de PNHs.....	59
FIGURA 43: Formas císticas e flageladas de AVLs, encontradas nas amostras de fezes de PNHs, coradas pelo panótico.....	60
FIGURA 44: Principais formas morfológicas de trofozoítos de AVLs isolados das fezes de PNHs, coradas por Tricrômio.....	61
FIGURA 45: Cistos e flagelados corados pelo Tricrômio de Masson.....	62
FIGURA 46: Gel de agarose a 1,5%, representando os resultados positivos para <i>Acanthamoeba</i> spp.....	62
FIGURA 47: Gel de agarose a 1,5%, produto amplificado empregando o par de iniciadores (NA1/ NA2). <i>Vannella</i> sp/ <i>Vermamoeba</i> sp.....	63

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Relação de microrganismos encontrados no interior de amebas de vida livre	3
Tabela 2: Relação de genótipos de <i>Acanthamoeba</i> spp. que são associados a quadros patogênicos	11
Tabela 3: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo.....	43
Quadro 1: Correlação entre as formas de AVLs encontradas, tipo de amostra, espécie de PNHs hospedeira e resultados da PCR.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AVLs** - amebas de vida livre
- AJs**- junções aderentes
- BLAST** - *Basic local alignment search tool* (Ferramenta de busca por alinhamento local básico)
- BSA** - soro de albumina bovino
- CaCl₂** - cloreto de cálcio
- CECAL** - Centro de Criação de Animais de Laboratório
- CEUA** - Comitê de Ética em Pesquisa animal
- cm**- centímetros
- COLPROT** – coleção de protozoários da FIOCRUZ
- °C** – graus Celsius
- cols** – colaboradores
- DAPI** - 4',6 – diamidino 2- fenil-indol
- DIC** - Contraste interferencial diferencial (*Differential Interference Contrast*) ()
- DMSO** - Dimetil sulfóxido (*Dimethyl sulfoxide*) -
- DNA** - ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- DNAr** - ácido desoxirribonucleico ribossomal
- dNTPs** - desoxirribonucleotídeos trifosfato
- DSMs**- desmossomos
- EDTA** - Ácido etileno diamino tetracético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- EAG** - Encefalite amebiana granulomatosa
- g**- força gravitacional (força g)
- g**- grama
- h**- hora
- HCl** - ácido clorídrico
- HE**- Hematoxilina e Eosina
- H₂O MilliQ** - água deionizada
- IB** – Inferência Bayesiana
- ICTB** - Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos
- IJs**- junções intercelulares
- KCl** - cloreto de potássio
- Kb**- kilobase

LIT- *Liver Infusion Tryptose* (Infusão de Fígado e Tryptose)
LCR- Líquido cefalorraquidiano
M- Molar
MAP- Meningoencefalite amebiana primária
MDS- sequenciamento metagenômico
MEV- Microscopia eletrônica de varredura
MgCl₂ – cloreto de magnésio
MgSO₄ – sulfato de magnésio
mg- miligrama
min- minutos
mm- milímetros
mM- milimolar
ML - Máxima verossimilhança
mL-mililitro
NaCl - cloreto de sódio
NaHCO₃ - bicarbonato de sódio
NaHPO₄ - fosfato de sódio dibásico
ng- nanograma
pb- pares de base
PBS - Tampão fosfato salina
PCR - *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
pH - potencial de hidrogênio
PNHs- Primatas não humanos
PYG - Meio proteose-peptona
rDNA - DNA ribossomal
SCPrim - Serviço de Criação de Primatas não Humanos
SFB- Soro fetal bovino
seg- segundos
TBE- Tampão (tris, ácido bórico e EDTA)
TJs- junções estreitas
µg- micrograma
µL- microlitro
µm- micrômetro

INTRODUÇÃO

O microbioma intestinal é um universo complexo, onde habita uma diversa gama de organismos, tais como: bactérias, fungos, vírus e protozoários (1). Esse bioma alberga complexas interações, por meio da díade (microrganismo-hospedeiro ou microrganismo-microrganismo) ou tríade (microrganismo-microrganismo-hospedeiro) que podem resultar em relações simbióticas, parasitárias ou comensais. Estas relações são extremamente dinâmicas e variam conforme o *status* imunológico, a oferta nutricional, variações hormonais e estresse do hospedeiro.

Alguns protozoários desempenham tanto o papel de comensais como de parasitos do trato gastrointestinal em mamíferos, entre os mais citados são: *Giardia sp.*, *Entamoeba coli*, *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. hartmanni*, *E. moshkovskii*, *Endolimax nana*, *Cryptosporidium spp.*, *Balantidium coli* (2,3). Entretanto, uma grande parte do microbioma intestinal ainda precisa ser descoberta. Nos últimos anos, há relatos sobre a presença de amebas de vida livre (AVLs) na luz intestinal de humanos e animais (4-6) e diversas espécies de microrganismos identificados por meio de abordagem metagenômica do material fecal (7).

As AVLs são protozoários pertencentes ao supergrupo Amoebozoa subclasse Lobosa (8-10). Este grupo tem como característica a emissão de pseudópodes para a aquisição de alimento e para sua locomoção. Apresentam uma distribuição cosmopolita, sendo encontrados principalmente em fontes de água doce (rios, riachos, lagos), no solo e na poeira (11-16). As AVLs têm sido isoladas em ambientes hospitalares, tanto em coleções de água quanto de poeira (17). São organismos unicelulares que desempenham um importante papel no controle de microrganismos, como bactérias, fungos e protozoários por meio da fagocitose. Assim, são considerados "predadores" em diversos ecossistemas (18). As AVLs normalmente não causam doenças, entretanto, alguns gêneros e espécies são capazes de causar graves doenças, tanto em animais, quanto em seres humanos (12).

Os gêneros e espécies descritas até o momento como organismos anfitriônicos (microorganismos adaptados tanto à vida livre, quanto ao parasitismo), são eles: *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris*, *Harttmanella spp.*, *Naegleria fowleri* e *Sappinea spp.* (11, 19-27). Este grupo de AVLs pode causar ceratites, encefalites e meningoencefalite amebiana (11, 12, 19-27). As meningites são agravos raros ou

subnotificados, porém fatais na maioria dos casos, devido ao diagnóstico tardio e/ou ineficaz e tratamento inespecífico. A maioria dos estudos descritos na literatura é decorrente de relatos de casos (28). A inclusão dos gêneros *Vannella* e *Sappinea*, como organismos anfitriões, é um dado recente, e há relato de caso de ceratite causada por endossimbiontes presentes em *Vannella* spp. (29). Nesse estudo, as AVLs funcionam como carreadoras de microrganismos patogênicos, o que ressalta a importância do estudo deste gênero, uma vez que *Vannella* spp. já foi isolada de biofilmes em um hospital no Iran (30). Além disso, também foi descrito um quadro de meningoencefalite em um indivíduo imunocompetente causada por *Sappinea diploidea* (31). Apesar de alguns gêneros terem sido isolados de pacientes que apresentaram quadros severos de meningite ou ceratite, ainda pouco se sabe sobre o papel de outros gêneros de AVLs em cenários infecciosos.

Algumas espécies de AVLs possuem potencial patogênico e desempenham um importante papel ecológico, pois são veiculadoras e carreadoras de microrganismos (vírus, bactérias, protozoários e fungos), que muitas vezes são patogênicos. Estes microrganismos são capazes de sobreviver e proliferar no interior de trofozoítos e de cistos de AVLs. Dentre estes, alguns são agentes infecciosos transmitidos por alimentos e pela água, e são responsáveis por quadros de diarreia e meningite (32). Em indivíduos imunossuprimidos causam comumente septicemia e encefalite. Segundo estudos, bactérias como: *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae* se mantiveram viáveis no interior do trofozoíto de *Acanthamoeba* sp., após a fagocitose (32). Outros microrganismos de interesse para saúde humana que permanecem viáveis no interior de *Acanthamoeba* são: adenovírus, *coxsackievirus B3*, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii*, *Fusarium solani*, *Cryptococcus neoformans* (32). Desta forma, alguns gêneros de AVLs, mesmo que não apresentem potencial patogênico, podem funcionar como reservatórios de microrganismos em ambientes hospitalares. Na tabela 1 estão listados os principais microrganismos patogênicos ou não, capazes de interagir com AVLs (32).

Tabela 1: Relação de microrganismos encontrados no interior de amebas de vida livre

Microrganismos	AVLs hospedeiras
Bactérias	
<i>Legionella</i> -like, <i>Legionella lytica</i> (<i>Sarcobium lyticum</i>)	<i>Acanthamoeba</i> spp.; <i>Naegleria</i> spp.; <i>Hartmannella</i> spp. *
<i>Legionella pneumophila</i>	Diversas AVLs, dentre elas <i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Afipia felis</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Echinamoeba</i> spp.; <i>Acanthamoeba</i> spp.; <i>Hartmannella</i> spp.
<i>Ralstonia</i> (<i>Burkholderia</i>) <i>picketti</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> - Komplex	<i>Acanthamoeba</i> spp.; <i>Naegleria</i> spp.
<i>Rickettsia</i> - like	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Simkania nevegensis</i>	Diversos gêneros
<i>Neochlamydia hartmannellae</i>	<i>Hartmannella</i> spp. *
Candidatus <i>Mesochlamydia elodeae</i>	<i>Hartmannella vermiformis</i> *
<i>Ehrlichia</i> sp.	<i>Vannella</i> spp.; <i>Saccamoeba</i> spp.
Candidatus <i>Paracaedibacter symbiosus</i>	<i>Saccamoeba</i> spp.
<i>Procabacter acanthamoebae</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Amoebophilus asiaticus</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Salmonella enterica</i> , <i>S. thyphimurium</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Mycobacterium</i> spp., <i>M. leprae</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Staphylococcus aureus</i> (incluindo MRSA)	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>A. castellanii</i> , <i>Hartmannella vermiformis</i> *
<i>Acidovorax temperans</i>	<i>Naegleria</i> spp.
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Caulobacter vibrioides</i>	<i>Echinamoeba</i> spp.
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	<i>Naegleria</i> spp.
<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.

<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
Protozoários e Fungos	
<i>Paramicrosporidium</i> gen. Nov	<i>Vannella</i> spp.
<i>Cochlonema euryblastum</i>	<i>Thecamoeba</i> spp.; <i>T. quadrilineata</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
Vírus	
Adenoviridae	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Acanthamoeba polyphaga Mimivirus</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Pandoravirus inopinatum</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Pithovirus</i> spp.	<i>Acanthamoeba</i> spp.
Adenoviridae	<i>Acanthamoeba</i> spp.
Vírus Coxackie	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Marseillevirus</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Megavirus chilensis</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Pandoravirus salinus, P. dulcis</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Pithovirus sibericum</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Faustovirus</i> spp.	<i>Vermamoeba vermiformis</i>
<i>Mollivirus sibericum</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.

**Hartmannella* reclassificada como *Vermamoeba* spp.

1.1 Breve Histórico

Em 1913 foi descrito o primeiro isolamento de ameba de vida livre (AVL), *Amoeba polyphagus*, a partir de uma amostra de poeira, pelo pesquisador Puschkarew (33). Posteriormente, em 1930, o pesquisador Castellani observou a presença de *Vermamoeba castellani* na cultura de *Cryptococcus pararoseus* (34). Um ano após esta pesquisa, Volkonsky descreveu o gênero *Acanthamoeba* (33, 35, 36). Somente em 1959, o potencial patogênico das AVLS foi sugerido por Culbertson e colaboradores. Os autores observaram que o cultivo de células renais de primatas não humanos contaminados com AVLS, apresentava danificações na monocamada de células (37). Após a inoculação pelas vias intravenosa e intranasal em cobaias, quadros de pneumonia e meningite fatais foram observados, tanto em camundongos quanto em primatas não humanos (PNHs). A partir da década de 1960, surgiu o primeiro relato de meningite letal em humanos, causada por *N. fowleri* na Austrália (38). Por sua vez, em 1972, foi reportada a descrição de abscessos cerebrais, causados por *Acanthamoeba*, em humanos (39), e em 1974, o relato de infecção da córnea humana por *Acanthamoeba* sp. (20). Posteriormente, em 1986, *B. mandrillaris*

foi isolada de um quadro de meningite em um babuíno nos Estados Unidos (40, 41).
 Todavia, somente em 1993, esta espécie foi descrita (42). Por sua vez, em 2003,
Sappinia diploidea foi isolada em amostras de um paciente com encefalite (43).

1.2 Taxonomia de Amebas de Vida Livre

De acordo com as classificações taxonômicas mais atuais, os eucariotos foram separados em supergrupos (Figura 1): Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata e Excavata.

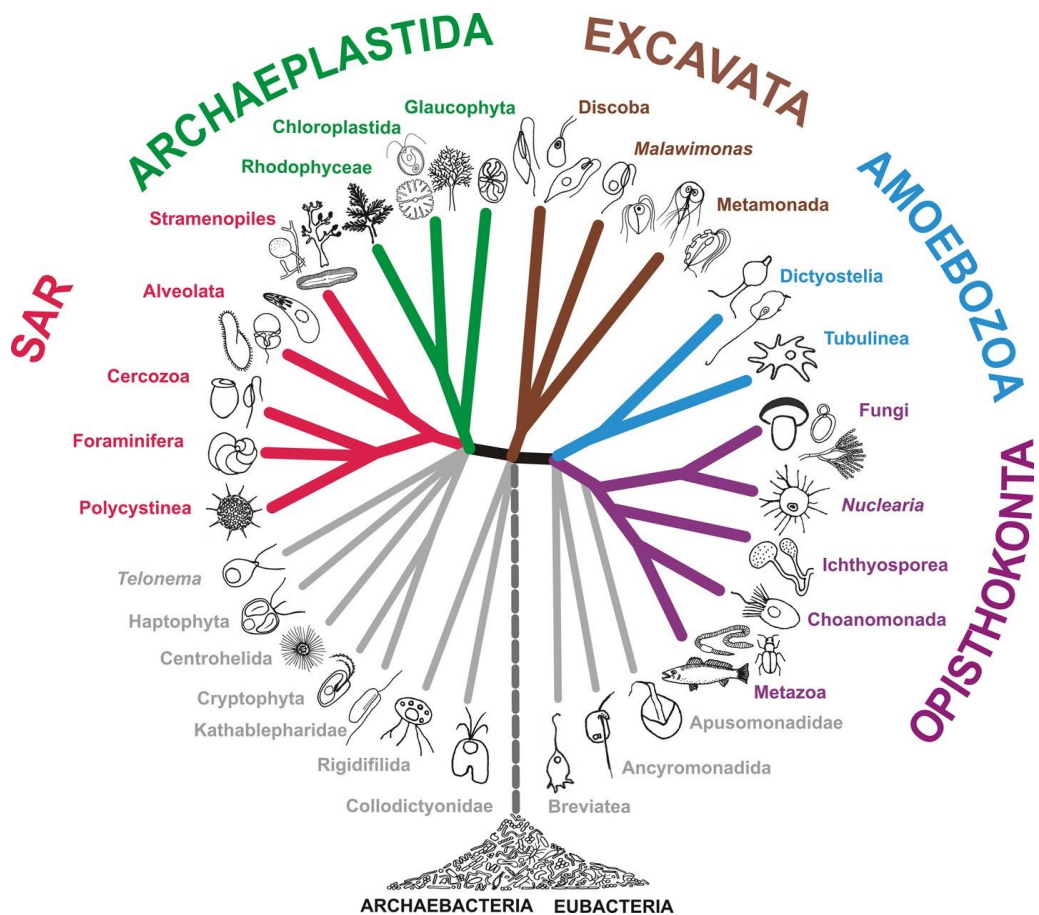


Figura 1: Árvore filogenética dos eucariotos, de acordo com a nova classificação em supergrupos. Fonte: (44).

Seguindo o novo sistema de classificação, as AVLs foram classificadas da seguinte forma: Os gêneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia* e *Vannella* estão agrupados no supergrupo Amoebozoa, classe Lobosea (subdivisão: Acanthamoebidae e

Discosea) e *Sappinia* (subdivisão: Thecamoebidae), enquanto *N. fowleri* foi alocada no grupo Excavata (Heterolobosia: subdivisão Vahlkampfiidae (10, 35, 36, 45-47). A figura 2 representa a árvore filogenética das AVLs de importância médica, de acordo com a antiga classificação.

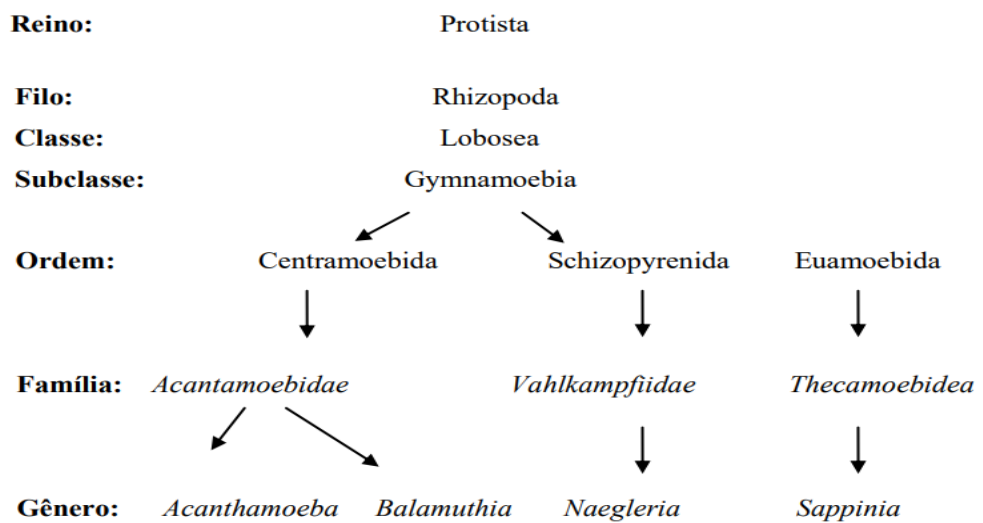


Figura 2: Representação esquemática da taxonomia dos principais gêneros de amebas de vida livre. Fonte: (48).

1.3- Epidemiologia das infecções causadas por AVLs

As infecções por AVLs estão dentro do grupo das doenças negligenciadas. As encefalites amebianas são consideradas eventos raros associados à baixa sensibilidade dos métodos de diagnóstico, o que favorece à subnotificação. Além disso, por ser referida como um evento raro, os médicos raramente suspeitam de infecção por AVLs (12, 17). Notoriamente, a maioria dos diagnósticos é realizado pós-morte. Assim é possível inferir que muitos casos possam ser subnotificados devido a baixa sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico e da ampla distribuição das AVLs no ambiente (12).

Embora mais da metade dos casos reportados tenha ocorrido nos Estados Unidos da América (EUA), têm sido notificadas infecções em países de todos os continentes. Foram descritos casos de ceratite e encefalites por AVLs (*Acanthamoeba* spp., *N. fowleri* e *B. mandrillaris*) na África Ocidental, Austrália, Bélgica, Coréia, Estados Unidos, Japão, Índia, Inglaterra, Irlanda, Nova Guiné, Nova Zelândia, Panamá, Peru, Venezuela (48).

As doenças causadas por AVLs representam um problema de saúde pois culminam com uma alta taxa de mortalidade, em parte por conta do diagnóstico e tratamento tardios e ineficazes (49). Nos últimos anos, o número de casos de ceratite por *Acanthamoeba* spp. têm aumentado em diversos países e existe uma correlação com o aumento do número de usuários de lentes de contato. O número estimado de ceratite amebiana é de 1,36 casos por milhão (de usuários de lentes de contato) nos Estados Unidos, e de 17 a 21 casos por milhão na Inglaterra (49, 50), o maior número de infecções na Inglaterra pode estar relacionado aos maus hábitos de limpeza ou talvez o tipo de lente de contato usado neste país, favoreça a infecção (50).

O gênero *Acanthamoeba* é responsável por aproximadamente 20% dos casos de ceratite infecciosa em usuários de lente de contato. Nos EUA, na Índia e no Reino Unido, até o ano de 2007 foram registrados mais de 5000 casos (46, 50-52). Por sua vez, meningoencefalite amebiana primária (MAP), causada por *N. fowleri* tem uma distribuição menor, com mais que 300 casos notificados no mundo (49). Nos Estados Unidos até o ano de 2007, 121 pessoas morreram de MAP (53, 54).

O gráfico abaixo representa os casos de MAP reportados no mundo, até 2017 (Figura 3).

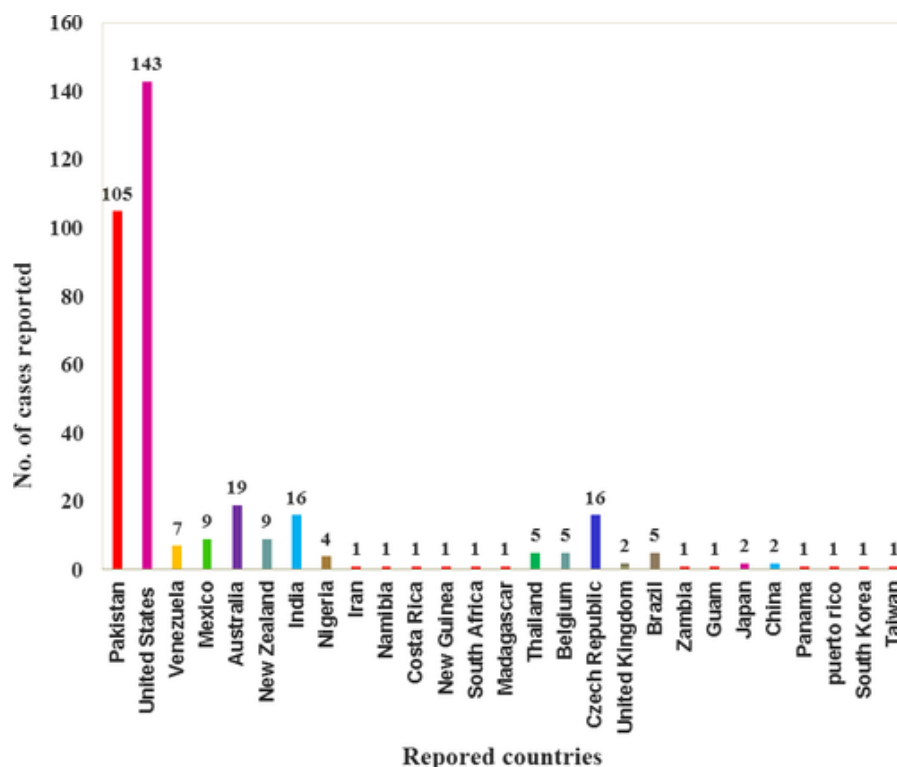


Figura 3: Casos de meningoencefalite amebiana primária, reportados no mundo até 2017. Fonte: (72).

Globalmente, até o ano de 2008, *B. mandrillaris* foi responsável por 200 casos de meningoencefalite (40, 55, 56). No Japão, nove casos de infecções por *Balamuthia* foram registrados, sendo quatro no período entre 1986 e 1995 e, cinco casos no período de 2006 a 2014 (56). Um dos casos reportados foi de um indivíduo imunocompetente, o que não é comum em infecções causadas por *Balamuthia* (57).

No Brasil, poucos relatos de casos têm sido descritos devido em parte a dificuldade na identificação das AVLs (48). O guia de vigilância em saúde aborda procedimentos detalhados sobre meningite por vírus e bactérias, os outros agentes etiológicos estão alocados no tópico de “Meningite por outras etiologias” (58). Ainda, *N. fowleri*, *Acanthamoeba* spp. e *B. mandrillaris*, não são citadas neste guia (59), desta forma são necessárias maiores estudos e publicações sobre as AVLs. No Brasil, os primeiros casos de ceratite por *Acanthamoeba* spp. foram descritos em 1988 por Alvarenga e colaboradores (60). Em São Paulo, foi realizado um estudo, que demonstrou o aumento de casos de ceratite amebiana ao longo de 20 anos, totalizando 581 casos de ceratite, sendo que 185 casos foram causados por *Acanthamoeba* spp. (61).

Em 1978, foi relatado por Salles-Gomes, um caso de MAP no Brasil que ocorreu em São Paulo, em uma jovem de 14 anos, que se banhava em uma lagoa nas redondezas (62). Posteriormente, no ano de 1992, uma mulher de 47 anos, alcoólatra, faleceu por Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) causada por *Acanthamoeba* (63). No ano de 2007, Silva-Vergara e colaboradores relataram um caso de EAG fatal, causado por *B. mandrillaris* em um homem de 32 anos, com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (64).

Apesar dos raros relatos de casos clínicos, no Brasil, as AVLs são amplamente isoladas em amostras ambientais. Os gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* foram isolados em diversas fontes de água no Rio de Janeiro (68). A escassez de relatos de caso está provavelmente associada com a falta de estudos e a subnotificação.

Em 1982, Salazar e cols. analisaram 10 marcas de água mineral do Estado do Rio de Janeiro. Os autores detectaram os gêneros, *Vahlkampfia* spp., *Mayorella* spp., *Filamoeba* spp., *Glaeseria* spp., *Amoeba* spp., *Platyamoeba* spp. e *Vermamoeba* spp., sendo que *Acanthamoeba* spp. foi encontrado em 60% das amostras (68).

A presença de *Acanthamoeba*, foi reportada em amostras de poeira, de um hospital de Porto Alegre (17). Outra pesquisa realizada em dois hospitais de São Paulo constatou a prevalência de 45,5% do gênero *Acanthamoeba* spp. e 3,8% *Naegleria* spp., sendo encontradas AVLs em mais de 40% de amostras de poeira e água (69). Em 2011, Magliano mostrou que a maioria dos isolados de *Acanthamoeba* obtidos em diferentes regiões do Brasil apresentavam perfil patogênico (70). Alves e cols. (2012), realizaram um estudo com amostras de águas de piscinas em Brasília e constataram a presença do gênero *Acanthamoeba* (71).

AVLs foram isoladas de torres de resfriamento e em aparelhos de ar condicionado de diversos locais da região metropolitana de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul. Das 36 amostras analisadas, 92% foram positivas para AVLs e o gênero predominante foi *Acanthamoeba*; também foram encontradas amebas dos gêneros *Naegleria* e *Vermamoeba* (47).

1.4- Características morfológicas das principais AVLs de importância médico/veterinária

Em geral, as AVLs possuem um ciclo de vida simples, dividido em dois estágios: a forma vegetativa - o trofozoíto e a cística que é a forma de resistência às adversidades ambientais, exceto o gênero *Naegleria* que possui três formas evolutivas: trofozoíto, biflagelada e cística.

O gênero *Acanthamoeba* é o mais isolado entre as AVLs tanto em amostras ambientais, quanto em materiais clínicos (12,14, 73, 74). A morfologia desse gênero apresenta características bem peculiares, com duas formas evolutivas: o trofozoíto é a forma vegetativa, que se alimenta e se multiplica por fissão binária simples e o cisto que é forma de resistência (17, 74). O trofozoíto possui um núcleo grande e cariossoma central, um grande vacúolo contrátil, que realiza a regulação osmótica da célula, entre outros vacúolos digestivos (35, 36). São relativamente pequenos em relação a outras espécies de AVLs, possuem um tamanho que varia de 20 a 40 μm (14). O trofozoíto desloca-se por meio de projeções citoplasmáticas, conhecidas como lobópodes e apresenta uma característica marcante, a emissão de finas e delgadas projeções citoplasmáticas, conhecidas como acantopódios. Acredita-se que os acantopódios são utilizados para aderência em células hospedeiras ou em substrato no ambiente (78).

A forma cística possui duas paredes: endocisto e ectocisto, além de apresentar poros e um opérculo, por onde a forma vegetativa emerge (74). O endocisto possui na maioria das vezes, formatos poligonais, geralmente triangular ou estrelado, já o ectocisto é arredondado (17) (Figura 4). O tamanho do cisto varia entre 13 e 20 μm (14; 35, 36).

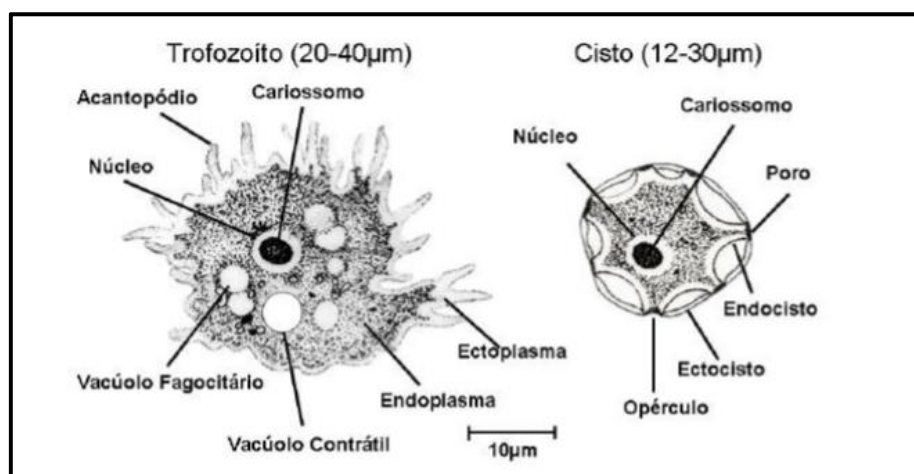


Figura 4: Formas evolutivas do gênero *Acanthamoeba* sp. Fonte: (75)

De acordo com o formato e tamanho dos cistos, *Acanthamoeba* foi agrupada em três grupos (Figura 5). O grupo I é formado por cistos com tamanho maior ($\geq 18 \mu\text{m}$) e possui espécies que nunca foram isoladas de infecções humanas (ex.: *Acanthamoeba tubiashi*). Por sua vez, o grupo II possui endocisto estrelado, ectocisto enrugado e tamanho médio ($< 18 \mu\text{m}$). O grupo III apresenta endocisto arredondado e ectocisto fino e tamanho menor ($< 18 \mu\text{m}$) (76).



Figura 5: Ilustração das diferentes morfologias de um cisto de *Acanthamoeba sp*
Fonte: (76).

De acordo com o fragmento de DNA que codifica a subunidade menor do ribossomo (18S rDNA), o gênero *Acanthameba* é dividido em 20 genótipos, T1 a T20. Por tratar-se de uma região conservada, a região do 18S é mais utilizada para identificação do gênero (77). Dentre os genótipos, o T4 (principalmente, *Acanthamoeba polyphaga* e *Acanthamoeba castellani*) é o mais identificado de quadros clínicos humanos (Tabela 2) (78, 79, 80).

Tabela 2: Relação de genótipos de *Acanthamoeba spp.* que são associados a quadros patogênicos.

Genótipos	Doenças associadas
T1	Encefalite
T2	Ceratite e encefalite
T3	Ceratite
T4	Ceratite e encefalite
T5	ND*
T6	Ceratite

T7	ND*
T8	ND*
T9	ND*
T10	Ceratite e encefalite
T11	Ceratite
T12	Encefalite
T13	ND*
T14	ND*
T15	Ceratite
T16 -T20	ND*

* ND – não descrito (Fonte: 22).

Balamuthia mandrillaris é responsável por quadros de infecções cutâneas graves e por Encefalite Amebiana Granulomatosa, em seres humanos e em outros animais (41). Foi isolada pela primeira vez, em uma necropsia cerebral de um babuíno mandril, que deu origem ao nome da espécie "*mandrillaris*". O primata da espécie *Papio sphinx* (atualmente *Mandrillus sphinx*) faleceu após um quadro de encefalite, causada por *B. mandrillaris* em um zoológico nos Estados Unidos (40, 41).

Geralmente acomete principalmente o homem e outros animais imunocomprometidos, mas segundo Siddiki e Khan, pode gerar um quadro de meningoencefalite amebiana em indivíduos imunocompetentes com um percentual de letalidade maior que 98% (41). *B. mandrillaris* apresenta as formas evolutivas, trofozoíto e cisto (Figura 6). O trofozoíto apresenta um único núcleo que pode apresentar até dois nucléolos, em alguns casos é possível encontrar dois núcleos em uma única célula. O citoplasma é denso, com muitas mitocôndrias, ribossomos e outras organelas (41). O trofozoíto mede de 30 a 120 µm, é altamente polimórfico, podendo até mesmo ser arredondado e, comumente apresenta-se como "linha estendida" (17, 28, 81). O cisto é arredondado e mede de 10 a 30 µm, sendo formado por três camadas (endocisto, mesocisto e ectocisto), sendo que a camada mais externa é irregular de acordo com a microscopia eletrônica de varredura (17, 28, 41, 81).



Figura 6: Formas evolutivas de *Balamuthia mandrillaris*. **(a)** forma trofozoíto; **(b)** forma cística. Fonte: (46).

Naegleria fowleri é uma AVL termófila, isto é, apresenta tropismo por ambientes quentes. É comumente encontrada em lagos e fontes termais ou piscinas aquecidas, assim como em afluentes que recebem rejeitos industriais e locais com abundante matéria orgânica. Essa espécie de AVL pode tolerar temperaturas de até 46°C. Filogeneticamente, é alocada na linhagem Heterolobosea e dentro do supergrupo Excavata (82). Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que a *N. fowleri* apresenta depressões (Figura 7) na parte parabasal da célula, o que justifica a sua alocação neste supergrupo.

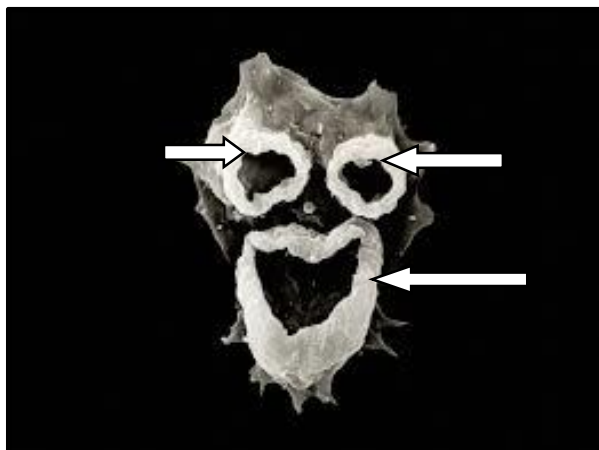


Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura de um trofozoíto de *Naegleria fowleri* exibindo depressões corpóreas (indicadas pelas setas). Fonte: National Geographic: image by D.T. John & T.B. Cole, visuals unlimited.

Naegleria fowleri é responsável pela meningoencefalite amebiana primária (MAP), doença fatal em mais de 95% dos casos. O primeiro caso de MAP foi reportado em 1965 na Austrália (38). Morfologicamente, apresenta três formas distintas, o trofozoíto, o cisto e uma forma flagelada (Figura 8).

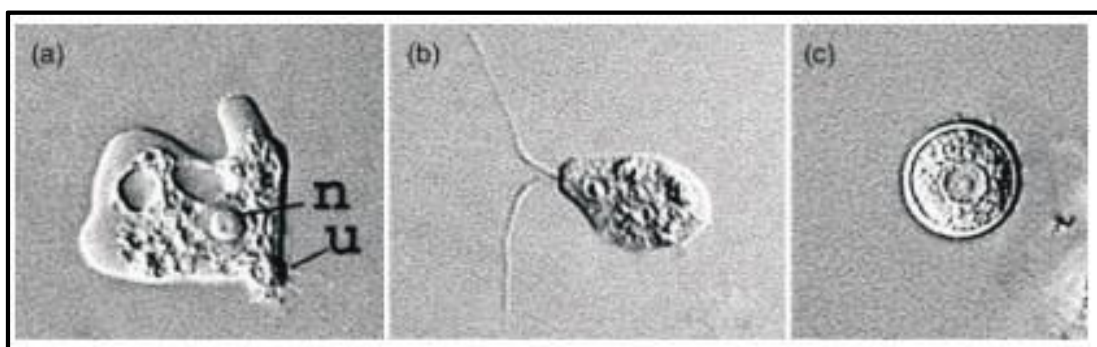


Figura 8: Microscopia de contraste interferencial de fase, exibindo as formas evolutivas de *Naegleria fowleri*. **(a)** trofozoíto; **(b)** flagelado; **(c)** cisto. n: Núcleo. u:Uróide. Fonte:(107).

O trofozoíto apresenta um ou dois lobópodes, pseudópodes mais grosseiros, robustos, que promovem uma locomoção unidirecional. É uninucleado e seu tamanho varia de 15 a 30 μm (17). Por sua vez, a forma cística é arredondada, lisa e uninucleada apresentando-se com um tamanho um pouco menor, aproximadamente 17 μm (17).

A forma flagelada é elíptica e biflagelada. É uma fase transitória, responsável pela dispersão do microrganismo, uma vez que possui alta mobilidade. Os trofozoítos em contato com água destilada sofrem um processo de exflagelação, dando origem à forma flagelada (17).

Outras Amebas de vida livre encontradas reportadas na literatura

- Ordem Leptomyxidae, Gênero *Leptomyxa*

Os organismos amebóides pertencentes à ordem dos Leptomyxida têm sido isolados de uma variedade de ambientes, água doce e salgada (83-86), solos temperados (86, 87), solos acima do permafrost (solos congelados) (86,88) e solos de desertos (86, 89).

A ordem Leptomyxida contemplam trofozoítos de médio à grande porte, podendo atingir um comprimento de 3 mm em alguns casos e estão entre as maiores amebas (86, 90). Este grupo exibe uma variedade de características morfológicas, não apenas entre espécies, mas entre os indivíduos da mesma espécie. Além disso, este grupo costuma adotar formas muito diferentes sendo capaz de alternar suas características rapidamente. Alguns membros produzem trofozoítos achatados em forma de leque (semelhantes aos *Vannellae*), outros são semelhantes a raízes adesivas (86).

Embora o gênero *Leptomyxa* ainda não tenha sido descrito causando doenças em humanos e animais, é pertencente a mesma ordem de *B. madrillaris* (42).

A morfologia de trofozoítos e cistos do gênero *Leptomyxa* pode ser observada na figura 9.

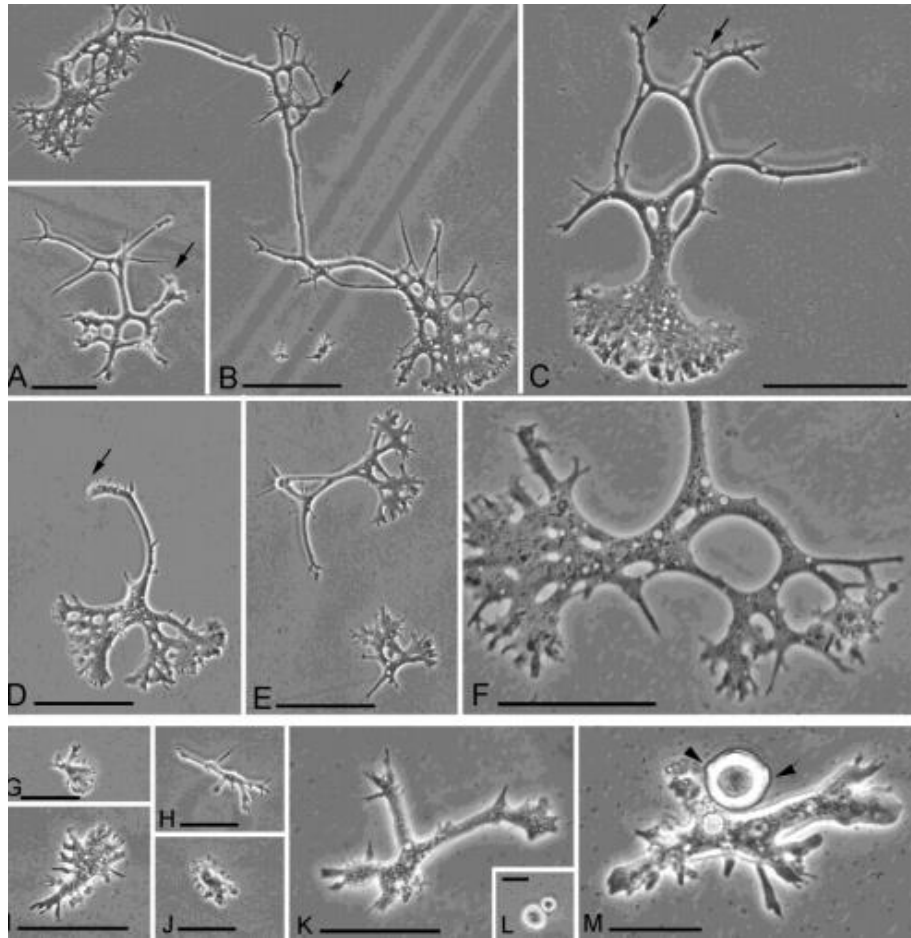


Figura 9: Microfotografia da morfologia do gênero *Leptomyxa*: A-F: *Leptomyxa arborea*, G-M: *Leptomyxa variabilis*, várias formas de trofozoítos (G-K e M); cistos (L-M). As setas indicam os ramos mais pronunciados de filamentos adesivos; pontas de seta indicam estruturas semelhantes a poros em cistos. A barra de escala é 100 μm em A-E 50 μm em F-K e 25 μm em L-M. Fonte: (91).

- *Sappinia diploidea*

Sappinia diploidea é uma ameba normalmente encontrada em ambientes diversos como solo, água doce, lixo da floresta, fezes de mamíferos e no reto de lagartos (46). É caracterizada pela presença de dois núcleos tanto na forma trofozoíto quanto na forma cística (Figura 10). O trofozoíto pode ser ovóide, oblongo ou ainda, achatado com rugas ocasionais na superfície e mede cerca de 40-80 μm . O citoplasma contém o vacúolo contrátil e os vacúolos alimentares. O cisto por sua vez é redondo e mede entre 15–30 μm (46).

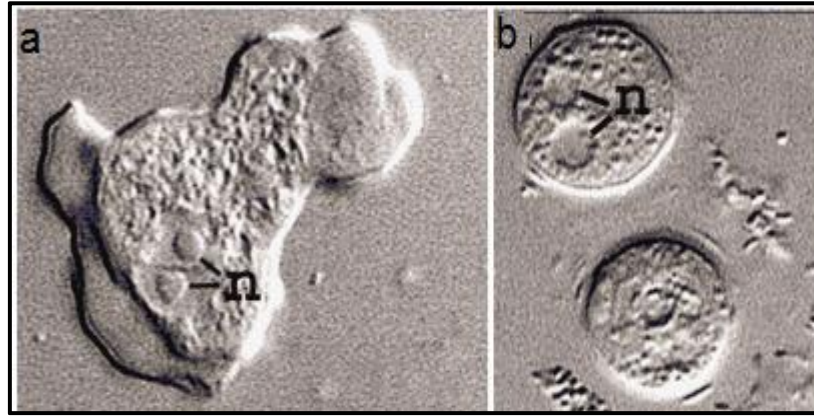


Figura 10: Microscopia de contraste diferencial de fase de *Sappinia diploidea* mostrando suas formas evolutivas. **(a)** trofozoíto; **(b)** cisto. n corresponde ao núcleo. (Fonte: (46))

- O Gênero *Vahlkampfia*

Vahlkampfia spp. são amebas pertencentes a família Vahlkampfiidae, a mesma família de *N. fowleri*, porém apresenta apenas duas formas: trofozoíto e cisto. O trofozoíto (Figura 11a) apresenta lobópodes com locomoção unidirecional, raramente podem apresentar filopódios. São geralmente uninucleados, podendo ser binucleados, seu tamanho varia de 14,7 a 25,5 μm com média de 19,3 μm de comprimento e a largura entre 7,8 a 14,7 μm com uma média de 10,3 μm (92).

Os cistos são esféricos, não apresentando inclusões citoplasmáticas e vacúolo contrátil, seu tamanho varia de 7,8 a 11,7 μm , sendo em média de 9,9 μm (Figura 11c).

Algumas espécies foram descritas em coinfeções oculares, juntamente com *Acanthamoeba* spp. (187, 188), também foi reportado coinfeção dos gêneros *Vahlkampfia* spp. e *Vermamoeba* spp. (93).

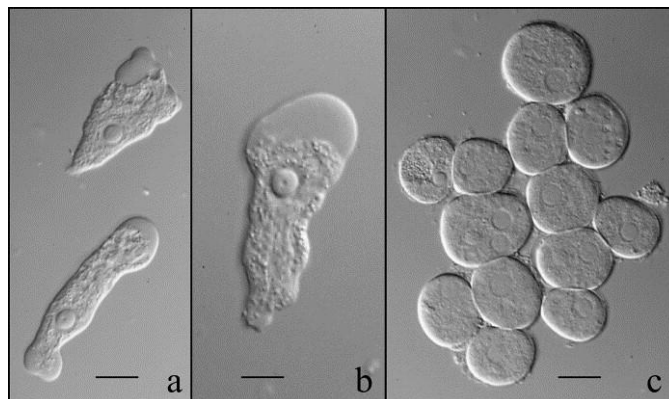


Figura 11: Microfotografia de Trofozoítos (a e b) e cistos (c) de *Vahlkampfia* spp. (Fonte: 94).

- O Gênero *Vannella* spp.

Por sua vez, as espécies alocadas no gênero *Vannella* spp. são encontradas em diversos ecossistemas, sendo água doce ou salgada. Preferencialmente localizam-se em locais com boa oferta de materiais orgânicos, tais como afluentes de esgoto. Além disso, algumas espécies como a *Vannella epipetala*, podem ser encontradas na superfície de folhas (95, 96). Esse gênero foi citado pela primeira vez por Bovee, em 1965 (97). Em sua maioria, não causam doenças, embora possam funcionar como reservatório de microrganismos patogênicos como *Microsporidium* spp. (95, 96). Em 2000, um trabalho sugere que bactérias endossimbiontes de *Vannella* spp., causaram ceratite em uma paciente, usuária de lentes de contato (29). Algumas espécies, no entanto, são capazes de causar doenças em vertebrados, principalmente peixes (95, 96). Apresentam duas formas evolutivas, o trofozoíto e o cisto, sendo que somente algumas espécies de *Vannella* spp. apresentam a capacidade de formar cistos (98).

O trofozoíto quando aderido a um substrato, apresenta morfologia semelhante a um leque, com hialoplasma hialino (Figura 12). Quando a célula se desprende da superfície assume uma conformação irregular com projeções citoplasmáticas alongadas, conhecida como forma flutuante (96,99). Seu tamanho varia de 22 a 44 μm e apresenta de um a dois núcleos, que medem de 3 a 4 μm (98, 100) .

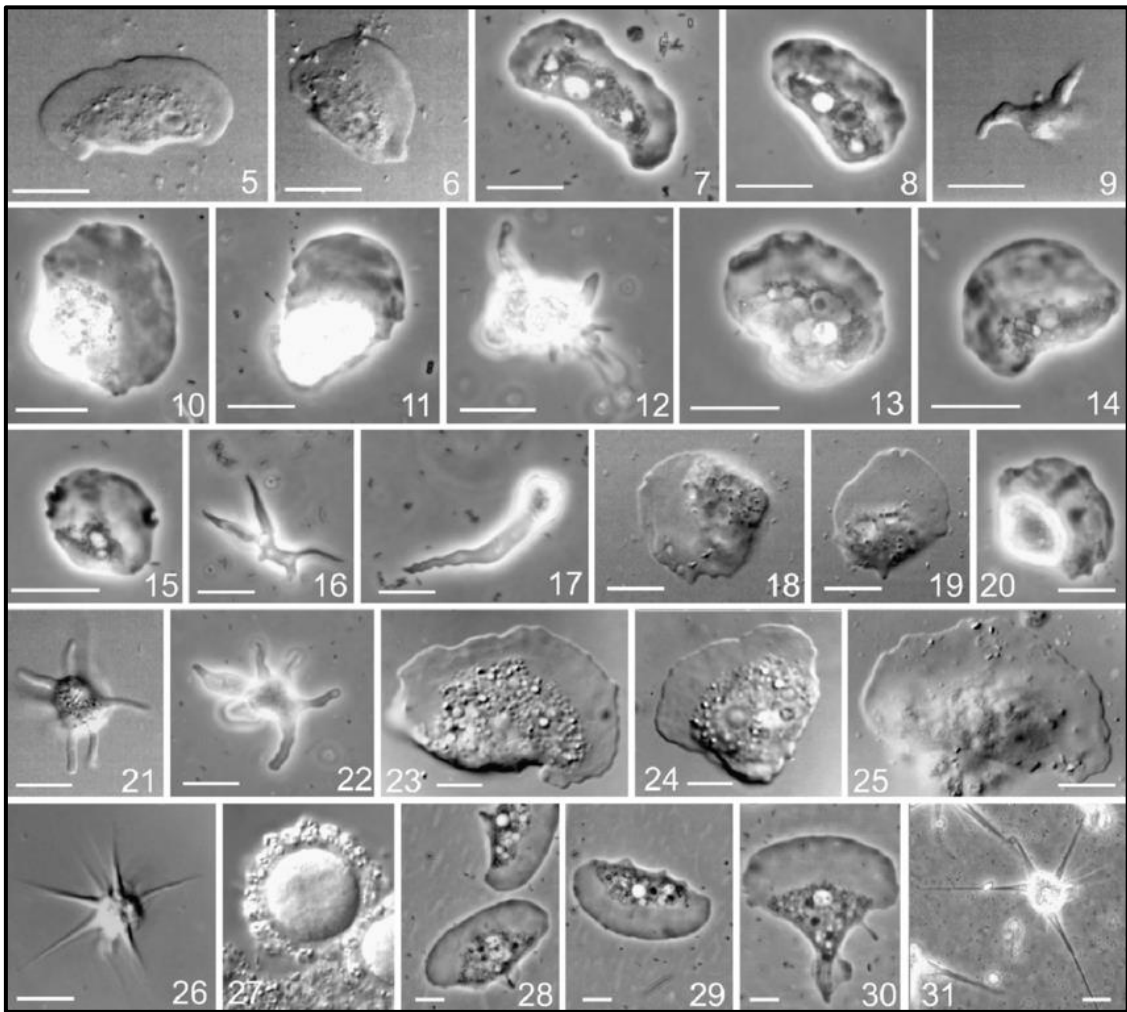


Figura 12: Microscopia de contraste interferencial de fase mostrando a diversidade de espécies de *Vannella* spp. **5-9.** *Vannella arabica* CCAP 1589/7, formas de locomoções (**5-8**) e a forma flutuante com pseudópodes curtos e rombos (**9**). **10-12.** *Vannella australis* CCAP 1565/9, formas de locomoções (**10-11**) e forma flutuante (**12**). **13-17** *Vannella bursella* CCAP 1565/10, formas de locomoções (**13-15**) e flutuantes (**16-17**). **18-22** *Vannella calycinucleolus* CCAP 1565/6, formas de locomoções (**18-20**) e flutuantes (**21-22**). Figuras **23-27** *Vannella danica* CCAP1589 /17, formas de locomoções (**23-25**), forma flutuante (**26**) e cistos (**27**). **28-30:** *Vannella simplex* (cepa de Genebra). **Imagem 31:** *Vannella simplex* CCAP 1589/3, forma flutuante. A barra de escala nas imagens é de 10 μ m, exceto no quadrante 17 (200 μ m). Fonte: (101).

A forma cística (Figura 13) tem o formato arredondado, variando seu tamanho de 6 a 10 μ m e apresenta um núcleo que mede cerca de 2 μ m de diâmetro. Quando cultivados em placas de ágar não nutriente, os cistos ficam agregados (98, 100) .



Figura 13: Microscopia de campo claro evidenciando um cisto de *Vannella* spp. Fonte: (96).

- O gênero *Vermamoeba* / *Hartmannella*

Os trofozoítos de *V. vermiformis* apresentam morfologia alongada semelhante a uma lesma, geralmente muito mais longa do que larga (Figura 14), com poucos materiais granulares no citoplasma e uma pequena zona hialina anterior. Os pseudópodes são unidirecionais podendo se tornar bi ou multipodiais ao mudar de direção (102, 103), apresentam tamanho entre 22 e 42 μm (104).



Figura 14- Trofozoítos de *Vermamoeba vermiformis*. (Fonte: 104)

Os cistos (figura 15) de *V. vermiformis* são esféricos e pequenos com cerca de 6 μm (102, 103).

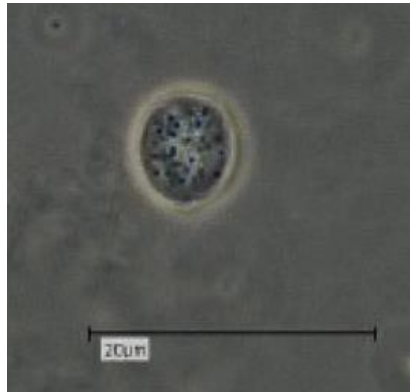


Figura 15: Cisto de *Vermamoeba vermiformis*. Fonte: (104)

Algumas espécies do gênero *Vermamoeba* spp. são responsáveis por casos de ceratite (105, 106). Esse gênero inicialmente foi nomeado como *Hartmannella* spp., baseado nos movimentos ameboides, todavia, estudos de filogenia baseado na sequência do 18S do rDNA, renomeou o gênero para *Vermamoeba* spp. (103)

1.5 Quadros clínicos e tratamento de infecções causadas por AVLs

1.5.1 Encefalite amebiana granulomatosa (EAG) causada por *Acanthamoeba* spp.

Em geral, a infecção ocorre através do contato das AVLs com a mucosa nasal, ou pela penetração por meio de fissuras na pele. Geralmente, um indivíduo imunocomprometido adquire a infecção ao realizar atividades de natação em coleções de água contendo cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. (107). Algumas espécies de *Acanthamoeba* são capazes de causar o quadro de encefalite amebiana granulomatosa (EAG), doença grave que acomete na maioria das vezes pacientes imunocomprometidos. A lesão cerebral (Figura 16) progride lentamente no início e o indivíduo apresenta algumas alterações comportamentais e posteriormente evolue para convulsões, rigidez na nuca, alterações visuais, vômito podendo progredir para o coma (107, 108). É uma doença muito grave, de tratamento inespecífico e seu diagnóstico quase sempre é tardio, majoritariamente é realizado durante a necropsia. A evolução da doença está relacionada com a carga parasitária, virulência e o *status* imunológico do paciente (109). Embora seja observada mais comumente em

imunocomprometidos, existem relatos de caso em pacientes imunocompetentes (110). Em alguns casos de EAG, os trofozoítos podem ser encontrados em outros órgãos, como os Pulmões (111)

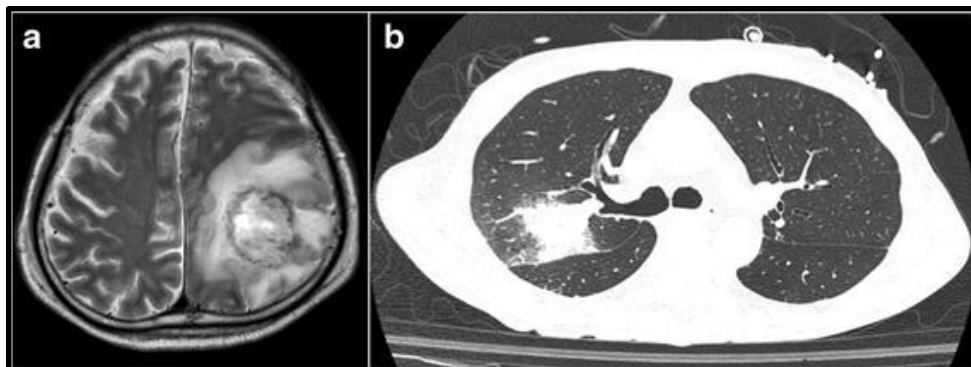


Figura 16: Lesão cerebral (a) e pulmonar (b) em um paciente com Encefalite Amebiana Granulomatosa. Fonte: (111).

O tratamento para a EAG é inespecífico (25, 112), a maioria das vezes é realizado com uma combinação de antifúngicos e antibióticos como: fluconazol, voriconazol, cotrimoxazol, pentamidina trimetoprim, sulfametoxazol com rifampicina e meropenem, linezolida, moxifloxacina e em alguns casos anfotericina B (15, 113, 114). De acordo com Webster e cols (2012), uma combinação de miltefosina com voriconazol foi eficiente no tratamento de um paciente com EAG (110).

1.5.2 Ceratite Amebiana causada por *Acanthamoeba* spp.

Ceratite amebiana é uma doença grave que acomete indivíduos imunocompetentes; consiste na infecção aguda da córnea e está na maioria das vezes associada ao uso prolongado de lentes de contato (22, 24, 27, 28, 50, 115, 116,117). A higienização precária das lentes de contato somada ao trauma causado pelo atrito destas com a córnea proporciona um ambiente propício ao desenvolvimento da infecção. Além disso, o surgimento do agravo pode ser decorrente da prática de natação em águas contaminadas (107). A ceratite (Figura 17) é caracterizada geralmente pela presença de lesões epiteliais e o surgimento de áreas opacas focais ou difusas; dentre os sinais e sintomas destacam a sensação de corpo estranho no olho, intensa dor ocular, olhos avermelhados, visão turva e lacrimejamento (107; 118). Em alguns casos pode levar a cegueira ou até mesmo extrusão do glóbo ocular.

O tratamento desta doença é realizado através da administração de Clorexidina a 0,02% combinada com diamidinas aromáticas, como: isionato de propamidina a 0,1% de dibromopropamidina a 0,15%, hexamidina de desomedina a 0,1% e Neomicina (120) .

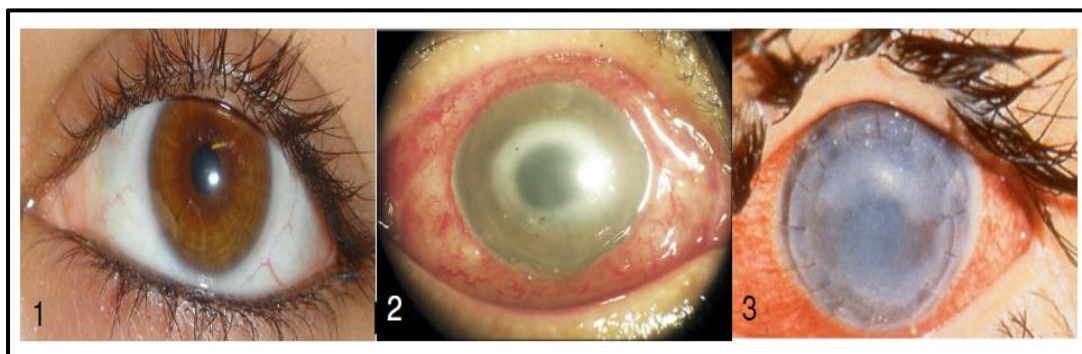


Figura 17: Fotografias comparando o olho saudável com olhos com diferentes manifestações clínicas de ceratite amebiana. **(1)** olho normal; **(2)** olho com infiltrado e anel no estroma corneal; **(3)** olho com infecção avançada apresentando infiltrado corneal e tecido necrosado. Fonte: (23).

1.5.3 Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) causada por *Balamuthia mandrillaris*

O quadro clínico da encefalite amebiana granulomatosa (Figura 18) assemelha-se a meningites bacterianas e virais e os sinais e sintomas mais descritos são: dor de cabeça, febre, podendo apresentar rigidez do pescoço, náusea, sonolência, alterações de humor, hemiparesia, afasia, vômito, estado confuso agudo, paralisia do nervo craniano, pressão intracraniana aumentada, convulsões, edema cerebral, podendo culminar na morte (12, 41, 121-123). As amebas por meio da ação de proteases e fagocitose causam um quadro de encefalite hemorrágica necrosante subaguda (121). A forma de transmissão ainda não foi bem elucidada, mas acredita-se que ocorra por meio da inalação ou penetração pela pele (124).

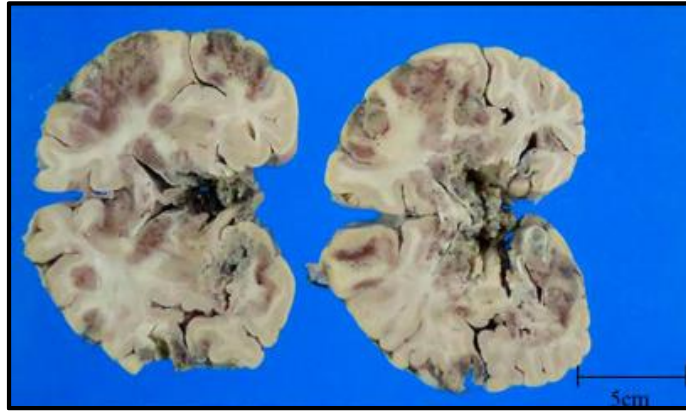


Figura 18: Cérebro com lesões características de Encefalite Amebiana Granulomatosa causadas por *Balamuthia mandrillaris*. (Fonte: (125).

1.5.4 Lesões cutâneas ocasionadas por *Balamuthia mandrillaris*

Alguns indivíduos com quadros de encefalite, apresentam também lesões na pele com úlceras eritematosas perfuradas com crostas sobrepostas (Figura 19A). Além disso, é observado na derme um infiltrado inflamatório com regiões mistas de aspecto agudo e crônico denso simultaneamente (Figura 19B) e trofozoítos dispersos nos espaços lacunares (Figura 19C) (124).

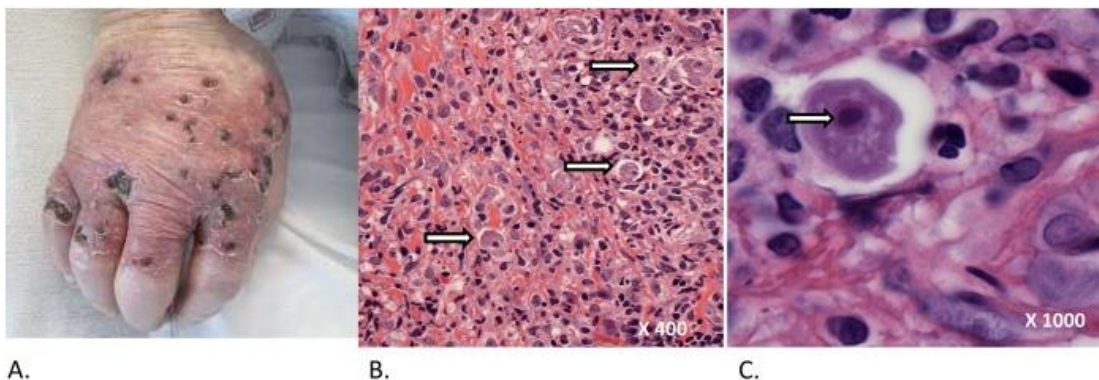


Figura 19: Lesões cutâneas causadas por *Balamuthia mandrillaris* e cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina evidenciando trofozoítos na lesão; **(A)** mão com lesões típicas causadas por *B. mandrillaris* **(B e C)** cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE), mostrando um trofozoíto (indicado pelas setas) ao centro e um infiltrado leucocitário ao redor. Fonte: (124).

O tratamento é realizado por meio de combinações de antifúngicos e antibióticos. Os fármacos mais utilizados são: pentamidina, sulfadiazina, flucitosina, fluconazol, itraconazol, azitromicina, claritromicina, bem como miltefosina (124).

1.5.5 Meningoencefalite amebiana primária (MAP) por *Naegleria fowleri*

A MAP é uma infecção causada por *N. fowleri*, aguda e fatal em mais de 95% dos casos, que se desenvolve, após um dia da exposição, podendo progredir para a morte em uma a duas semanas. Acomete indivíduos saudáveis, ao contrário das infecções por *B. mandrillaris* e *Acanthamoeba* spp. (12, 107; 125). A infecção ocorre após atividades de natação, geralmente em coleções de água aquecidas. Os trofozoítos e/ou flagelados ao entrar em contato com as fossas nasais do indivíduo susceptível, aderem e migram pela mucosa do epitélio nasal (Figura 20A). Após atravessar a lâmina própria das células olfatórias justapostas por meio de junções estreitas (TJs), junções aderentes (AJs) e desmossomos (DSMs) às glândulas de Bowman e aos neurônios sensoriais olfativos, os trofozoítos penetram e invadem o encéfalo (Figura 20 B).

Inicialmente os trofozoítos invadem a mucosa através da ação de adesinas, lectinas, cisteínas (NfCPs), catepsinas (NfCPBs) e enzimas mucinolíticas. Posteriormente, se ligam às células epiteliais, preferencialmente no espaço intercelular, que por ação de adesinas, glicoproteínas, proteases e integrinas, promovem a abertura das junções intercelulares (IJs), que são degradadas e internalizadas pelo parasito. O mecanismo de invasão ao sistema nervoso por *N. fowleri* ainda não é muito bem compreendido. Alguns estudos sugerem que os trofozoítos invadem a lâmina basal, atravessam a placa caliciforme, alcançando o espaço subaracnóideo e o líquido cefalorraquidiano (líquor), adjacente ao bulbo olfativo, chegando ao encéfalo (126-129). Outros sugerem que a disseminação ocorre por via hematogênica, após a penetração pelo epitélio olfativo (130). Após um curto período de tempo, alguns dias, ocorre a necrose do tecido nervoso devido a secreção de proteases pela ameba e a migração de neutrófilos para a região, acarretando uma meningoencefalite difusa, que é confundida com o quadro clínico causado por agentes bacterianos (17).

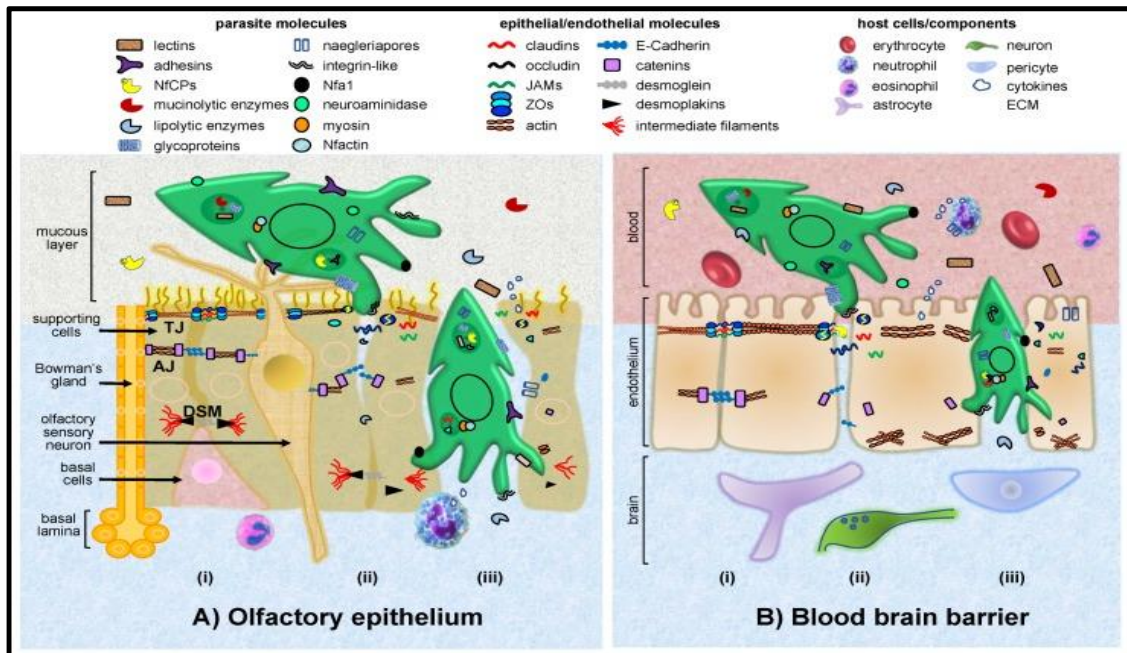


Figura 20: Mecanismo de invasão de *Naegleria fowleri*. **(A)** no epitélio olfatório; **(B)** na barreira hematoencefálica Fonte:(130).

Geralmente, os primeiros sintomas observados são: febre alta, dor de cabeça, náusea, fotofobia e rigidez na nuca. Como os casos de MAP são raros e os sintomas são muito semelhantes à infecção causada por bactérias, em geral, a antibioticoterapia é realizada precocemente visando um prognóstico satisfatório. Entretanto, os sintomas evoluem para obnubilação, diplopia, visão turva, alterações comportamentais, paralisia dos nervos cranianos, seguidos de crises convulsivas e coma. Caso o diagnóstico não seja realizado corretamente, o indivíduo pode ainda evoluir para um quadro de hipertensão craniana grave, edema pulmonar e complicações cardíacas, levando o indivíduo a óbito (12 ;17).

A terapêutica empregada para MAP é inespecífica empregando um tratamento combinado com antifúngicos e antibióticos. O fármaco anfotericina B é amplamente utilizado, embora sejam também empregados outros fármacos como: fluconazol, miconazol, miltefosina, azitromicina e rifampicina (28; 131) .

1.5.6 Encefalite causada por *Sappinia diploidea*

Infecções causadas por *S. diploidea* são raríssimas. Existe apenas um relato de caso que descreve um homem de meia idade saudável que apresentou náusea, vômito, dor de cabeça, fotofobia e visão embaçada por cerca de três dias. Através do

exame por ressonância magnética, foi evidenciada uma massa de dois centímetros no lobo temporal posterior esquerdo. A biópsia desta massa revelou uma inflamação hemorrágica necrosante e a presença de formas amebóides (31).

1.6 Diagnóstico de infecções causadas por AVLS

O diagnóstico das encefalites amebianas, na maioria das vezes é realizado pós-óbito, pois se trata de uma doença rara que apresenta sintomas inespecíficos, o que dificulta a distinção com as encefalites bacterianas, virais e fúngicas (28,131). Por ser um evento raro, a encefalite amebiana não é aventada nem diagnosticada precocemente, acarretando na maioria dos casos a evolução ao óbito quando o tratamento adequado não é realizado a tempo (132).

O diagnóstico laboratorial é baseado na observação de formas trofozoítos no líquido ou em biópsia de lesões no tecido cerebral (125). Para isso são utilizadas as colorações de hematoxilina-eosina (HE) ou Giemsa. No entanto, a identificação das formas trofozoítos exige experiência do microscopista, uma vez que essas formas podem ser confundidas com leucócitos (107; 133). Nos casos do gênero *Acanthamoeba* e de *B. mandrillaris* existe a possibilidade de encistamento no tecido cerebral, que facilita o diagnóstico laboratorial, pois as formas císticas se contrastam das células neurais e leucócitos (50, 134).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma ferramenta que apresenta alta sensibilidade e especificidade para identificação de gêneros de AVLS, por meio da amplificação parcial do fragmento da subunidade menor 18S do RNA ribossomal (81;111,125). Todavia, apresenta um elevado custo e ainda hoje não é acessível na maioria dos laboratórios clínicos; sua utilização é restrita aos laboratórios de pesquisa.

O diagnóstico de ceratite por *Acanthamoeba* é realizado, na maior parte das vezes, por imagens, por meio da visualização de cistos refringentes nos exames oftalmológicos ou pela identificação da lesão típica. Para tanto, é necessário experiência profissional (133). O diagnóstico rápido e preciso é o diferencial para que ocorra uma evolução benigna da doença (22, 24, 28, 50, 115, 116, 117,135). A demora do diagnóstico pode culminar em cegueira e até mesmo a necessidade de extrusão do globo ocular (17).

Os métodos de cultura também podem ser utilizados para o diagnóstico. O ágar não nutritivo a 1,5% revestido com uma camada de *Escherichia coli* (136, 137) é o

método mais utilizado para o crescimento de AVLs, sendo recomendado o cultivo por sete dias (28). No entanto, essa técnica não é muito útil para infecções causadas por *B. mandrillaris*, pois essa ameba não se alimenta de bactérias (28). Neste caso, é indicado o uso de cultura de células ou meio Cerva, que é composto por caseína e salina de Hanks e suplementado com soro fetal bovino (138).

Outra técnica promissora sugerida por Wilson e cols. (2015), como ferramenta de diagnóstico laboratorial, é o sequenciamento metagenômico (MDS) diretamente do Líquido Céfalo-Raquidiano (139). No entanto, maiores estudos são necessários para validar e aprimorar as técnicas de diagnóstico laboratorial, visando agilidade e baixo custo e assim proporcionar a incorporação dessas técnicas pelos laboratórios, neste aspecto as técnicas de coloração podem futuramente contribuir para o diagnóstico laboratorial, destes agravos.

1.7 Infecções por AVLs em animais e o uso de Primatas não humanos (PNHs) como modelo experimental

A ampla distribuição das AVLs no ambiente somada a sua capacidade de adaptar-se a vida parasitária (12), contribui para que as AVLs tenham uma vasta gama de hospedeiros. As AVLs foram isoladas do sistema nervoso de primatas não humanos, cães, ovinos, bovinos, cavalos e cangurus, pássaros, répteis, anfíbios, peixes e até mesmo de invertebrados (40,140) .

Relatos de encefalite por AVLs em animais têm sido descritos. Em 2015, um trabalho realizado na região semiárida da Paraíba, mostrou que três cães apresentaram acantamoebíase disseminada associada à cinomose canina (65). Em gado doméstico, dois casos fatais de MAP por *N. fowleri*, foram descritos em uma vaca de quatro anos de idade em uma fazenda no sul do Brasil e um bovino de um ano de idade, no nordeste brasileiro (66, 67).

Em 1958, primatas não humanos e camundongos faleceram após serem desafiados com a vacina da poliomielite. Posteriormente, foi verificado que a vacina estava contaminada com *Acanthamoeba* spp. (11, 37). No ano seguinte, um estudo de infecção experimental com camundongos e PNHs infectados por instilação nasal reproduziu quadros de encefalite (12). A infecção experimental de PNHs com *Acanthamoeba* spp., causou a morte dos animais (37). Foram relatados casos de

meningoencefalite e pneumonia por *Acanthamoeba*, em primatas do gênero *Macacca*, com imunodeficiência viral (174).

Por sua vez, *B. mandrillaris* foi isolada, pela primeira vez, da necropsia de tecido cerebral de um babuíno mandril, da espécie *Papio sphinx* que faleceu após um quadro de encefalite, em um zoológico nos Estados Unidos (40,41).

Portanto, os PNHs são excelentes modelos, para o estudo de doenças causadas pelas AVLs, uma vez que estes são suscetíveis e desenvolvem um quadro clínico semelhante ao observado no ser humano.

Mundialmente, os PNHs, são utilizados como modelos em diversas áreas de pesquisas biomédicas, por apresentarem uma proximidade evolutiva e características semelhantes aos humanos. Entretanto, no Brasil existem poucos Centros de Primatologia. A Fundação Oswaldo Cruz possui um Centro de Primatologia, localizado no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, o ICTB. Inicialmente o instituto foi criado por Oswaldo Cruz em 1908, onde eram criados coelhos, cobaias, animais de médio e grandes portes. Em 1932, devido à epidemia de febre amarela (1929), foi instalada na ilha do Pinheiro a primeira colônia de primatas da espécie *Macaca mulatta*. Somente em 1998, foi criado o Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal/Fiocruz) que posteriormente durante um congresso interno da Fiocruz, no ano 2015 foi transformado no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz) (141). Atualmente, o ICTB possui um serviço de Criação de Primatas não Humanos (SCPrim) que possui colônias de *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis* e *Saimiri* spp.

Macaca mulatta apresenta uma coloração marrom clara ou bege amarelada, com a face róseo-avermelhada. Os machos adultos medem em média 53 cm em cativeiro, sendo a fêmea um pouco menor (Figura 21). São originários da Ásia Central e em escala global é a espécie de PNH mais utilizada em estudos científicos. Esta espécie de PNH foi importante para o desenvolvimento da vacina contra raiva e poliomielite, na descoberta do fator Rh sanguíneo e no desenvolvimento de medicamentos contra HIV/ AIDS (141).



Figura 21: Imagem de *Macaca mulatta*. Fonte: (141).

Macaca fascicularis apresenta uma coloração marrom claro à marrom acinzentado e a sua face marrom-pink e mede entre 37 a 62 cm na natureza, podendo chegar a 65 cm em cativeiro (Figura 22). São originários da Indochina, Burma, Indonésia, Filipinas e Índia. É um modelo experimental muito utilizado em testes da vacina inativada contra o vírus da hepatite A e da imunogênica contra tuberculose. Também é utilizado em infecções experimentais (ex: *Trypanosoma cruzi*) na avaliação de ensaios de imunoprevenção, imunoterapia ou testes com fármacos (141).



Figura 22: Imagem de *Macaca fascicularis*. Fonte: (141).

Saimiri spp. são originários da América Latina e medem cerca de 30 cm. Possui uma coloração cinza-oliva-amarelada nas partes superiores e branco-amareladas nas inferiores (Figura 23). Em ensaios experimentais, são muito utilizados principalmente em estudos de vacina para malária (de acordo com a OMS). Por apresentarem dimensões menores, são mais vantajosos em termos de infraestrutura (141).



Figura 23: Fotografia de *Saimiri* sp. Fonte: (141)

Callithrix sp. (híbrido de *C. jacchus* e *C. penicillata*) compreende primatas, conhecidos popularmente como saguis (figura 24), esses PNHs são originários da Mata Atlântica nordestina, são insetívoros, frugívoros, também alimentam-se de exsudatos vegetais. Seu tamanho varia de 20,5 cm para os machos e 21,8 cm para as fêmeas (142; 143). Além disso, o peso corporal da fêmea é de cerca de 322g e do macho de 317,9 g (142; 144). No Rio de Janeiro esses PNHs são considerados espécies invasoras e são responsáveis pela redução das populações nativas como no caso do mico-leão dourado (142).



Figura 24: Fotografia de *Callithrix* spp. Fonte: (142)

A onipresença de AVLs na natureza pode possibilitar a infecção e a colonização de animais domésticos e selvagens por meio do contato direto com o solo ou coleções de água contaminadas ou ainda por meio de alimentos contaminados. Assim, tanto o ser humano quanto outros animais quando expostos a determinadas espécies ou cepas com potencial patogênico, estão sob o risco de desenvolver um quadro infeccioso que pode culminar em letalidade. Desta forma, a presença de AVLs no microbioma intestinal precisa ser melhor investigada, devido a sua importância para a saúde pública.

JUSTIFICATIVA

Notoriamente as AVLs apresentam inestimada relevância médico-veterinária. Estes protozoários são responsáveis por doenças graves (ceratite) e letais (encefalites) que abrangem uma diversa gama de hospedeiros vertebrados. Não somente, são organismos carreadores de microrganismos patogênicos. Em alguns casos a interação das AVLs com outros microrganismos pode selecionar genótipos virulentos de microrganismos e até mesmo proporcionar o aumento da virulência das AVLs.

Portanto o tema AVL apresenta vários desdobramentos nas áreas da infectologia, parasitologia, medicina, veterinária e farmacêutica. Mesmo assim não há incentivo de estudo para esse tema.

As doenças causadas por esses protozoários fazem parte das doenças negligenciadas, há uma enorme escassez de trabalhos visando elucidar o papel desses microrganismos para a comunidade médico-veterinária, que é justificado pela “raridade do evento”. Todavia, o número de casos vem aumentando em paralelo com o crescimento dos estudos, desta forma surge a dúvida: As infecções por AVLs, são eventos raros ou sub-notificados?

A escassez de estudos acarreta despreparo dos profissionais, tanto médicos e veterinários na elucidação do diagnóstico clínico, quanto os dos técnicos em laboratório, na conclusão do diagnóstico laboratorial. Isso contribui para o aumento na mortalidade (no caso das encefalites amebianas) e por outro lado contribui para a subnotificação.

Quanto à presença de AVLs em fezes, a escassez de trabalhos aumenta consideravelmente, sabe-se que a interação microrganismos-intestino pode gerar inúmeros desdobramentos. O intestino apresenta uma infinidade de células imunes pró-inflamatórias e outras reguladoras, essas células são responsáveis por gerar homeostase, regulando a interação entre microrganismos intestinais e o hospedeiro. Desta forma o papel das AVLs no microbioma intestinal é completamente desconhecido.

Os PNHs são susceptíveis às infecções por AVLs, o cativeiro por si só constitui um meio estressante, o qual impacta a imunidade e saúde dos animais, portanto a presença de AVLs no microbioma intestinal destes primatas, pode significar um risco a sua saúde. Seja por ação direta das amebas ou pela ação de endossimbiontes (carreados pelas amebas).

Por esses motivos, a caracterização morfológica, tanto pela microscopia de contraste de fase, quanto pelo emprego de colorações, constitui uma importante ferramenta para o diagnóstico das infecções causadas pelas AVLs, tanto no microbioma intestinal quanto em casos de encefalite por exemplo. Desta forma, esse estudo serve de fomento para pesquisas mais aprofundadas na caracterização morfológica das AVLs e seu emprego nos diagnósticos laboratoriais.

3- HIPÓTESE

A hipótese a ser verificada neste estudo é que O diagnóstico morfológico empregando coloração permanente (Giemsa, Panótico e Tricrômio) apresenta um bom desempenho como teste de triagem para o diagnóstico e monitoramento de AVLS no trato gastrointestinal.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização morfológica e molecular de amebas de vida livres isoladas do microbioma intestinal de primatas não humanos.

4.2 Objetivos Específicos

1. Isolar e estabelecer o cultivo de AVLs presentes nas fezes de PNHs empregando cultivo bifásico e axênico;
2. Avaliar diferentes técnicas de coloração para a caracterização morfológica das formas císticas e dos trofozoítos de AVLs;
3. Identificar o gênero dos isolados por meio de critérios morfológicos;
4. Estabelecer protocolos de identificação molecular dos gêneros de AVLs isolados;
5. Classificar os isolados por parâmetros morfológicos e por seqüenciamento parcial dos produtos amplificados pelos alvos acima.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Amostragem

Neste estudo, foram coletadas 101 amostras de fezes de PNHs de cativeiro e de vida livre. Destas, 96 amostras de fezes e/ou lavados retais foram coletadas no serviço de Criação de Primatas não Humanos (SCPrim) do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB, Fiocruz). sendo que 85 de *M. mulatta*, 10 de *S. sciureus* e uma *S. ustus*. Os PNHs vivem em recintos coletivos, em grupos familiares, somente os que fazem parte de algum projeto de pesquisa, vivem isolados.

Os recintos (gaiolões) apresentam 36 m² de área e 3,5 m de altura, onde são dispostos poleiros, tambores, troncos de árvores e brinquedos trocados periodicamente de acordo com o Programa de Enriquecimento Ambiental, o chão é recoberto com maravalha autoclavada. Os recintos se localizam em ambiente arborizado, de iluminação natural, com temperatura ambiente não controlada (141). Além destes, existem recintos tipo sede, que apresentam ambiente controlado e fechado. Das 85 amostras de *M. mulatta*, 17 vivem em recintos tipo sede.

As amostras fecais foram coletadas exclusivamente por veterinários e/ou técnicos diretamente do recinto ou das gaiolas individuais. Além disso, durante o exame clínico individual realizado periodicamente no SCPrim foram coletados lavados retais do PNHs, após serem anestesiados.

Além destas, foram coletadas cinco amostras de *Callithrix* sp. de vida livre, da Estação Biológica FIOCRUZ Mata Atlântica e do entorno de Jacarepaguá, Rio de Janeiro (EFMA, 22°56'25" S, 43°24' 18" O). Estes PNHs são capturados e submetidos a eutanásia para avaliação dos fatores de risco e da ocorrência de zoonoses. As amostras fecais foram coletadas diretamente do intestino destes PNHs, após o sacrifício.

Todos os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com as diretrizes definidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil e foi aprovado sob as pelas licenças, CEUA/FIOCRUZ-LW5-16 e LW-57/19.

5.2 Preparo das amostras

As amostras fecais foram coletadas em tubos Falcon de 50 mL, estéreis. Estes foram acondicionados em isopores com gelo, para preservação das amostras e transportados ao laboratório, onde as amostras foram imediatamente processadas. O transporte foi realizado de acordo com as normas de biossegurança, e com intervalo máximo de 30 minutos entre a coleta e o início do processamento das amostras.

Cerca de 2 gramas de fezes foram homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato salino (PBS) (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄ - pH 7,4).

5.3 Cultivo das amostras

Para o cultivo das fezes, foram adicionados 200 µL de fezes previamente diluídas em PBS ao meio bifásico (ágar não nutriente, contendo como fase líquida, o meio PAGE) (33). O meio PAGE é composto por 2 mM cloreto de sódio (NaCl), 0,033 mM sulfato de magnésio (MgSO₄), 1 mM hidrogenofosfato dissódico anidro (HNa₂O₄P), 1 mM fosfato monopotássico (KH₂PO₄) e 0,1 mM cloreto de cálcio (CaCl₂).

As culturas foram mantidas a temperatura ambiente de 27°C. O crescimento amebiano foi monitorado diariamente durante 30 dias, por meio da observação em microscópio invertido com contraste de fase. A cada sete dias foram realizadas etapas de lavagem com meio PAGE, para evitar o crescimento de fungos. Após 30 dias de cultivo, as amostras negativas foram descartadas. Aquelas onde foi observada presença de AVLs foram novamente semeadas em meio bifásico e alíquotas de cada cultivo foram lavadas em PBS e congeladas a -20°C para posterior análise molecular.

As culturas positivas foram repicadas para uma nova placa contendo o ágar-PAGE coberto com uma suspensão de *E. coli* vivas. Para isso, com auxílio do microscópio invertido, uma pequena área contendo trofozoítos ou cistos, foi demarcada com uma caneta esferográfica permanente (Figura 25). Posteriormente, o ágar-PAGE da área demarcada, contendo os amebídeos, foi transferido com auxílio de uma alça bacteriana e/ou agulha, para uma nova placa contendo as bactérias. Esse procedimento foi repetido 10 vezes (10 passagens) a cada três dias. Após 10 passagens, foram então realizados mais 10 repiques, mas dessa vez em placas de ágar-PAGE recobertas com solução de bactérias inativadas/mortas pelo calor (100°C por 20 min).

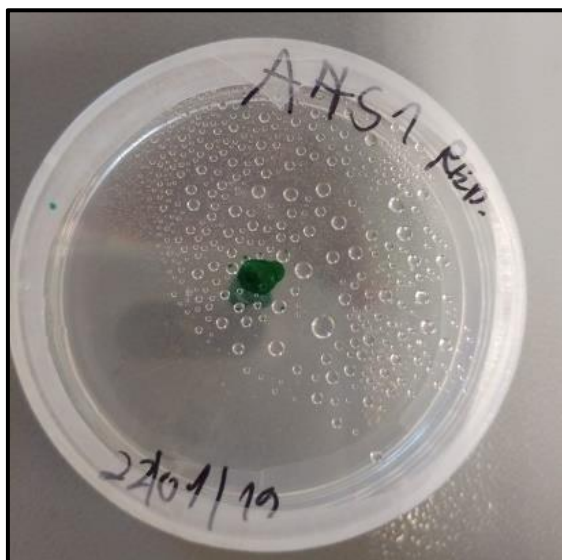


Figura 25: Cultivo em placa de Petri contendo ágar-PAGE. A marcação com caneta pilot verde demarca o local com amebídeos de onde será realizado o repique.

Fonte: Autoria própria.

Para manutenção das células e redução do espaço, após 20 passagens, as placas de petri foram substituídas por tubos de vidro de 5 mL. Para isso, um pequeno fragmento de ágar contendo os amebídeos foi transferido para um tubo de vidro estéril contendo 3 mL de meio PAGE e 2 mL de solução de *E. coli* inativadas previamente pelo calor. A cultura foi mantida em estufa a 27°C, durante o período de 30 dias. Posteriormente, as amebas foram repicadas para um novo frasco contendo novamente o meio PAGE acrescido de bactérias inativadas.

As etapas de estudo a partir do isolamento dos amebídeos está representada no fluxograma abaixo (Figura 26).

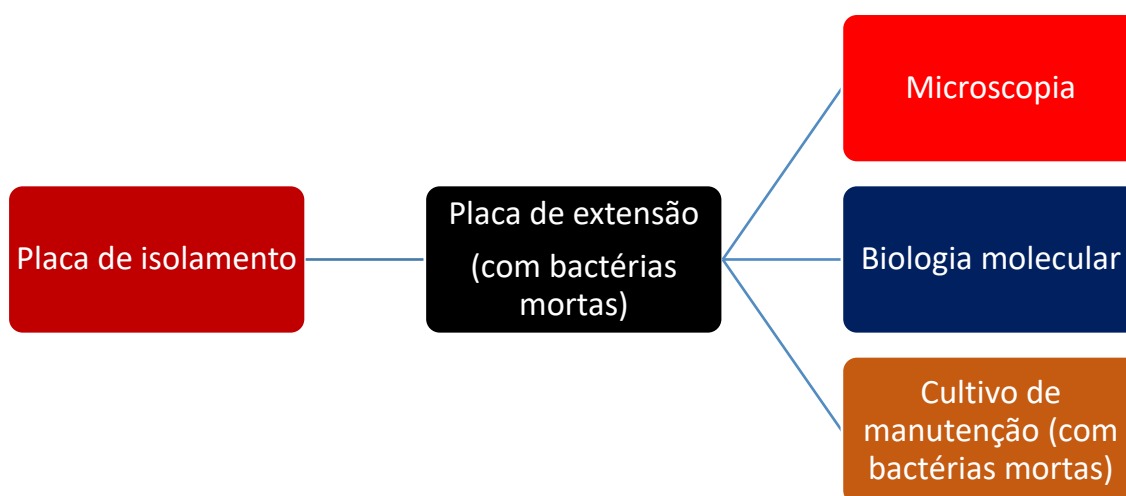


Figura 26: Fluxograma de trabalho mostrando as etapas do isolamento e identificação de Amebas de Vida Livre

5.4 Padronização de protocolos de axenização dos isolados

Para obtermos culturas de amebas puras, livres de contaminantes, foram utilizados três diferentes protocolos de axenização.

5.4.1 Axenização por meio de filtração

As placas com maior quantidade de cistos, obtidos naturalmente após quatro ou cinco dias em cultura de ágar PAGE, foram colocadas no gelo por 15 min para o desprendimento dos cistos da matriz de ágar. Cerca de 2 mL da parte líquida (meio PAGE) contendo os cistos em suspensão foi transferida para um sistema de filtração contendo uma membrana com porosidade de 8 µm (145). A membrana foi lavada repetidamente com solução de PAGE e o líquido foi semeado em meio Nelson (extrato de fígado bovino 1 g/L, 5,5 mM de glicose)

5.4.2 Axenização após incubação com HCl

As placas contendo cistos de AVLs foram incubadas em gelo por 15 min para desprendimento dos amebídeos. Após esta etapa, os cistos flutuantes na parte líquida do meio PAGE foram transferidos para microtubos e centrifugados a 2200 x g por 5 min. O sobredante foi descartado e ao sedimento foi acrescido uma solução de HCl a 3%. O microtubo foi vedado com parafilme e incubado a 37°C, *overnight*. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para uma garrafa de cultura, contendo meio Nelson suplementado com soro fetal bovino (SFB), 10% de penicilina e streptomicina a 100 µg/mL (145, 146).

5.4.3 Axenização após a adição de antifúngicos

Foram testados sete antifúngicos: fluconazol, voriconazol, micafungina, caspafungina, itraconazol e terfabinina. As amostras foram semeadas em placas contendo ágar PAGE acrescido de *E. coli* previamente mortas na presença dos antifúngicos supracitados nas seguintes concentrações: 2 µg/mL para fluconazol; 1,6 µg/mL para voriconazol, itraconazol e trefabinina; 0,8 µg/mL para caspafungina e micafungina. Após sete dias, um fragmento do gel, contendo trofozoítos foi transferido para uma garrafa de cultura contendo 5 mL de meio Nelson ou meio PYG (meio proteose-peptona) e SFB à 10%. O meio PYG é composto por: 20 g/L peptona, 2 g/L extrato de levedo, 8,16 mM sulfato de Magnésio (MgSO₄), 0,41mM cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O), 3,8mM citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇), 1,3mM sulfato de ferro (FeSO₄), 2,5mM fosfato de potássio (KH₂PO₄), 2,5mM fosfato de sódio (NaH₂PO₄) e 50 mM glicose (C₆H₁₂O₆).

5.5 Caracterização morfológica dos isolados obtidos

As características morfológicas foram avaliadas por meio de microscopia direta das culturas em placa de Petri empregando o microscópio invertido, por meio do contraste de fase. As características avaliadas foram as seguintes: formato celular, tipo de pseudópode (lobópode ou acantopódio), núcleo, citoplasma, vacúolo pulsátil e vacúolos digestivos. Além disso, as características morfológicas foram avaliadas após a coloração com as seguintes técnicas: Panótico®, Giemsa e Tricrômio de Masson em microscópio óptico em objetiva de imersão (100 X) e fotodocumentadas através de câmeras digitais de 13 e 48 Mp.

5.5.1 Fixação das amostras

A preservação da morfologia das AVLs foi realizada com os fixadores: formaldeído a 4%, metanol absoluto e Schaudinn (que é composto por cloreto de mercúrio-II, álcool etílico, glicerina e ácido acético glacial). Inicialmente, os trofozoítos ou cistos foram raspados da superfície do ágar, com auxílio de uma alça bacteriológica e homogeneizados em meio PAGE.

As células em suspensão foram transferidas para microtubos que foram centrifugados a 2200 x g por 5 min. Posteriormente, o sedimento foi homogeneizado com formaldeído a 4% em PBS e incubado durante 30 min a 37°C. Após a fixação, as amostras foram lavadas em água destilada, quatro vezes, por centrifugação a 3000 x g por 10 min. Em seguida, foram feitos esfregaços em lâminas de microscopia, previamente limpas e desengorduradas em solução de álcool-éter (1:1) por pelo menos 5 min. Os esfregaços secaram à temperatura ambiente, e posteriormente receberam um banho de metanol absoluto para aderência da amostra à sua superfície da lâmina.

Para fixação com metanol, as células foram raspadas da superfície do ágar, com auxílio de uma alça bacteriológica e homogeneizados em meio PAGE.

As células em suspensão foram transferidas para microtubos que foram centrifugados a 2200 x g por 5 min. o sobrenadante foi descartado e os trofozoítas resuspendidos em 100 µL de PAGE. Posteriormente foram realizados esfregaços, conforme descrito anteriormente, estes foram imergidos em metanol absoluto por 5 min.

5.5.2 Padronização das técnicas de coloração

Para a coloração de Giemsa foram utilizadas diferentes diluições do corante em PBS; foram elas: 1:25, 1:50 e 1:100. Para o tempo de coloração, foram testados os tempos de 5, 10, 15 e 20 min.

Para a coloração com o kit comercial Panótico® foram testados diferentes tempos, variando de 1 a 10 seg. Sequencialmente, as lâminas foram imersas nas soluções de triarilmetano a 0,1% (fixador), solução de xantenos a 0,1% (corante ácido) e solução de tiazinas a 0,1% (corante básico).

A coloração com Tricrômio de Manson foi realizada seguindo o protocolo descrito previamente (128). Os esfregaços foram fixados com Schaudinn por 1 h, seguido por lavagem das lâminas em água corrente. Posteriormente as lâminas foram imersas nas soluções subsequentes: álcool a 95% iodado (1 min), álcool a 70% (1 min), corante Tricrômio (6 min) e álcool-ácido (5 seg). Em seguida, foram desidratadas

com banhos de álcool a 95% seguido de álcool absoluto (3 X) e xilol. Após a secagem, as lâminas foram seladas com a resina acrílica Eukitt (Sigma Aldrich).

5.6 Caracterização molecular e análise filogenética dos isolados

5.6.1 Extração de DNA

Para tanto, trofozoítos e cistos foram gentilmente raspados do ágar com auxílio de uma alça bacteriológica e homogeneizados em 1 mL de solução de PAGE. Posteriormente, as amostras foram congeladas à -20°C e mantidas até a etapa de extração de DNA.

O DNA genômico foi obtido utilizando o kit de extração de DNA Genomic DNA Purifications Kit (Invitrogen). Ao tubo contendo 200 µl de amostra foi adicionado uma solução de lise (200 µl de solução de lise, 50 µl de EDTA a 0,5 M, 20 µl de Proteinase K) seguido de uma etapa de incubação a 55°C por uma hora, e posteriormente adicionou-se 5 µl de RNase A. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para uma microcoluna em um tubo coletor e centrifugado a 13000 x g por 3 min. O tubo coletor foi substituído e foram adicionados 650 µl de solução de lavagem e posteriormente centrifugados a 13000 x g por 1 min. Essa etapa foi repetida mais três vezes, sendo que na última etapa a centrifugação foi realizada por dois minutos. Após as etapas de lavagem, a microcoluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e foi adicionado 250 µl de água livre de nucleases. Os tubos foram centrifugados a 13000 x g por 1 min, a micro-coluna foi descartada e o DNA eluído foi congelado a -20°C.

5.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional

Para as reações de amplificação pela polimerase (PCR) convencional foi utilizado o alvo molecular (18S) específico para os gêneros *Acanthamoeba*, *Vannella*, *Vermamoeba*, *Naegleria* e *Balamuthia*, descritos na literatura (30, 147; 148; 149, 150), e apresentados na tabela 3. Os primers originalmente descritos para o gênero *Naegleria*, com alvo molecular ITS, também amplifica o gênero *Vahlkampfia* spp.

(151). Por sua vez os primers Na1 e Na2 descritos por Nazar e cols. (2012), amplifica os gêneros *Vannella* spp. e *Vermamoeba* spp. (152).

Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo

AVLs	Sequências	Alvos
<i>Acanthamoeba</i> spp.	JDP1 5'- GGCCAGATCGTTTACCGTGAA-3' JDP2 5'- TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA-3'	SSU-rRNA
<i>Balamuthia mandrillaris</i>	BalamF 5'- CGCATGTATGAAGAAGACCA-3' BalamR 5'- TTACCTATATAATTGTCGTACCA-3'	Mitochondrial SSU-rDNA
<i>Naegleria</i> spp. e <i>Vahlkampfia</i> spp.	NaegGF 5'-GAACCTGCGTAGGGATCATT-3' NaegGR 5'-TTT CTT TTC CTC CCC TTA TTA -3'	ITS
<i>Naegleria fowleri</i>	NaegFI_F 5'- TTCCGAACCCACTCAATAAA – 3' NaegFI_R 5' - TTCCGAACCCCTTAAACCTC – 3'	SSU-rRNA
Universal	LCO- 5'- GCTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' HCO2-5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAA AAATCA-3'	COI
<i>Vannella</i> spp. e <i>Vermamoeba</i> spp.	NA1_F5'-GCTCCAATAGCGTATATTAA-3' NA2_R5'-AGAAAGAGCTATCAATCTGT-3'	SSU-rRNA

O volume da reação para cada alvo foi de 50 µl, contendo: tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl, 0,2 mM de cada nucleotídeo (dNTPs); 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (DNA Platinum polimerase, Invitrogen Life Technologies, USA), 0,04% de albumina de soro bovino (BSA-Sigma Chem. Co. USA) e 3 µL do DNA extraído. As amplificações foram realizadas em 35 ciclos, com uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C/ 1 min, seguido de uma etapa de anelamento de 56°C, 58°C, 60°C e 61°C por / 45 seg, para os gêneros *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia*, *Naegleria* e *Vannella* respectivamente e etapas de extensões por 72°C/ 1 min. Antes do primeiro ciclo, foi realizada uma etapa de desnaturação inicial por 95°C por 5 min e, após o último ciclo, uma etapa de extensão final de 72°C por 7 min. Para o alvo Citocromo oxidase I (COI) foi utilizado na reação 2,5 mM de MgCl₂ e 50°C /30 seg para a temperatura de anelamento. Os ciclos das PCRs foram realizados no equipamento Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA)

Em todas as PCR foi utilizado H₂O MilliQ no lugar do DNA molde como controle negativo. Para *Acanthamoeba* spp., em cada reação foi utilizado um controle positivo, DNA genômico de uma cultura axênica de *Acanthamoeba castelanni* gentilmente

cedida pela Prof Dra. Marilise Brittes Rott da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5.6.3 Detecção do produto amplificado

Para visualização do produto amplificado, foi utilizado gel de agarose a 1,5% em solução de TBE (1,1 M Tris; 0,9 M ácido bórico; 25 mM EDTA, pH 8,3). Em cada corrida foram aplicados ao gel uma mistura contendo: 6 µl do produto amplificado, 2 µl de Gel Red (diluição de 1:500). Como padrão de massa molecular foram aplicados 5 µl de *DNA ladder* – Thermo Scientific, 1 kb, acrescidos a 2 µL de gel red e 2 µL de loading dye. A eletroforese foi realizada em uma cuba de eletroforese a 80 V por 60 min. Os fragmentos amplificados foram visualizados no transiluminador (UV transluminador, Major Science) foram amplificados fragmentos de 500 pares de base para *Acanthamoeba* e 800pb para *Vermamoeba/Vannella*. Posteriormente foram fotodocumentados com câmera digital.

5.6.4 Purificação do produto amplificado e sequenciamento de DNA

Os produtos amplificados pela PCR foram purificados pelo kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Ao microtubo contendo o produto amplificado foi adicionado o mesmo volume de solução de ligação (*Binding solution*). Para algumas amostras utilizamos a estratégia de cortar o fragmento amplificado do gel de agarose, para o processo de purificação. Para tanto, a banda esperada evidenciada no gel de agarose, foi recortada com auxílio de uma espátula metálica e transferidos para um microtubo de 1,5 mL, posteriormente os fragmentos foram pesados, e para cada 10 mg de agarore foram adicionados 10 µL da solução de ligação (*Binding solution*). O tubo contendo o fragmento em solução de ligação foi incubado a 65°C, em um termobloco, até a completa dissolução da agarose, resultando em uma solução homogênea. Tanto o produto amplificado quanto a solução obtida a partir do gel excisado foram transferidos para microcolunas inseridas em tubo coletor, seguida de uma etapa de centrifugação a 13000 x g por 1 min. O material do tubo coletor foi descartado e adicionou-se 700 µl de solução de lavagem à microcoluna, seguida de uma nova etapa de centrifugação a 16000 x g por 5 min. Posteriormente, o microtubo coletor foi substituído e 500 µL da solução de lavagem foram colocados na

microcoluna, que foi novamente centrifugada a 16000 x *g* por 5 min. Para a evaporação total de resíduos de etanol, a microcoluna foi centrifugada por 16000 x *g* por 1 min. Por fim, para eluição do DNA purificado, foi acrescentado 50 µL de água livre de nucleases à microcoluna inserida em um microtubo de 1,5 mL, seguido de uma etapa de centrifugação de 16000 x *g* por 1 min.

O produto amplificado purificado foi submetido a reação de sequenciamento utilizando o kit ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). A corrida eletroforética em capilar foi realizada no sequenciador de DNA automático da AB 3730 (Applied Biosystems, Foster CA, USA), da plataforma de sequenciamento PDTIS/FIOCRUZ.

As sequências nucleotídicas obtidas em forma de eletroferograma foram analisadas no programa *DNASTAR SeqMan* (DNASTAR Inc., Madison, Wis WI) e editadas manualmente para a obtenção das sequências consensos. A busca pela identidade das sequências foi realizada usando a busca no banco de dados público *Genbank* através do alinhamento local utilizando o servidor *BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool)* do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* da Biblioteca Nacional de Medicina do NIH (*National Institute of Health*), Maryland, EUA (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

6. RESULTADOS

Do total de 96 amostras analisadas oriundas de PNHs de cativeiro, 41 (42,7%) foram positivas para amebas de vida livre. Destas, 15 (36,6%) apresentaram trofozoítos com acantopódios e cistos poligonais, morfologia sugestiva de *Acanthamoeba* spp., 14 amostras (34,1%) apresentaram trofozoítos com lobopódios unidirecionais e cistos arredondados. Dez (24,4%) amostras apresentaram ambas as morfologias e destas, duas apresentaram também trofozoítos em forma de leque e formas flutuantes (típicos do gênero *Vannella*). Além disso em três isolados, foram encontradas formas flageladas do gênero *Naegleria*. Duas amostras (4,9%) apresentaram trofozoítos com lobopódios e trofozoítos alongados (sugestivos do gênero *Vermamoeba/Hartmannella*).

Das cinco amostras de *Callithrix* spp., todas foram positivas para AVLs, sendo que duas (40%) apresentavam trofozoítos com acantopódios e cistos poligonais. Num isolado (20%) foi evidenciado trofozoítos com lobopódios e cistos arredondados; duas (40%) apresentavam as duas morfologias e formas flageladas.

Considerando os dois grupos os primatas de cativeiro, e os de vida livre, 46 amostras (45,5%) foram positivas para AVLs, sendo: 17 (36,9%) para *Acanthamoeba* spp., 15 (32,6%) para trofozoítas com lobopódios e 12 (26,1%) amostras mistas e duas amostras (4,4%) mistas (trofozoítas com lobopódios e trofozoítas com morfologia sugestiva de *Vermamoeba* spp.).

Uma grande diversidade de AVLs presentes no trato gastrointestinal de PNHS foi observada em meio de cultura bifásico, ágar-PAGE, acrescido de bactérias (*E. coli*). Com base na avaliação citomorfológica das AVLs, por meio da análise em microscopia de campo claro, foram evidenciados trofozoítos com projeções filamentosas na membrana plasmática em forma de espinhos superficiais, denominados acantapódios, trofozoítos com formato de leque, com formato de “lesma”, trofozoítos flagelados e amebas com formato arbóreo. Além disso, foram visualizados cistos arredondados, uninucleados com ectocistos evidentes, além de cistos com formato regular, poligonais, estrelados, sugestivos do gênero *Acanthamoeba* (Figura 27).

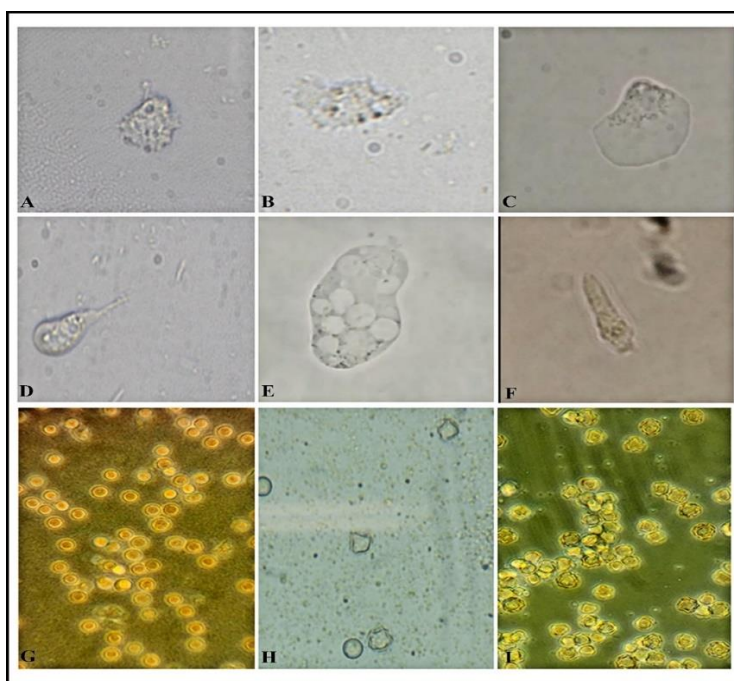


Figura 27: Microscopia óptica evidenciando a diversidade de Amebas de Vida Livre presentes no trato gastrointestinal de primatas não humanos; A e B- trofozoítos apresentando acantopódios, com morfologia sugestiva do gênero *Acanthamoeba*; C- trofozoíto em forma de leque, morfologia sugestiva do gênero *Vannella*; D, E e F-

forma flagelada sugestiva do gênero *Naegleria*; G- cistos arredondados; H- amostra mista apresentando cistos arredondados e poligonais; I- cistos poligonais e estrelado, sugestivos do gênero *Acanthamoeba*. Ampliações de 400x (A, B, C, D, F, G, H, I) e 1000x (E).

A análise das AVLs por meio da microscopia óptica de campo claro permitiu, em tempo real, a observação de processos celulares vitais como: processo de divisão celular, observação dos movimentos amebóides, processo de exflagelação e o movimento do vacúolo contrátil.

Durante a fissão binária simples observamos a presença de núcleos localizados em pólos opostos da célula, a invaginação da membrana, o alongamento da célula até o rompimento celular em duas células filhas (Figura 28). Este processo foi acompanhado em aumento de 400X.

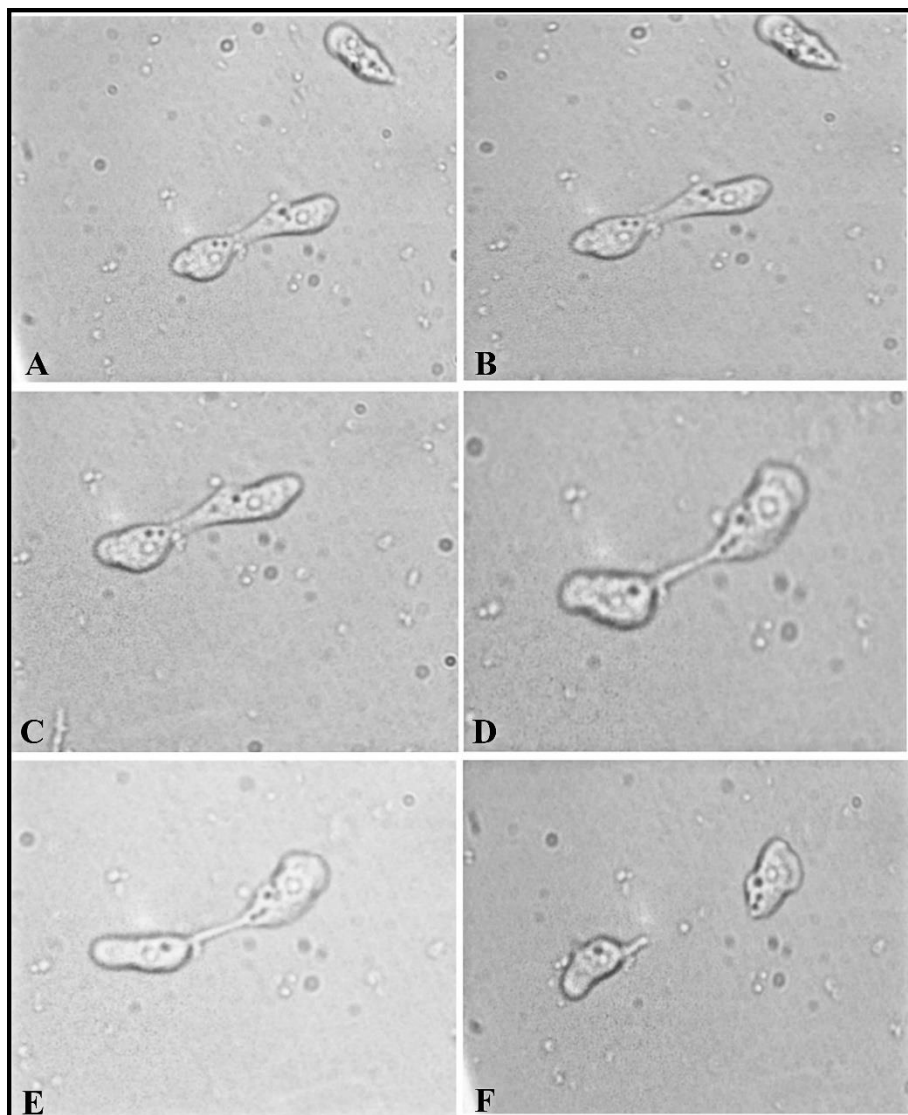


Figura 28: Fotomicrografias ópticas mostrando a forma trofozoítica em processo de divisão celular. Ampliação de 400 x. A, B e C- polarização dos núcleos; D e E- invaginação da membrana citoplasmática; F- final do processo de divisão celular.

Por sua vez, durante a análise microscópica em objetiva de imersão (100 x) foi observada a atividade do vacúolo contrátil no citoplasma de uma AVL. Essa organela é responsável pela osmorregulação, indicando a hipotonicidade do meio de cultura (Figura 29).

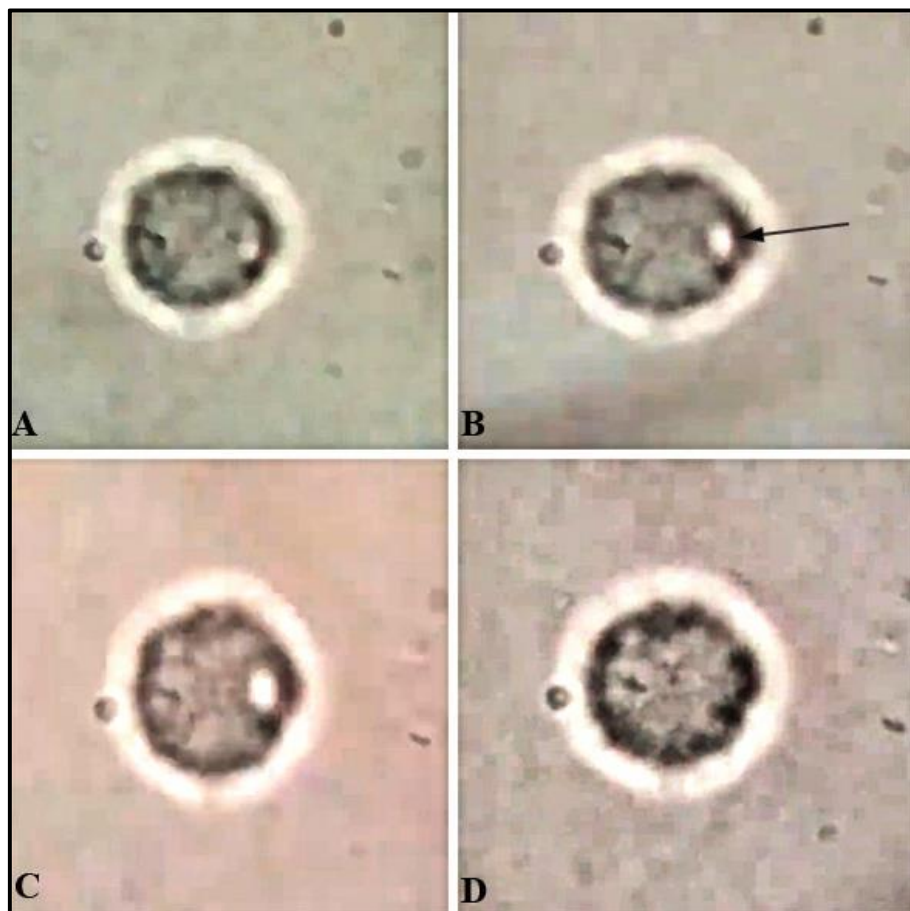


Figura 29: Microscopia óptica direta, em foco formação e contração do vacúolo contrátil de uma Ameba de Vida Livre. A seta indica o vacúolo contrátil. A e B: início da abertura do vacúolo; C: vacúolo totalmente aberto; D: vacúolo fechado. Ampliação de 1000 x.

O processo de exflagelação, uma particularidade exclusiva do gênero *Naegleria* foi observada logo após a emissão de pseudópodes seguida da liberação e emissão de dois flagelos (Figura 30).

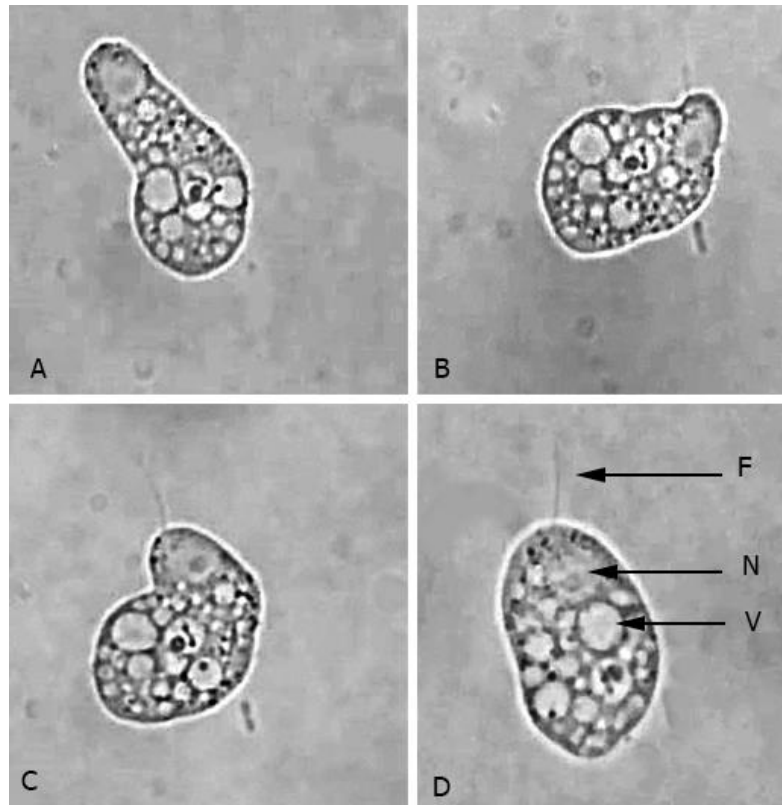


Figura 30: Microscopia óptica de campo claro mostrando trofozoíto de *Naegleria* spp. **(A)** trofozoíto; **(B e C)** trofozoítos com flagelos; **(D)** trofozoíto com formato elíptico e apresentando flagelo mais alongado. F- flagelo; N- núcleo; e V vacúolo. Ampliação de 1000x

Por sua vez, a análise microscópica usando contraste de fase possibilitou uma maior contrastação da citomorfologia das AVLs. Principalmente a nitidez dos acantopódios (Figura 31- A e B) quando comparado com a microscopia óptica de campo claro (figura 31- D). Desta forma a microscopia de contraste de fase pode ser uma importante ferramenta de diagnóstico na identificação de gêneros de AVLs.

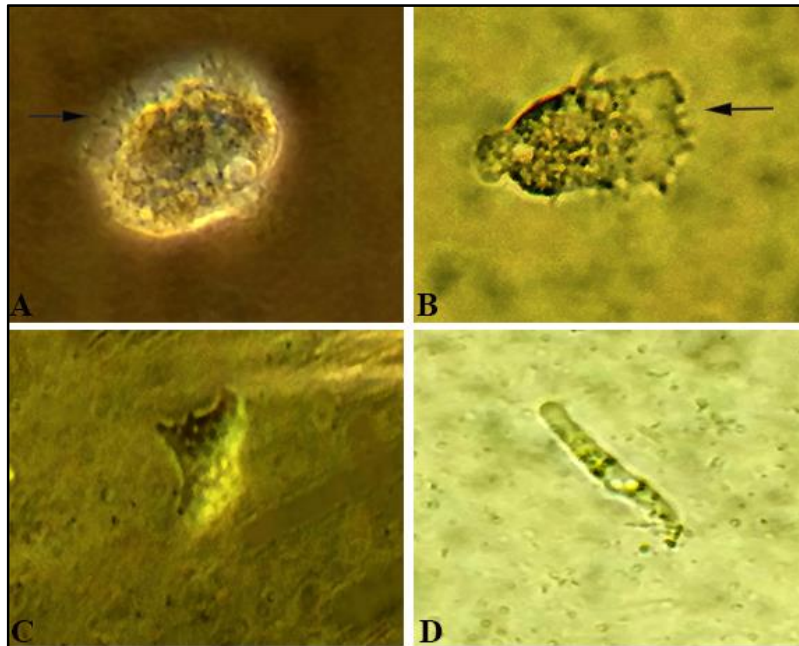


Figura 31: Diferentes formas trofozoítos de Amebas de Vida Livre, isoladas de fezes de primatas não humanos, evidenciadas em microscopia de contraste de fase (A, B e C) e campo claro (D). **A e B-** trofozoítos exibindo acantopódios; **C-** trofozoíto em forma de leque; **D-** célula com fomato alongado. Ampliação de 400x.

Além disso, AVLs com formato arbóreo foram observadas durante a análise microscópica usando contraste diferencial. Inicialmente, essas AVLs foram confundidas com micélios de fungo, pelo seu aspecto, formato e tamanho. Porém, observou-se fagocitose de cistos menores, fluxo de vesículas e prolongamentos citoplasmáticos. Assim como, foi possível perceber uma movimentação lenta e a formação de pseudópodes (Figura 32).

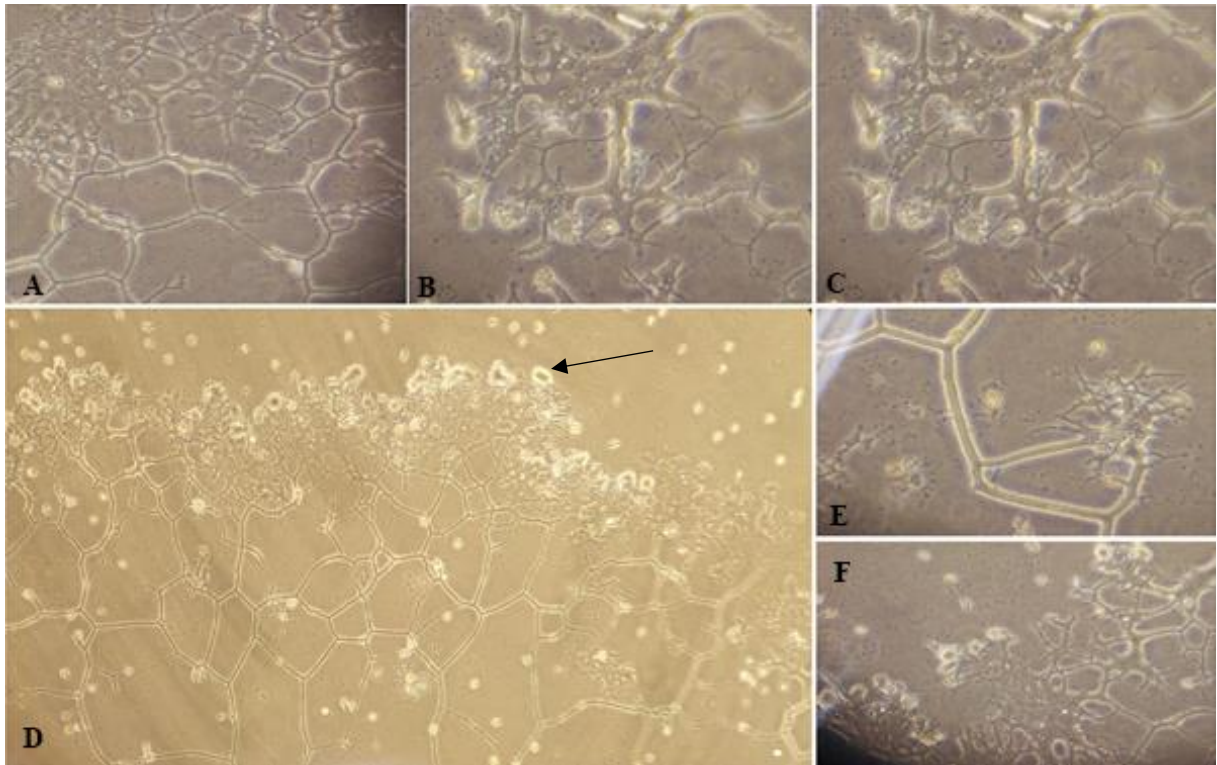


Figura 32: Microscopia óptica evidenciando amebas com formato arbóreo, fagocitando cistos de outras amebas, indicados pela seta. Aumento de 200 (D) e 400X (A, B, C, E e F).

A microscopia de luz usando contraste de fase facilitou a identificação de cistos de AVLs. Foram observados cistos arredondados com ectocisto hialino e refringente em relação ao endocisto. Todavia, não foi possível sugerir o gênero através da morfologia destes cistos, pois *Naegleria* spp., *Vannella* spp., *Vermamoeba* spp. e algumas espécies de *Acanthamoeba*, apresentam cistos arredondados. Além disso, foram observados cistos poligonais, e estrelados, sugestivos do gênero *Acanthamoeba* (Figura 33).

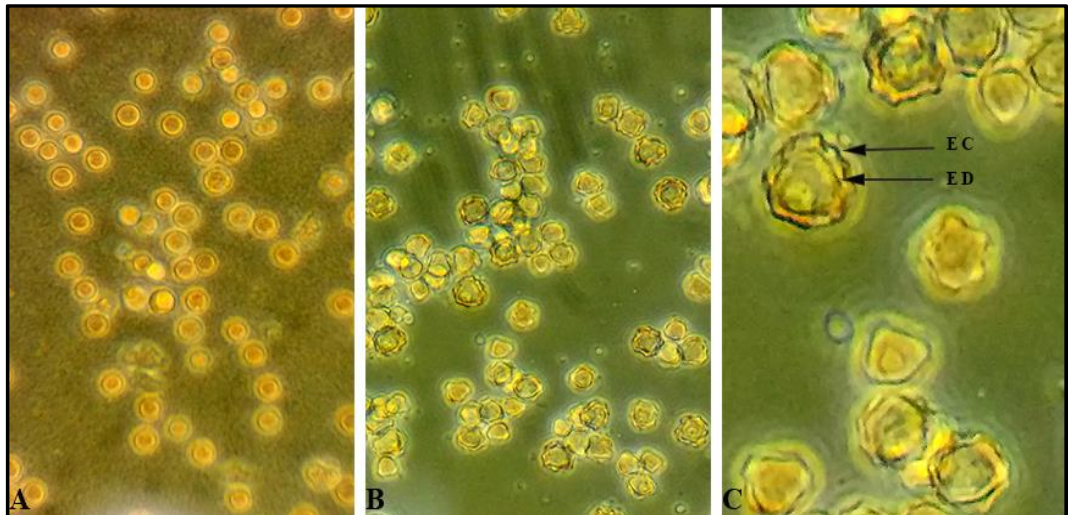


Figura 33: Formas císticas encontradas nas amostras de fezes de primatas não humanos evidenciados por DIC. A- cistos arredondados; B- cistos poligonais e estrelado, sugestivos do gênero *Acanthamoeba*; C- Ectocisto (EC) e endocisto (ED). Ampliação de 400 x.

Não foi possível realizar axenizações das amostras obtidas quando utilizamos HCl, antifúngicos, filtração em membrana para a eliminação de fungos nas amostras. Quando analisamos as culturas no microscópio de luz após sucessivas etapas de lavagens, não foi observada a presença de fungos. Todavia, após a excisão de um fragmento do ágar visualmente sem fungos, houve crescimento exacerbado do contaminante nos meios PYG e meio Nelson. Por sua vez, as bactérias presentes nas amostras foram eliminadas utilizando (22 mg/50 µL) do antibiótico de piperacilina/tazobactan.

6.1 Técnica de coloração de Giemsa

Em relação as técnicas de coloração utilizadas, os melhores resultados obtidos foram observados com a coloração de Giemsa quando utilizamos a fixação com metanol absoluto, por 5 min e a concentração do corante de 1/50 por 20 min para os trofozoítos e de 1/100 por 10 min, para os cistos.

Através da coloração com Giemsa, as amostras que apresentavam trofozoítos com projeções do tipo acantopódios, observou-se a retração dos acantopódios e arredondamento das células. O mesmo resultado foi observado quando utilizamos os fixadores formaldeído e Schaudinn. Por sua vez, obteve-se uma contrastação das

estruturas internas dos trofozoítos, sendo possível identificar o núcleo, vacúolos digestivos e granulações citoplasmáticas. Essa coloração contrastou o núcleo das formas flageladas. Entretanto a diferenciação cromática entre o citoplasma e o núcleo, não ficou muito evidente; ambos apresentaram coloração róseo (Figura 34).

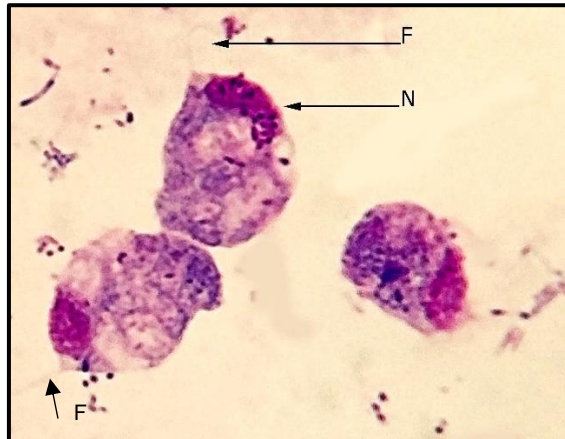


Figura 34: Formas flageladas coradas pelo Giemsa. F- flagelo; N- núcleo. Aumento de 1000 x.

Trofozoítos do gênero *Vannella*, corados pelo Giemsa, apresentaram boa contrastação, sendo possível visualizar o núcleo celular, granulações, projeções citoplasmáticas e vacúolos. O citoplasma apresentou coloração rósea (por afinidade com pigmentos ácidos do corante) e o núcleo em tom roxo claro ou escuro (afinidade com pigmentos básicos). Através do Giemsa, foi possível observar formas flutuantes de *Vannella* spp., aderidas à lâmina e os trofozoítos em “forma de Leque”, na qual evidenciamos o núcleo (Figura 35).

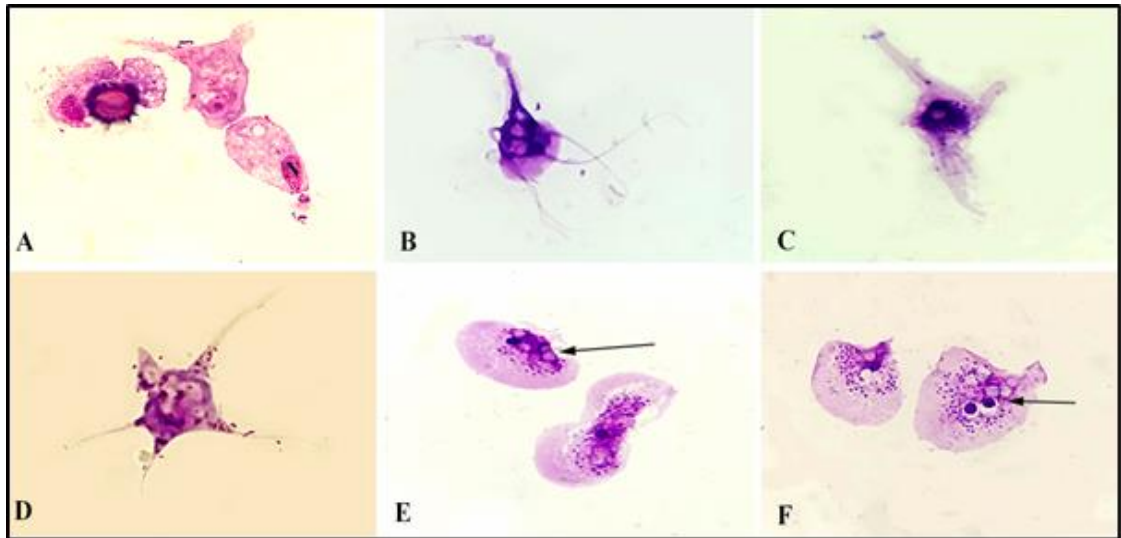


Figura 35: Trofozoítos com morfologia sugestiva do gênero *Vannella* spp. corados pelo Giemsa, aumento de 1000 x. A, B, C e D são formas flutuantes de *Vannella* spp, e E e F são trofozoítos em forma de leque, as setas indicam o núcleo.

Por meio da coloração de Giemsa foi possível evidenciar as estruturas das formas flageladas, onde observamos uma contrastação do núcleo, vacúolos e flagelos. O processo de exflagelação foi acompanhado quando utilizamos o sobrenadante e a raspagem do ágar-PAGE do isolado. Desta forma, trofozoítos em diversos estágios de exflagelação (figura 36) foram fotografados. Os trofozoítos arredondados (figura 36-A) começam a externalizar os flagelos e posteriormente assumem um formato mais alongado (Figura 36-I).

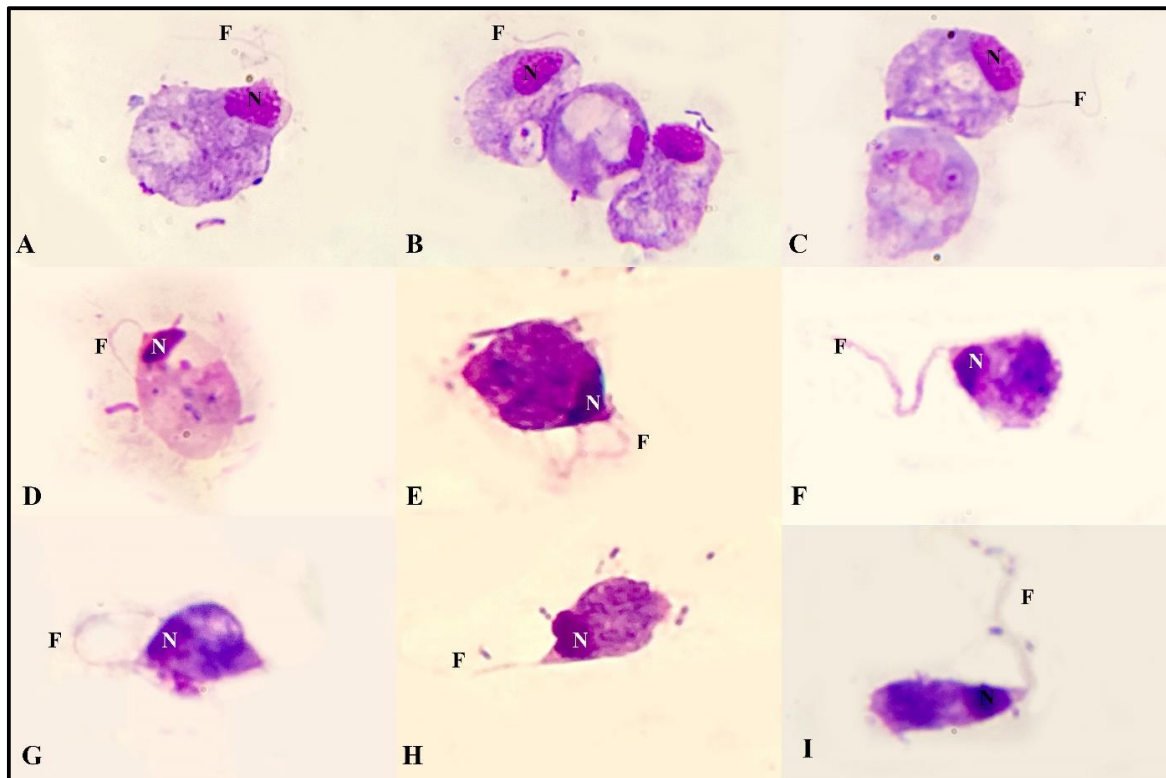


Figura 36: Microscopia óptica mostrando trofozoítos sugestivos do gênero *Naegleria*, em diferentes estágios de exflagelação, corados pelo Giemsa. Ampliação de 1000 x. N representa o núcleo celular; F = flagelo.

Em outras preparações, quando utilizamos a coloração de Giemsa, observamos trofozoítos que não apresentaram uma morfologia sugestiva a nível de gênero, evidenciamos apenas o núcleo e vacúolos citoplasmáticos (Figura 37).

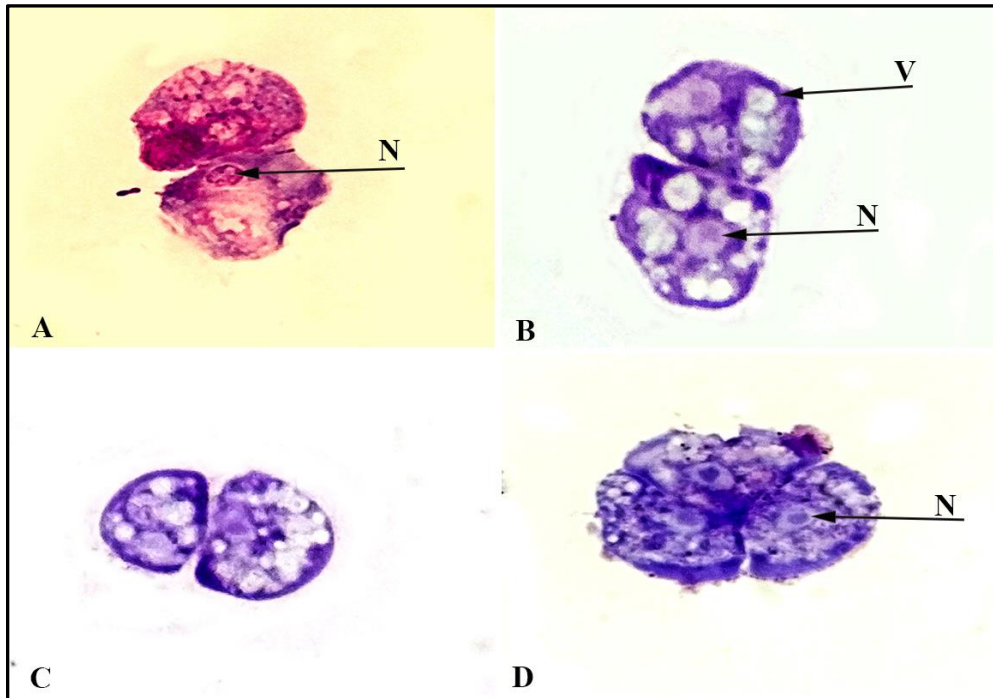


Figura 37: Trofozoítos de AVLs corados pelo Giemsa. A, B e C- *M. mulatta*; D- *S. sciureus*. N corresponde ao núcleo e V ao vacúolo.

Os cistos apresentaram maior afinidade pelo Giemsa, em relação aos trofozoítos e os melhores resultados foram obtidos com a diluição de 1/100 por 10 minutos (figura 38-B). A diluição de 1/100 por 5 minutos promoveu baixa contrastação entre o endocisto e ectocisto (figura 38-A) e a concentração de 1/50 por 20 mim ocasionou a hipercoloração dos cistos (figura 38-C).

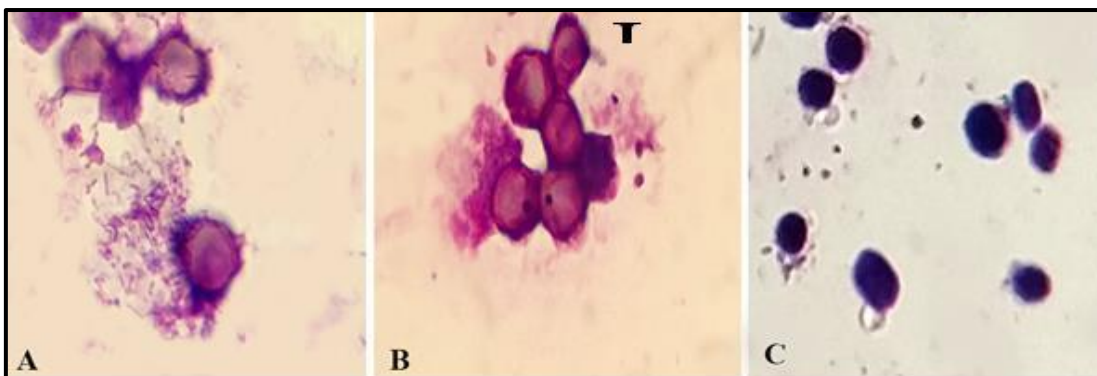


Figura 38: Cistos de Amebas de Vida Livre corados pelo Giemsa. **A-** cistos poligonais corados com Giemsa a 1/100 por 5 mim; **B-** cistos poligonais corados com Giemsa a 1/100 por 10 min; **C-** cistos arredondados, corados pelo Giemsa, diluição de 1/50. Ampliação de 1000 x.

6.1.2 Coloração pela Técnica de Panótico®

Para a técnica comercial Panótico, o melhor tempo de coloração foi de um segundo no fixador (solução 1), 10 segundos no corante basófilo (solução 2) e um segundo no corante acidófilo (solução 3). Tempos maiores de exposição às soluções, geraram imagens hipercoradas, não podendo distinguir o núcleo e o citoplasma.

A técnica apresentou boa contrastação das estruturas celulares: núcleo, citoplasma e vacúolos. Além disso, observamos uma maior diferenciação entre o citoplasma e o núcleo das formas trofozoíticas quando comparado com a coloração de Giemsa (Figura 39). A imagem da figura 39 representa uma célula amebóide corada pelo Panótico mostrando a diferenciação cromática entre núcleo impregnado pelo corante basófilo (róseo), citoplasma impregnado pelos dois corantes, proporcionando uma coloração violeta e o citoplasma onde se forma o pseudópode, com afinidade pelo corante acidófilo assumindo uma coloração azulada (indicada pela seta).

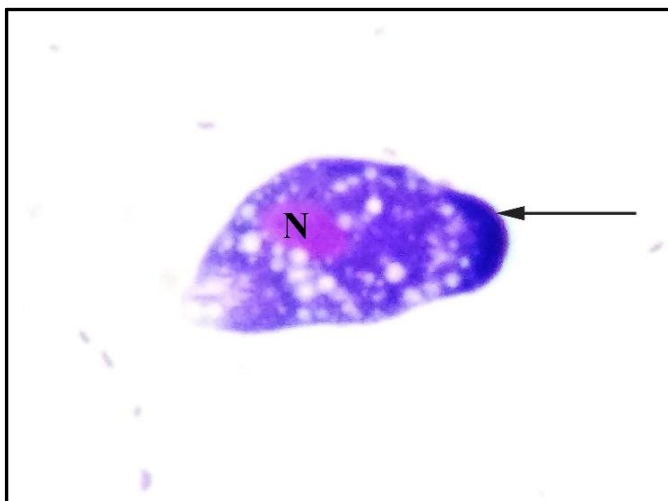


Figura 39: Microfotografia de trofozoíto de AVL corado pela técnica de Panótico com ampliação de 1000 X. A seta indica hialoplasma corado pelo corante acidófilo (azul) e N corresponde ao núcleo.

A coloração mostrou-se eficiente para trofozoítos sugestivos do gênero *Acanthamoeba* spp., sendo possível evidenciar os acantopódios, núcleo e vacúolos (Figura 40), o citoplasma apresentou afinidade por ambos os corantes, apresentando

um tom violeta e o núcleo apresentou maior afinidade pelo corante acidófilo, apresentando um tom roxo.

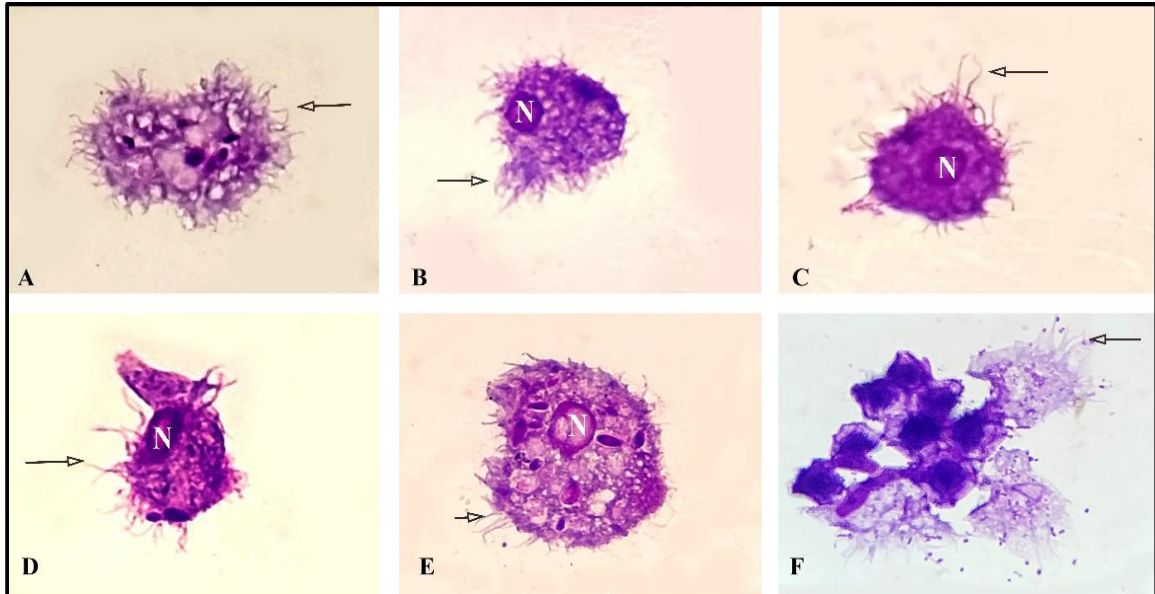


Figura 40: Trofozoítos com morfologia sugestiva do gênero *Acanthamoeba*, corados pelo Panótico e ampliados em 1000 X. A, B, C, D e E formas trofozoítas e F cistos e trofozoítas. As setas indicam os acantopódios e N representa o núcleo.

Os trofozoítos sugestivos do gênero *Vannella* spp., quando corados pelo Panótico, apresentaram boa contrastação do núcleo e foi possível observar granulações no interior das células. No entanto apresentaram coloração monocromática, com afinidade pelo corante acidófilo, desta forma as células apresentaram tonalidade azulada, tanto o núcleo, quanto o citoplasma (Figura 41).

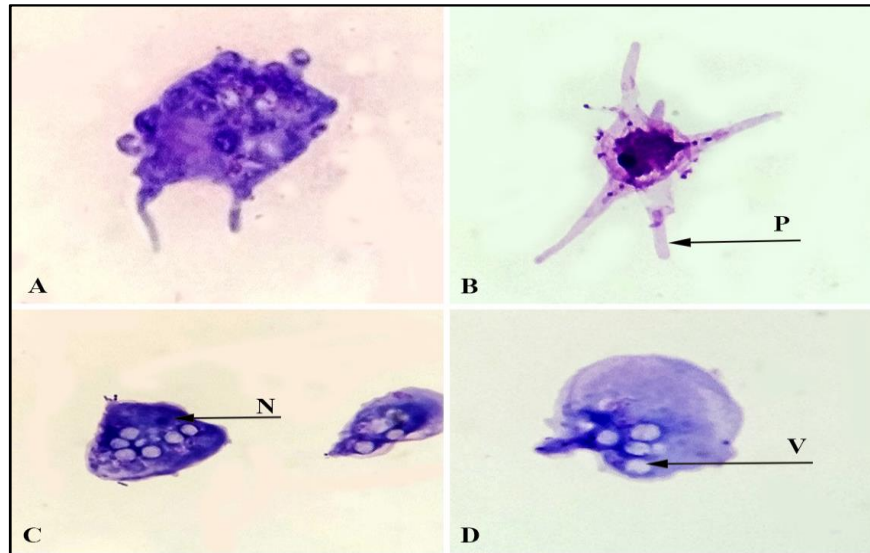


Figura 41: Formas flutuantes (A e B) e trofozoítos em forma de leque (C e D) com morfologia sugestiva de *Vannella* spp., corados pelo Panótico ampliadas em 1000 X; N representa o núcleo celular; V o vacúolo e P as projeções citoplasmáticas.

Algumas amostras apresentaram trofozoítos em formato de gota, com lobopódios unidirecionais, com um núcleo e um vacúolo contrátil grande, estas formas são sugestivas dos gêneros: *Vahlkampfia*; *Saccamoeba* e *Naegleria* spp., não sendo possível distinguir pela morfologia. A figura 42 mostra os tipos de amebídeos encontrados nas amostras de fezes de PHNs corados pelo Panótico.

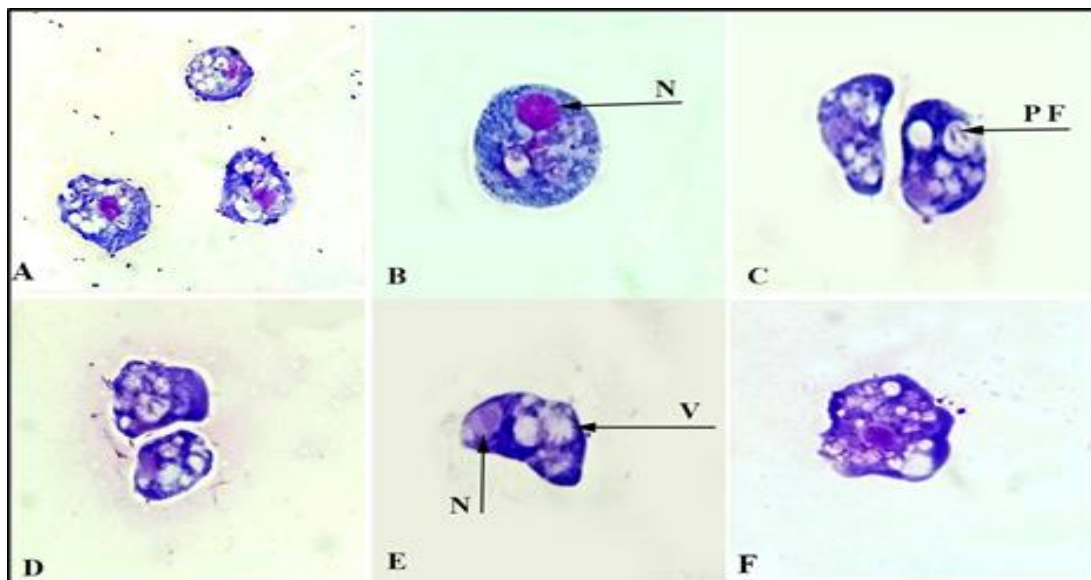


Figura 42: Diferentes morfologias das Amebas de Vida Livre encontradas nas amostras de fezes de Primatas Não Humanos. A, B, D e E- *M. mulatta*; F- *S. Sciureus*. N representa o núcleo, V o vacúolo e PF partículas fagocitadas. Ampliação de 1000 X.

A coloração pela técnica de Panótico®, contrastou o endocisto e o ectocisto da forma cística e ainda o núcleo celular. O endocisto apresentou afinidade pelos corantes acidófilos assumindo uma tonalidade azulada, enquanto o ectocisto apresentou maior afinidade pelo corante basófilo assumindo uma coloração mais hialina e rósea. A forma flagelada, por sua vez, não apresentou bom resultado, havendo uma baixa contrastação das estruturas internas, não sendo possível identificar o núcleo celular. A figura 43 ilustra as formas císticas e as formas flageladas, coradas pelo Panótico.

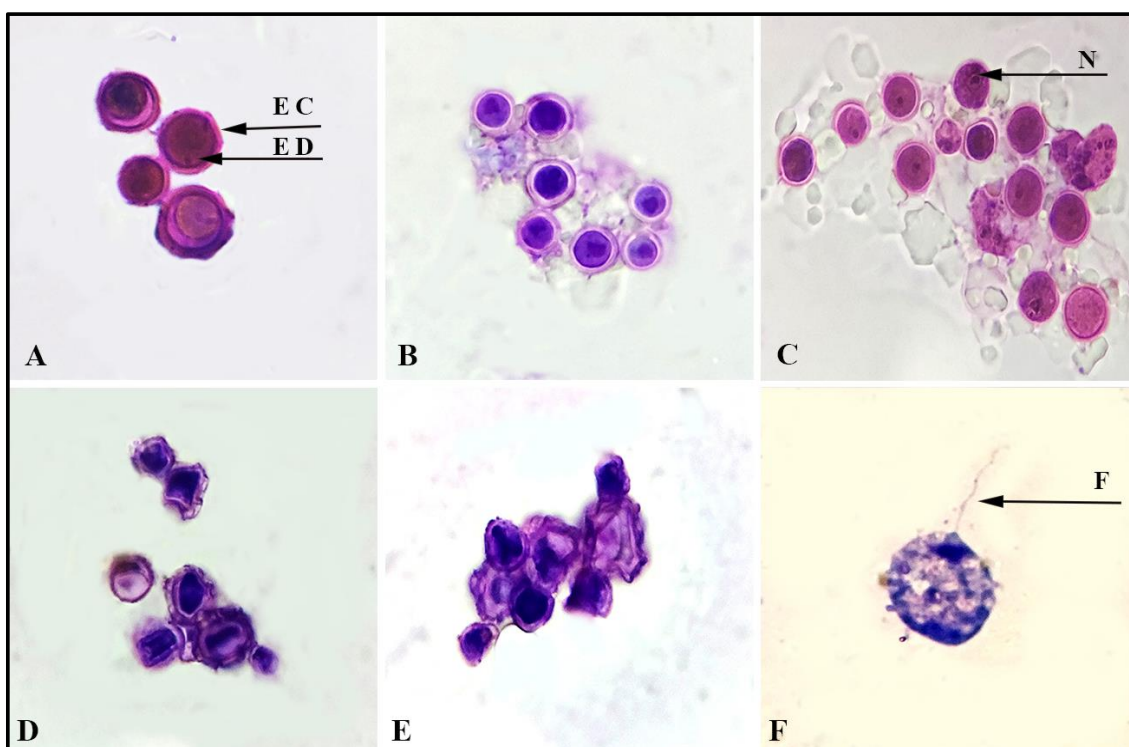


Figura 43: Formas císticas e flageladas de AVLs, encontradas nas amostras de fezes de primatas não humanos, coradas pelo Panótico. A, B e C representam cistos arredondados. A figura D e E são cistos poligonais sugestivos do gênero *Acanthamoeba*; F- representa a forma flagelada. Ampliação de 1000 X.

6.1.3 Coloração pela técnica de Tricrômio de Masson

As AVLs coradas pela técnica de Tricrômio de Masson apresentaram coloração avermelhada, contrastando com a tonalidade esverdeada dos vacúolos alimentares; outras células apresentaram coloração azulada e os vacúolos em verde. A coloração evidenciou o citoplasma e os vacúolos, porém não demarcou o núcleo celular (Figura 44).

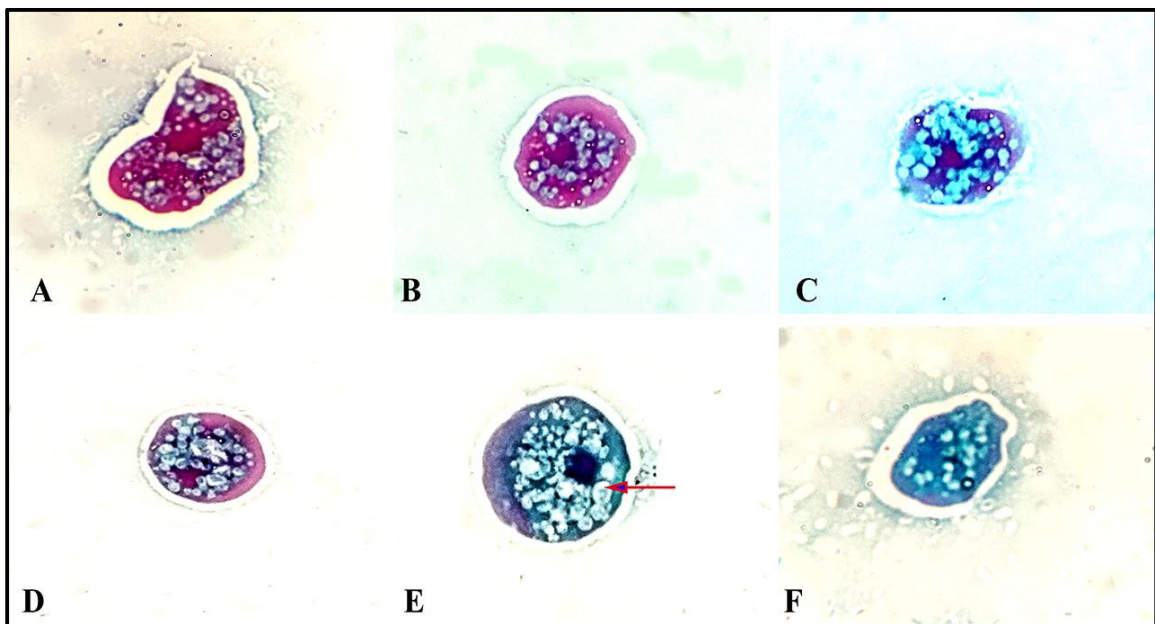


Figura 44: Principais formas morfológicas de trofozoítos de AVLs isolados das fezes de primatas não humanos; A, B, C, D, E e F correspondem a trofozoítos sem morfologia sugestiva de gênero. Ampliação de 1000 X.

Para as formas císticas, a coloração apresentou boa contrastação entre o endocisto e o ectocisto. Nos cistos arredondados, o endocisto apresentou tonalidade avermelhada e ectocisto levemente mais escuro, houve a formação de um halo esverdeado (Figura 45 A), ao redor do cisto, não sendo possível identificar se são proteínas secretadas pela célula ou artefato da coloração, isso foi observado em todos os cistos arredondados. O núcleo celular foi destacado com pouco contraste. Nos cistos poligonais, o ectocisto apresentou tonalidade verde, enquanto o endocisto exibiu uma coloração azulada. As formas flageladas apresentaram coloração monocromática esverdeada, não foi possível contrastar o núcleo; os flagelos, por sua

vez, foram bem contrastados, em relação ao Panótico e Giemsa. Na figura 45 observamos as formas císticas e flagelada, corados pelo Tricrômio.

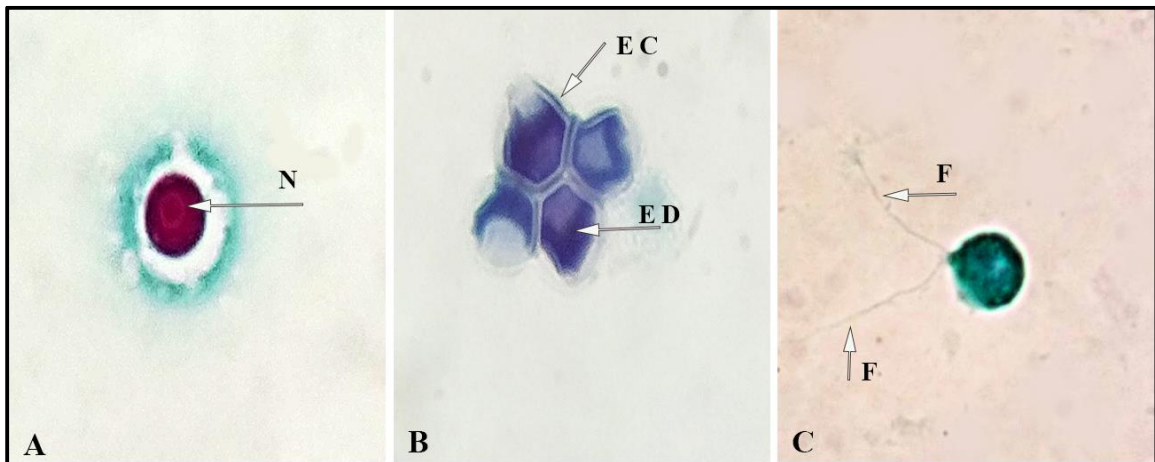


Figura 45: Cistos e flagelados corados pelo Tricrômio de Masson. A- cisto arredondado, encontrado na amostra AG79; B- cistos poligonais referentes a amostra 8117A; C- forma flagelada encontrada em AM41; N- representa o núcleo; EC- o ectocisto; ED- o endocisto; F- o flagelo. Ampliação de 1000 X.

6.2 Caracterização molecular dos isolados

Do total de 46 amostras positivas para AVLs de PNHs de cativo e vida livre, em cultivo em ágar PAGE, 36 foram submetidas a amplificação de DNA por meio da PCR. Destas, 28 (77,8%) foram PCR positivas para *Acanthamoeba* spp. amplificando um fragmento esperado de aproximadamente 500 pb do gene 18S rRNA (figura 46). 10 amostras não foram testadas devido ao crescimento exacerbado de fungos.

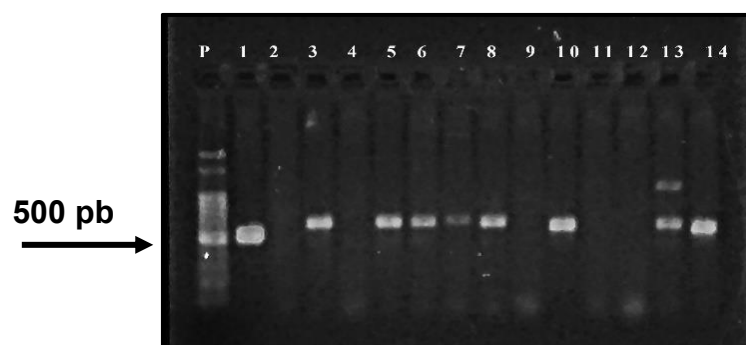


Figura 46: Gel de agarose a 1,5% mostrando o produto amplificado empregando os iniciadores JPD1/JPD2 para o gênero *Acanthamoeba*. P- padrão de massa molecular de 100 pb; 1 e 14- controles positivos; 2 a 10, 12 e 13 - amostras; 11- branco.

Das 36 amostras avaliadas na PCR, 33 (91,7%) amostras foram amplificadas para os gêneros *Vermamoeba* spp. e *Vannella* spp. (figura 47). Em algumas amostras é possível visualizar bandas duplas, o que sugere infecção mista.

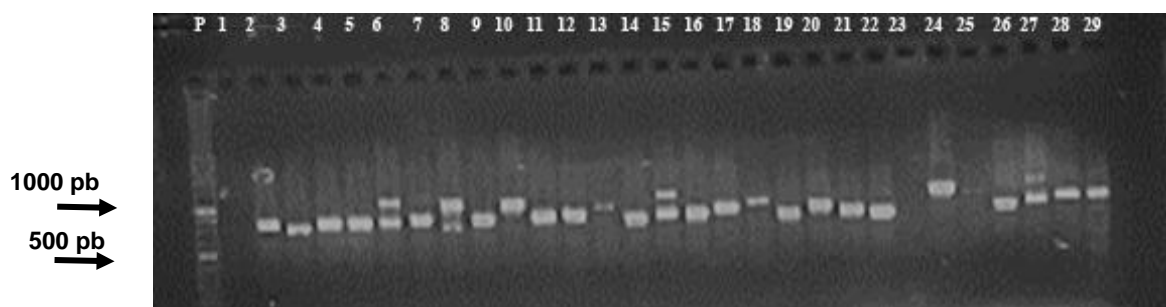


Figura 47: Gel de agarose a 1,5% mostrando o produto amplificado empregando o par de iniciadores NA1/ NA2 – *Vermamoeba* spp. / *Vannella* spp. P- padrão de massa molecular; 1: Branco da reação; 2 -29: amostras.

Observamos a presença de infecção mistas em 25 (69,4%) amostras; houve amplificação de DNA de *Acanthamoeba* spp. e *Vermamoeba* spp. / *Vannella* spp. Em contrapartida, não houve amplificação de DNA para *Naegleria/Vahlkampfia* e *B. mandrillaris* utilizando os respectivos oligonucleotídeos iniciadores para os alvos ITS, SSu-rDNA e COI.

Das 28 amostras positivas para *Acanthamoeba* spp., 19 foram sequenciadas e por meio da ferramenta BLAST identificamos o genótipo T4 em quatro amostras [(AM41, AG66, AH51 e AM6) (Anexo1)] com percentuais de idêntidades entre 99%-100% (NK713911, MT378247, MT378246, MF197422, MF100900, MT378235). Além destas, em oito amostras obtivemos sequências curtas. As demais amostras apresentaram um padrão no eletroferograma compatível com infecção mista (picos duplos), sendo necessário a clonagem molecular para a identificação ao nível de espécie e/ou genótipos. Por sua vez, os produtos amplificados pelos iniciadores NA1/NA2 foram sequenciados, todavia, somente uma sequência (anexo 2) referente a amostra AM4 foi identificada como *Vermamoeba vermiformis* com percentuais de identidade pela ferramenta BLAST de 99,50% com outras sequências depositadas no Genbank sobre número de acesso (KX856374.1, KP792393.1, MN238712.1). As sequências obtidas a partir das amostras AC24, AF54, AN26 apresentaram elevados

percentuais de identidade (97%-100%) com sequências de clone de amostras não cultiváveis depositadas no genbank (GU290115, KY355605).

Os resultados obtidos por meio das análises morfológicas e das detecções de DNA para os gêneros *Acanthamoeba* spp., *Vermamoeba* spp. e *Vannella* spp. estão sumarizados na tabela abaixo (quadro 1).

Quadro 1: Resultados obtidos nas análises morfológicas e moleculares

ID	Características morfológicas	<i>Acanthamoeba</i> spp. PCR/Sequenciamento	<i>Vermamoeba/Vannella</i> PCR/Sequenciamento
<i>Callithrix</i> sp. amostras de fezes			
FMA100	Lob	Positivo	Positivo
FMA95	Acant, Lob, Fla	Positivo	Positivo
FMA96	Acant, Lob, Fla	Positivo	Positivo
FMA98	Acant	NR	NR
FMA99	Acant	Positivo	NR
<i>M. mulatta</i> amostras de fezes (recintos)			
8117 ^a	Acant, Lob*	NR/NR	NR
<u>AE112</u>	Acant	Positivo	Positivo
<u>AE79</u>	Acant	Positivo	Positivo
AF110	Acant	NR/NR	NR
AF54	Acant	Positivo	Positivo
<u>AG161</u>	Acant	Positivo	Positivo
<u>AH51</u>	Acant	Positivo/ Genótipo T4	Positivo
<u>AL44</u>	Acant	Positivo	Positivo
<u>AM4</u>	Acant	Positivo	Positivo/ <i>V. vermiformis</i>
<u>AM6</u>	Acant	Positivo/ Genótipo T4	Positivo
<u>AM41</u>	Acant, FA, Fla, Lob, Van*	Positivo/ Genótipo T4	Positivo
<u>AC24</u>	Acant, Lob*	Positivo	NEGATIVO
<u>AG66</u>	Acant, Lob*	Positivo / Genótipo T4	Positivo
<u>AG79</u>	Acant, Lob*	Positivo	Positivo
AJ22	Acant, Lob*	Positivo	Positivo
<u>AN23</u>	Acant, Lob*	NEGATIVO	Positivo
<u>AG34</u>	Acant, AR, Fla, Lob*	Positivo	Positivo
AD64	Lob	PF	Positivo
AG44	Lob	NR	NR
<u>AG56</u>	Lob	Positivo	Positivo
AJ30	Lob	NEGATIVO	Positivo
<u>AN22</u>	Lob	Positivo	PF
<u>AN26</u>	Lob	NR	Positivo
<u>AN27</u>	Lob	NEGATIVO	Positivo
AO12	Lob	NEGATIVO	Positivo

AJ24	Acant, Fla, Lob, Van*	Positivo	Positivo
<i>M. mulatta</i> (amostras de lavado retal)			
AE38	Lob e Ver*	NEGATIVO	NEGATIVO
AG137	Acant	Positivo	Positivo
AH70	Acant	NR	NR
N50	Acant	Positivo	Positivo
AL41	Acant, Lob*	NR	NR
AO5	Lob	NR	NR
<u>AM30</u>	Lob	PF	Positivo
<i>S. sciureus</i> (amostra de fezes diretamente do recinto)			
232	Acant	PF	Positivo
PB19	Acant	NEGATIVO	Positivo
PB20	Acant	Positivo	Positivo
PB4	Lob, Ver	NR	NR
AB9	Lob	Positivo	NEGATIVO
AC8	Lob	NEGATIVO	Positivo
PD2	Lob	NR	NR
PF38	Lob	NEGATIVO	Positivo

*=Amostra mista; em negrito, as amostras seqüenciadas para *Acanthamoeba* spp.; Sublinhadas as amostras de PNHs que vivem em recintos fechados (sede); Acant; morfologia de *Acanthamoeba* spp. (trofozoítas emitindo acantopódios e cistos com formatos poligonais); FA- Trofozoítas com formato arbóreo; Fla- Formas flageladas (*Naegleria* spp.); Lob: Trofozoítas emitindo lobopódios e cistos arredondados; Van- Morfologia de *Vannella* spp. (Trofozoítas em formato de leque, presença de formas flutuantes e cistos arredondados); Ver: morfologia de *Vermamoeba* spp. (trofozoítas alongados e cistos arredondados). NR- Não realizado; PF- amplificação positiva fraca.

Das 85 amostras de *M. mulatta*, 68 eram de PNHs que viviam em recintos abertos, destas 20 (29,4%) foram positivas para AVLs. 17 amostras são de PNHs que vivem em recintos tipo sede, destas 13 (76,5%) foram positivas para AVLs. Por tanto não houve influência do ambiente, na positividade de AVLs em fezes de PNHs.

7. DISCUSSÃO

O alto percentual de AVLs, encontrados neste trabalho, corrobora dados descritos na literatura. A presença destes protozoários em fezes humanas tem sido demonstrada desde 1984 (153). No ano seguinte de Moura e cols. (1985) demonstraram que amebas do gênero *Acanthamoeba*, isoladas de fezes humanas, foram capazes de infectar camundongos (4). Posteriormente, este achado foi confirmado em 2014, onde foram isoladas amebas do gênero *Vermamoeba* spp. de fezes humanas (154). Não somente, diversos estudos mostram que estes amebídeos podem ser isolados de fezes de diferentes espécies animais, tais como suínos (155), morcegos (156), esquilos selvagens (157) e até pinguins-reis (158).

O trabalho realizado por Chavatte e cols em 2016 (155), foi de suma importância para a compreensão da colonização do intestino de suínos por AVLs, demonstrando que as diferentes porções do tecido do trato gastrointestinal apresentavam vários gêneros de AVLs. O gênero *Acanthamoeba* foi encontrado no estômago e em todo o intestino desde o íleo até o reto. Nas fezes foram encontrados *Acanthamoeba* spp., *Vermamoeba* spp., *Vannella* spp., *Vahlkampfia* spp. e *Vermamoeba vermiformis*. Essa estratificação sugere que alguns amebídeos como *Acanthamoeba*, são capazes de colonizar o trato digestivo de suínos (155). Em comparação, o atual trabalho também encontrou os gêneros *Acanthamoeba* e *Vannella* em fezes de PNHs.

AVLs dos gêneros: *Acanthamoeba* spp., *Copromyxa* spp., *Naegleria* spp., *Sappinia* spp., *Tetramitus* spp., *Thecamoeba* spp., *Vahlkampfia* spp., *Vannella* spp. e *Vermamoeba* spp. foram encontradas em fezes de morcegos (156). Amebas do gênero *Acanthamoeba* spp., foram isoladas do intestino roedores selvagens, na Britânia e na Tunísia (159). Além disso, o mesmo gênero foi também isolado do trato gastro-intestinal de esquilos selvagens das ilhas Canárias e do Marrocos (157). O gênero *Paravahlkampfia* spp. foi isolado de intestino de lagartos em Washington, em 2003 (160). Na Espanha, um trabalho com répteis dos gêneros *Gallotia* e *Tarentola* mostrou a existência de amebas dos gêneros *Acanthamoeba* spp., *Hartmannella* spp., *Naegleria* spp., *Vahlkampfia* spp., e *Vannella* spp., nos intestinos destes répteis (161). *Acanthamoeba* spp. e *Naegleria* spp. também foram isolados do conteúdo intestinal de peixes de água doce, nos Estados Unidos (162). *Acanthamoeba* spp., *Tetramitus* spp., *Naegleria* spp. *Vermamoeba* spp. foram isoladas do intestino de girinos de sapo-

boi, peixes-dourados e tartarugas (163). Todas essas evidências, sugerem que as AVLs possam fazer parte da microbiota intestinal de diferentes hospedeiros.

No atual trabalho demonstramos a presença de diferentes grupos de AVLs, tanto pela morfologia quanto pela amplificação de DNA. Pela morfologia, identificamos os gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Leptomyxa*, *Vannella* e *Vermamoeba/Hartmannella*. Pela PCR, confirmamos a presença de *Acanthamoeba*, pela amplificação com os iniciadores JDP1 e JDP2. Este par de oligonucleotídeos iniciadores é o mais utilizado na literatura (51, 164) e os protocolos são bem estabelecidos. Além disso, a existência de um controle positivo, possibilitou a padronização da PCR para as nossas condições laboratoriais. Quatro, amostras apresentaram bandas claras resultado de uma baixa amplificação, isso pode ser explicado pela presença de inibidores de reação. A reação para *B. mandrillaris*, também é bem descrita na literatura (148), no entanto não houve amplificação em nenhuma das amostras. Para *Naegleria*, normalmente são utilizados os alvos moleculares ITS e SSU-rRNA (149, 151). Todavia, o alvo ITS também é utilizado para *Vahlkampfia* spp. (151). Além deste, o oligonucleotídeo iniciador para Citocromo oxidase universal não amplificou as amostras positivas para *Naegleria* spp. No entanto, não foi possível reproduzir estes resultados, mesmo havendo amostras positivas para *Naegleria* visualizados na microscopia óptica. Desta forma é necessário adquirir cepas ATCC de *Naegleria fowleri* e utilizadas como controle positivo, objetivando padronizar a PCR.

Os iniciadores Na1 e Na2 normalmente são utilizados para *Vermamoeba* spp. (30), mas podem também amplificar DNA de *Vannella* spp. (152). No entanto, a real porcentagem de *Vannella* spp. e *Vermamoeba* spp., não foi verificada pela reação de sequenciamento devido à presença de picos duplos e a obtenção de sequências curtas. Somente uma amostra foi identificada como *Vermamoeba vermiformis*. Por meio da ferramenta BLAST verificamos um percentual de identidade de 99,50% com outras sequências de *V. vermiformis* depositadas no Genbank sobre número de acesso (KX856374.1, KP792393.1, MN238712.1), isoladas de coleções hídricas. Desta forma, para o refinamento dos dados obtidos é necessário a realização da clonagem molecular ou por diluição para que possamos obter uma cultura pura.

Algumas amostras (Dez) não foram testadas pela PCR, devido ao crescimento exacerbado de fungos, que impossibilitou o repique para a placa de extensão. A

alta concentração de fungos e bactérias acarreta a inibição da reação, pela secreção de inibidores da PCR, por esses microorganismos. Por esse motivo, nestas 10 amostras foi realizada apenas a análise morfológica.

O grupo de PNHs mantidos em recintos fechados, com ambiente controlado apresentou uma alta taxa de positividade para AVLs, o que sugere que a contaminação dos PNHs possa ser devido a ingestão de água, ou que esses microorganismos façam parte da microbiota intestinal destes primatas. No entanto, são necessários maiores estudos para averiguar isso.

O isolamento de AVLs em fezes de PNHs é um dado pouco descrito; a maioria dos trabalhos com fezes de primatas concentra os estudos apenas em protozoários patogênicos e comensais tais como: *Giardia* spp., *Balantidium coli*, *Blastocystis* sp, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e complexo *Entamoeba histolytica* (165). Outros estudos relatam a presença de helmintos como *Trichuris* spp. (166). Em 2011, Gunasekera analisou 85 amostras fecais de primatas de diferentes espécies de um zoológico do Sri Lanka, entre elas, *Macaca fuscata* e *Saimiris ciureus*. Os protozoários diagnosticados neste estudo foram: *Balantidium* sp., *Entamoeba coli*, *Giardia* sp., *Blastocystis* sp. e oocistos de coccídios de *Cryptosporidium* sp (167).

Recentemente, um estudo com a metagenômica que analisou 11 espécies de PNHs selvagens (*Propithecus verreauxi*, *Eulemur rufifrons* e *Microcebus murinus* na Floresta de Kirindy, Madagascar; *Pan paniscus* em Kokolopori, República Democrática do Congo; *Gorila gorila gorila* no Parque Nacional Loango, Gabão; *Macaca leonina*, *Macaca assamensis* *Macaca mulatta* no Santuário de Vida Selvagem Phu Khieo, Tailândia; *Cercocebus atys atys* e *Pan troglodytes verus* no Parque Nacional taï, Costa do Marfim; *Macaca sylvanus* na Affenberg Salem) reportou a presença de amebas da família Acanthamoebidae e Vahlkampfiidae em *Macaca sylvanus*, *Macaca mulatta*, *Cercocebus atys atys*, *Macaca assamensis* (168). Para isso foram utilizados três pares de primers universais para Eucariotos, com alvo nas regiões hipervariáveis do gene rRNA 18S.

Apesar da existência de pesquisas com metagenômica mostrando a presença de *Acanthamoeba* no trato gastro-intestinal de PNHs, o isolamento e cultivo de AVLs constitui um novo horizonte, com vários desdobramentos, tanto para as AVLs quanto para os PNHs. Estudos mostram que a interação de *Acanthamoeba* com bactérias, promove o aumento da virulência de algumas bactérias como *Legionella* spp. (169).

Um trabalho com *Cryptococcus neoformans*, mostrou que sua interação com *A. castellani*, promoveu o aumento da virulência deste fungo (170). Outra pesquisa com fungo do gênero *Fusarium* spp. mostrou que sua interação com *Acanthamoeba* foi capaz de aumentar a sobrevivência e a virulência de ambos (171). Além disso, diversos estudos mostram que a interação com *Acanthamoeba*, favorece a ativação de genes de resistência a antibióticos. Em *Campylobacter jejuni*, genes envolvidos na sua resistência à predação por AVLs também são responsáveis pela resistência a antibióticos (172). Deste modo, a interação AVL-microrganismo é um fator de seleção de microrganismos com genótipos virulentos, isso tem um impacto negativo tanto para o homem quanto para outros primatas. Os PNHs que vivem em cativeiro podem desenvolver gastroenterites bacterianas (173) e estas podem ser agravadas pela interação com AVLs no trato gastrointestinal (172), ocasionando dificuldades no tratamento e morte dos animais, acarretando prejuízos para colônias de PNHs.

Embora não sejam descritos casos de infecções a nível intestinal, sabe-se que os PNHs são susceptíveis a infecções por AVLs. Em primatas do gênero *Macacca*, com imunodeficiência viral foi relatado quadros de meningoencefalite e pneumonia por *Acanthamoeba* (174). Considerando que muitos PNHs são utilizados para pesquisas e que o papel das AVLs no microbioma intestinal ainda não está elucidado, há a possibilidade, desses adoecerem em decorrência da ação destes protozoários. Mesmo com todos os cuidados e adoção de diretrizes da boa conduta em utilização de animais de laboratório, o cativeiro por si só constitui um meio estressante, conseqüentemente, favorecendo o aparecimento de doenças nos PNHs (175,176). Portanto, o adoecimento dos animais em decorrência do contato com AVLs, seja pela ação direta no trato digestivo ou pelo contato com fezes contaminadas, não constitui uma utopia e tal possibilidade deve ser considerada.

Por outro lado, o microbioma intestinal destes primatas, pode funcionar como um fator protetor, contra infecções por AVLs. O contato desses protozoários com a mucosa intestinal, pode levar a ativação de células, modulando uma resposta imune do PNH, contra as AVLs. Um estudo conduzido por Carrasco-Yepes e cols (2014), mostrou que ao inocular um lisado de *N. fowleri* juntamente com toxina da cólera, em camundongos, estimulou a produção de IgA e IgG, e essa resposta protegeu os murinos da infecção por *N. fowleri* (177). Outros autores sugerem que infecções a nível de mucosa nasal, por cepas não patogênicas de *N. fowleri* poderiam conferir

imunidade em humanos (178). Sabe-se que o intestino é um dos maiores órgãos do sistema imune; este órgão é frequentemente exposto a antígenos e agentes imunomodulatórios da dieta e da microbiota comensal e é a porta de entrada para muitos patógenos, sua mucosa abriga uma complexa diversidade de células imunes, tais como macrófagos e linfócitos T e B (179). Uma hipótese a ser investigada é se a interação das AVLs com células da resposta imune presentes na mucosa intestinal poderia gerar proteção aos PNHs. Outro questionamento é a possibilidade, dos PNHs serem dispersores de AVLs para o ambiente. Neste estudo mostramos a presença de AVLs em primatas de vida livre (*Callithrix* spp.); além de ser uma evidência que as AVLs fazem parte da microbiota natural de PNHs, há a possibilidade destes animais fazerem a dispersão de AVLs pelo ambiente.

A metagenômica de água de sistemas de irrigação agrícola na Europa mostrou a presença de AVLs, do gênero *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp. e a espécie *Vermamoeba vermiformis*. Desta forma, esses sistemas podem ser meios de dispersão de AVLs, para os alimentos e possível contaminação dos mesmos (180). Isto sugere que a água ou alimentos possam ser a fonte de contaminação do trato gastrointestinal de PNHs. Embora não fizesse parte desta pesquisa, realizamos parcialmente a análise morfológica de 10 amostras de bebedouro dos recintos dos PNHs. Destas, oito foram positivas para os gêneros *Vannella* spp. e *Acanthamoeba* spp.. Possivelmente as amebas encontradas nas fezes, são provenientes da ingestão de água contaminada, no entanto são necessários maiores estudos para averiguar essa possibilidade.

O elevado percentual de *Acanthamoeba* spp., isolados das amostras é compatível com dados da literatura. Este é o gênero mais frequente em fontes de água (14). Saburi e cols. (2017), analisou 236 artigos, destes 38 foram selecionados. Os autores relataram que o gênero *Acanthamoeba* spp. foi o mais prevalente em recursos hídricos (181), sendo o genótipo T4 o mais reportado, seguidos de T5, T2 e T3. No presente estudo, encontramos o genótipo T4 nas fezes dos PNHs. Este genótipo é o mais isolado, tanto em casos de ceratite, quanto EAG (80, 109, 182, 183, 184), o que reforça a importância do presente estudo.

Amebas do gênero *Acanthamoeba* spp. foram isoladas da cavidade oral de pacientes imunossuprimidos de um hospital do Iran, com diagnósticos de hepatite B, Lupus e diabetes e outros em tratamento com esteróides. Neste trabalho, 13,4% das

amostras coletadas foram positivas para *Acanthamoeba* spp. e os isolados pertenciam aos genótipos T3, T4 e T11 (185). No ano seguinte, no mesmo país, esse gênero de AVL, foi novamente isolado da cavidade oral de pacientes submetidos a hemodiálise, em um hospital; 4,8% das amostras foram positivas e as amebas isoladas pertenciam aos genótipos T1 e T4 (186). Em ambos os estudos, o genótipo T4 foi o mais prevalente. Ainda no Iran, *Acanthamoeba* spp. foi isolada da mucosa oral e nasal de pacientes com HIV. Neste estudo, 7,1% das amostras foram positivas para *Acanthamoeba* spp., para os genótipos T4 e T5, sendo o primeiro mais abundante. Além disso, foi encontrada uma cepa de *V. vermiformis* (189).

Em 1985, de Moura e cols. demonstraram que os isolados de *Acanthamoeba* spp. de fezes humanas (N= 16), foram capazes de infectar camundongos, quando instiladas nas fossas nasais. Trofozoítos foram obtidos do tecido cerebral e de outros órgãos dos murinos (4). Neste mesmo trabalho, outros gêneros de AVLS, *Vahlkampfia* spp., *Vermamoeba* spp. e *Echinamoeba* spp. também foram encontrados (4). Embora haja diferenças, existem muitas semelhanças na microbiota de PNHs e humanos (190). Desta forma, as evidências contidas na literatura corroboram os resultados obtidos neste trabalho. *Acanthamoeba* spp. também foi demonstrado em amostras de fezes humanas, coletadas de pacientes internados em um hospital no Paquistão (191).

As amebas com formato arbóreo, encontradas no atual trabalho, provavelmente são pertencentes à família Leptomyxidae, gênero *Leptomyxa*, pois apresentam alta semelhança morfológica com cepas descritas na literatura (91, 98, 192, 193). Este estudo representa a primeira descrição da presença destas AVLS em fezes, embora ainda não tenham sido descritas em material fecal, estas amebas são encontradas em diversas fontes de água (85, 86), solos temperados (86, 87) e até mesmo solo de deserto (86, 88). No entanto, as amebas com formato arbóreo podem ser pertencentes a outros gêneros como *Darbyshirella* spp. (218). Desta forma é necessário realizar sua caracterização molecular, através da PCR e do seqüenciamento de DNA.

Por sua vez, *Vannella* spp. foi citado apenas por Chavatte e cols (2016) em fezes de suínos (155) e, agora em fezes, de PNHs. Este gênero já foi descrito em biofilme (30) e infectando órgãos de peixe (184). Além disso, pode ser reservatório de diversos microrganismos (96, 152, 196). Interessantemente, em um relato de caso, trofozoítos de *Vannella* spp. foram isolados a partir de lentes de contato de uma paciente

diagnosticada com ceratite. Os experimentos mostraram que a ceratite provavelmente foi causada por um endossimbionte existente nos trofozoítos isolados (29).

AVLs do gênero *Vermamoeba* spp. foram isolados em fezes de suínos, por Chavatte e cols, em 2016 (155). Neste estudo identificamos *V. vermiformis* nas fezes de *Macaca mulatta*. Esta AVL predomina em ambientes naturais de água doce e em biofilmes e também pode causar lesões de pele e ceratite em humanos (196).

Além disso, neste estudo obtivemos três sequências (amostras AC24, AF54, AN26) que apresentaram elevados percentuais de identidade (97%-99%) com sequências de clone de amostras não cultiváveis obtidas por meio de estudos metagenômicos de coleção de água.

Trabalhos de morfologia utilizando colorações são escassos na literatura; os poucos estudos nesta área, utilizam contraste de fase. Além disso, ainda hoje a caracterização dos amebídeos é realizada por meio da análise do deslocamento, tipo de pseudópode e uróide (91, 94, 192, 197, 198). A identificação morfológica pelo uróide é difícil e nós não utilizamos este parâmetro para a identificação. Tais estruturas não foram evidenciadas pelas técnicas de coloração, pois na maioria das vezes sua visualização é difícil devido a posição da célula.

Neste trabalho destacamos a importância das colorações de Giemsa, Panótico e Tricrômio para a caracterização morfológica das AVLs. A maioria dos dados de literatura referem-se aos isolados de quadros de ceratite e encefalites amebianas corados pelas colorações de HE, Giemsa e Tricrômio, para evidenciação dos amebídeos nos sítios teciduais da infecção em questão (111, 199, 200, 201, 202, 203).

O isolamento de AVLs em tecidos como cérebro, por exemplo, utiliza a microtomia para a produção de cortes histológicos ultrafinos. A microtomia gera sessões com cerca de 1 a 10 μm , sendo assim muito diferente corar uma célula inteira com média de 20 μm de diâmetro como no caso das AVLs isoladas de fezes. A penetração e difusão do corante é muito divergente nos dois casos.

Imagens de *Acanthamoeba* spp., *B. mandrillaris*, *N. fowleri* e *Sappinia* spp. e protocolos de coloração são disponibilizados no portal do Centers for Diseases Control and Prevention (204). As imagens disponíveis são oriundas de amostras clínicas evidenciadas por contraste de fase, cortes histológicos corados pela HE, pelo Tricrômio (*Naegleria* spp.) e pela coloração de Giemsa (*Acanthamoeba* spp.). No presente estudo, amostras de *Acanthamoeba* spp. apresentaram acantopódios

numerosos ao redor de toda a célula, com núcleo bem evidente e único. Assim como, as formas flageladas apresentaram formato periniforme, com núcleo bem evidente e localizado próximo à região de emergência dos flagelos apresentando morfologias compatíveis com as imagens de *Naegleria* spp. disponibilizadas pelo CDC. Além disso, as formas trofozoítos flageladas apresentaram características morfológicas, muito semelhantes às cepas de *N. fowleri* isoladas em um caso de MAP. Tanto pelo seu formato periniforme e pseudópode unidirecional, quanto pelo tamanho celular e pelo núcleo bem definido, único, localizado de forma não centralizada (205).

Os resultados da coloração de Giemsa foram compatíveis com outros trabalhos. Essa técnica foi utilizada por Ng e cols. em 2017, para avaliar o efeito citopático de cepas de *Acanthamoeba* spp., isoladas de quadros de ceratite. Os resultados obtidos pelos autores são compatíveis com o atual trabalho, ou seja, com boa visualização das estruturas internas, como vacúolos e núcleo. Todavia, em ambos os trabalhos, não foi possível evidenciar os acantopódios (183). No atual trabalho, os cistos por sua vez, tiveram que ser expostos a um tempo menor de coloração, devido à maior impregnação dos pigmentos. Um trabalho realizado por El-Sayed e cols. em 2015 mostrou que a coloração com Giemsa não foi eficiente na contrastação do endocisto e ectocisto de *Acanthamoeba* spp. (206).

Apenas com a coloração Panótico foi possível observar os pseudópodes delgados (acantopódios), característicos dos trofozoítos do gênero *Acanthamoeba* spp. Para as colorações de Giemsa e Tricrômio, os trofozoítos apresentaram um formato arredondado, quando corados. Tal fato foi observado por outro estudo que utilizou diferentes técnicas de microscopia e coloração para detecção de endossimbiontes em *Acanthamoeba* spp. (207). Em contrapartida, Matsui e cols. (2018) observaram acantopódios mesmo após a etapa de coloração com Giemsa. Todavia, quando os autores utilizaram a coloração de HE, não foram evidenciados os acantopódios (111). A retração dos acantopódios pode ser um artefato oriundo da etapa de fixação, entretanto, não existem estudos que comprovem isso. Uma outra explicação é a retração dos acantopódios por conta da formação de pré-cistos durante o processo de secagem da lâmina, antes do processo de fixação com metanol. Os pré-cistos são uma resposta imediata dos trofozoítos a um ambiente não favorável, que é o ressecamento (208). Além disso, a redução da temperatura também promove o arredondamento dos trofozoítos. Em 2011, Ithoi e cols. testaram sete técnicas de

coloração e conseguiram evitar a retração dos acantopódios ao realizarem a secagem das lâminas em câmara úmida a 37°C (209).

Um estudo recente comparou sete diferentes técnicas de coloração, dentre elas o Giemsa e o Tricrômio (210). Neste trabalho, os autores evidenciaram as estruturas celulares de diferentes AVLs em todas as colorações testadas. Comparativamente, o lugol, azul de algodão com lactofenol e o corante Giemsa foram as colorações que apresentaram maior praticidade e menor tempo de execução. Sendo assim, os autores apontaram o Giemsa como uma boa escolha para coloração de amebídeos. Um estudo realizado na África do Sul utilizou o Giemsa para corar amostras de *Acanthamoeba* spp. e os resultados foram semelhantes ao presente estudo (211). O mesmo resultado foi observado por Petry e cols., em 2006 (212).

Apesar da coloração com Panótico ser pouco citada na literatura, os resultados obtidos mostraram que trata-se de uma coloração rápida e eficiente na contrastação do núcleo, citoplasma e vacúolos. Além disso, demonstrou diferenciação cromática entre estas estruturas. Para cisto, esse foi o método de coloração com a melhor contrastação entre o endocisto e o ectocisto. A literatura aponta a coloração de Field como uma boa técnica para caracterização morfológica dos trofozoítos e cistos de AVLs (213). Todavia, apesar de serem diferentes, ambas as colorações têm como base o método de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky (azul de metileno e eosina) e como esperado, resultados semelhantes foram observados. Os resultados do Panótico também são compatíveis com os resultados obtidos na coloração de Field, realizada por Ithoi e cols (209).

Parasitas mantidos em cultivo axênico (culturas puras) são fundamentais para estudos sobre a sua biologia, de interação parasito-hospedeiro, avaliação de terapêuticas, sequenciamento de genoma e análises transcriptômicas e de proteômicas entre outras avaliações. Para tanto, o processo de axenização de parasitos intestinais consiste na eliminação da flora bacteriana e fúngica de maneira gradual num meio cultura rico o suficiente para o seu desenvolvimento para que possamos ao final isolar e cultivar um único microrganismo.

Segundo a literatura após passagens em Ágar-PAGE contendo bactérias mortas, as AVLs podem ser transferidas para o meio axênico (22). No entanto, mesmo após 20 passagens, não conseguimos reproduzir estes resultados, havendo crescimento de fungos e bactérias nos meios ricos. Outros estudos indicam

axenização dos isolados após pré-tratamento com HCl (145,146). No entanto, também não foi possível obter esses resultados, devido a persistência de fungos na amostra.

A axenização pela adição de antifúngicos também não foi eficiente, provavelmente pela presença de fungos resistentes ou baixa concentração de antifúngicos. Baseado no trabalho realizado por Espinel-Ingroff (1998), as concentrações utilizadas por nós, foram ineficientes para eliminar alguns fungos como *Candida glabrata* por exemplo (215). Nesse trabalho utilizamos: 2 µg/mL de fluconazol; 1,6 µg/mL de voriconazol, itraconazol e trefabinina; 0,8 µg/mL de caspafungina e micafungina. Não utilizamos concentrações maiores, pois poderia prejudicar o crescimento dos amebídeos, uma vez que muitos compostos antifúngicos são usados no tratamento nas doenças causadas por AVLs (15, 28, 113, 114, 131) . Segundo estudos anteriores, o fluconazol na concentração de 1 µg/mL pode inibir o desenvolvimento *N. fowleri in vitro* (131, 215). A axenização de AVLs, pós adição de antifúngicos não parece ser um caminho viável.

O papel de AVLs no trato gastrointestinal não está bem elucidado. A presença de AVLs é um processo de colonização ou somente uma passagem por conta da sua resistência ao pH gástrico? Sabemos que esta interação pode levar à doença, por ação direta das AVLs, ou ainda, por meio dos microrganismos endossimbiontes. Em contrapartida a interação pode gerar um fator protetor contra doenças causadas por esses amebídeos, através da ativação do sistema imunológico.

Sabemos que as AVLs desempenham um importante papel, tanto na medicina humana quanto na veterinária. Ainda hoje os estudos sobre esses protozoários são extremamente escassos, principalmente em relação a interação destes microorganismos com o ambiente gastrointestinal. Desta forma, pesquisas futuras com desdobramentos na biologia da AVLs, diagnóstico morfológico e molecular e resposta imune dos hospedeiros são necessários para que possamos entender melhor as AVLs e seu papel na saúde pública e no meio ambiente. Dada a importância médico-veterinária desses protozoários, novos estudos são necessários para a melhor compreensão das doenças causadas pelas AVLs e conseqüentemente, melhorias nos diagnósticos clínicos, laboratoriais e tratamento.

8. CONCLUSÕES

Por meio do cultivo em meio bifásico foi possível isolar uma grande diversidade de AVLS que pela primeira vez, foram descritas no microbioma de PNHS. As AVLS identificadas, *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp. e *Vermamoeba vermiformis* são consideradas anfitriãs e potencialmente carreadoras de microrganismos patogênicos, assim como, *Vannella* spp. Além destas, foi possível identificar a presença de AVL com formato arbóreo nunca descrita em material fecal. Todavia, não obtivemos êxito no processo de axenização dos isolados.

A microscopia óptica com contraste de fase, pode configurar uma importante ferramenta de diagnóstico para os gêneros de AVLS.

A coloração empregando a técnica Panótico® mostrou-se ser mais vantajosa pois é uma técnica simples, rápida e eficiente na identificação, tanto para cistos quanto para trofozoítos quando comparado com a coloração de Giemsa e Tricrômica;

A identificação morfológica facilita a identificação de alguns gêneros de AVL como *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vermamoeba* e *Vannella*. Para os gêneros *Naegleria* e *Balamuthia* não obtivemos êxito com os protocolos das PCRs descritos na literatura. A otimização destes protocolos não possível pela falta de controles padrões;

Por meio do seqüenciamento de DNA dos isolados foi possível identificar a presença de *Acanthamoeba* spp. pertencentes ao genótipo T4 e de *Vermamoeba vermiformis* no trato gastrointestinal sugere que os PNHS podem estar sob risco de adoecerem, visto que estas AVLS apresentam potencial patogênico.

9. PERSPECTIVAS

Ainda hoje os conhecimentos sobre a biodiversidade e a biologia das AVLs são escassos e limitados. Os resultados deste trabalho reforçam a necessidade de estudos futuros sobre a avaliação da biodiversidade, interação das AVLs com enterobactérias patogênicas ou fungos intestinais. Além disso, avaliação *in vitro* da patogenicidade dos isolados e da resposta imunidade, visando esclarecer o potencial patogênico e se o contato desses microrganismos com a mucosa intestinal, pode conferir imunidade aos hospedeiros. Este trabalho constitui o ponto inicial para a criação de um atlas para identificação morfológica das AVLs, o que contribuirá com o diagnóstico laboratorial, das doenças causadas por esses protozoários.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med.* 2018;32:9-25.
- 2- Debenham JJ, Tysnes K, Khunger S, Robertson LJ. Occurrence of *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Entamoeba* in wild rhesus macaques (*Macaca mulatta*) living in urban and semi-rural North-West India. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2017;6: 29-34.
- 3- Garcia LS, Arrowood M, Kokoskin E, Paltridge GP, Pillai DR, Procop GW, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31.
- 4- de Moura H, Salazar HC, Fernandes O, Lisboa DC, de Carvalho FG. Free-living amoeba in the human intestine. Evidences of parasitism. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1985;27: 150-6.
- 5- Bradbury RS. Free-living amoebae recovered from human stool samples in *Strongyloides* agar culture. *J Clin Microbiol.* 2014;52: 699-700.
- 6- McLean J. Developing Methodologies for the Investigation of Free-living Amoeba as a Tool for Pathogen Surveillance on Dairy Farms and Aquaculture. University of Guelph. 2014.
https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/8072/McLean_John_201404_MSc.pdf?sequence=1
- 7- Rusiñol M, Martínez-Puchol S, Timoneda N, Fernández-Cassi X, Pérez-Cataluña A, Fernández-Bravo A, et al. Metagenomic analysis of viruses, bacteria and protozoa in irrigation water. *Int J of Hyg and Environ Health.* 2020; 224: 113440.
- 8- Baldauf SL, Roger AJ, Wenk-Siefert I, Doolittle WF. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science.* 2000;290:972-7.
- 9- Smirnov AV, Chao E, Nassonova ES, Cavalier-Smith T. A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: lobosa). *Protist.* 2011; 162:545-70.
- 10- Fiz-Palacios O, Romeralo M, Ahmadzadeh A, Weststrand S, Ahlberg PE, Baldauf S. Did terrestrial diversification of amoebas (amoebzoa) occur in synchrony with land plants?. *PLoS One.* 2013;8: e74374.
- 11- Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16: 273-307.
- 12- Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol.* 2004; 34:1001-27.
- 13- Rahdar M, Niyati M, Salehi M, Fegghi M, Makvandi M, Pourmehdi M, et al. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from environmental sources in ahvaz city, Khuzestan province, Southern Iran. *Iran J Parasitol.* 2012; 7:22-6.
- 14- Bunsuwansakul C, Mahboob T, Hounkong K, Laohaprapanon S, Chitapornpan S, Jawjit S, et al. *Acanthamoeba* in Southeast Asia - Overview and Challenges. *Korean J Parasitol.* 2019;57: 341-57.
- 15- Kalra SK, Sharma P, Shyam K, Tejan N, Ghoshal U. *Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis. *Exp Parasitol.* 2020; 208: 107788.
- 16- Lamb DC, Warrilow AG, Rolley NJ, Parker JE, Nes WD, Smith SN, et al. Azole Antifungal Agents To Treat the Human Pathogens *Acanthamoeba castellanii*

- and *Acanthamoeba polyphaga* through Inhibition of Sterol 14alpha-Demethylase (CYP51). *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59: 4707-13.
- 17- Carlesso AM, Simonetti AB, Artuso GL, Rott MB. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40: 316-20.
 - 18- Van der Henst C, Vanhove AS, Drebes Dorr NC, Stutzmann S, Stoudmann C, Clerc S, et al. Molecular insights into *Vibrio cholerae*'s intra-amoebal host-pathogen interactions. *Nat Commun.* 2018; 9:3460.
 - 19- Page FC. Taxonomic Criteria for *Limax amoebae*, with Descriptions of 3 New Species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *J Protozool.* 1967b; 14: 499-521.
 - 20- Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. Amoebic infection of the eye. *Lancet.* 1974; 2: 1537-40.
 - 21- Jones DB, Visvesvara GS, Robinson NM. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc U K,* 1975; 95: 221-32.
 - 22- Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30: 564-95.
 - 23- Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors.* 2012; 5:6.
 - 24- Page MA, Mathers WD. *Acanthamoeba* keratitis: a 12-year experience covering a wide spectrum of presentations, diagnoses, and outcomes. *J Ophthalmol.* 2013: 670242.
 - 25- Visvesvara GS. Infections with free-living amoebae. *Handb Clin Neurol.* 2013;114:153-68
 - 26- Derda M, Wojtkowiak-Giera A, Hadas E. Comparative analyses of different genetic markers for the detection of *Acanthamoeba* spp. isolates. *Acta Parasitol.* 2014;59: 472-7.
 - 27- Lasjerdi Z, Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Haghighi A, Taghipour N. Ophthalmology hospital wards contamination to pathogenic free living amoebae in Iran. *Acta Parasitol.* 2015; 60: 417-22.
 - 28- Schuster FL, Visvesvara GS. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat.* 2004; 7:41-51
 - 29- Michel R, Schmid EN, Boker T, Hager DG, Muller KD, Hoffmann R, et al. *Vannella* sp. harboring Microsporidia-like organisms isolated from the contact lens and inflamed eye of a female keratitis patient. *Parasitol Res.* 2000; 86: 514-20.
 - 30- Lasjerdi Z, Niyyati M, Haghighi A, Zaeri F, Nazemalhosseini Mojarad E. First report of vannellidae amoebae (*Vannella* spp.) isolated from biofilm source. *Iran J Parasitol.* 2011; 6: 84-9.
 - 31- Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, Popov V, Borkowski J, Chaljub G, et al. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA.* 2001; 285: 2450-1.
 - 32- Balczun C, Scheid PL. Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance. *Viruses.* 2017;9.
 - 33- Page FC. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J Protozool.*, 1967; 14: 709-24.
 - 34- Castellani A. An amoeba found in culture of yeast: preliminary not. *Am J Trop Med.* 1930;33: 160.
 - 35- Visvesvara GS, Schuster FL. *Opportunistic Free-living Amebae, Part I* (Boston: Clinical Microbiology Newsletter). 2008.

- 36- Visvesvara GS, Schuster FL. *Opportunistic free-living amoebae, Part II* (Boston: Clinical Microbiology Newsletter). 2008.
- 37- Culbertson CG, Smith JW, Cohen HK, Minner JR. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol*. 1959;35: 185-97.
- 38- Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br Med J*. 1965;2: 740-2.
- 39- Jager BV, Stamm WP. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet*. 1972;2: 1343-5.
- 40- Visvesvara GS, Martinez AJ, Schuster FL, Leitch GJ, Wallace SV, Sawyer TK, et al. Leptomyxid amoeba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *J Clin Microbiol*. 1990; 28:2750-6.
- 41- Siddiqui R, Khan NA. *Balamuthia mandrillaris*: Morphology, biology, and virulence. *Trop Parasitol*. 2015; 5: 15-22.
- 42- Visvesvara GS, Schuster FL, Martinez AJ. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J Eukaryot Microbiol*. 1993; 40:504-14.
- 43- Gelman BB, Popov V, Chaljub G, Nader R, Rauf SJ, Nauta HW, et al. Neuropathological and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62: 990-8.
- 44- Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, et al. The Revised Classification of Eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*. 2012; 59(5):429-493
- 45- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol*. 2005; 52:399-451.
- 46- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007; 50:1-26.
- 47- Soares SS, Souza TK, Berte FK, Cantarelli VV, Rott MB. Occurrence of Infected Free-Living Amoebae in Cooling Towers of Southern Brazil. *Curr Microbiol*. 2017; 74:1461-68.
- 48- Zanella JFP. *Acanthamoeba* spp. em Ambientes hospitalares e acadêmicos do Rio Grande do Sul, Brasil. Universidade de Caxias do Sul. 2011.
- 49- Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, et al. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol (Paris)*. 2012; 60:399-405.
- 50- Seal DV. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye (Lond)*. 2003; 17:893-905.
- 51- Gatti S, Rama P, Matuska S, Berrilli F, Cavallero A, Carletti S, et al. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from corneal infections in Italy. *J Med Microbiol*. 2010; 59: 1324-30.
- 52- Sharma S, Garg P, Rao GN. Patient characteristics, diagnosis and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2000; 84:1103-1108.
- 53- Laseke I, Korte J, Lamendella R, Kaneshiro ES, Marciano-Cabral F, Oerther DB. Identification of *Naegleria fowleri* in warm ground water aquifers. *J Environ Qual*. 2010;39: 147-53.
- 54- CDC, Center for Disease Control and Prevention -. 2008. "Primary Amebic Meningoencephalitis --- Arizona, Florida, and Texas, 2007." In *MMWR Weekly: Past Volume*, 573-96.

- 55- Siddiqui R, Khan NA. *Balamuthia* amoebic encephalitis: an emerging disease with fatal consequences. *Microb Pathog.* 2008; 44:89-97.
- 56- Yamanouchi K, Arima H, Sakamoto Y, Kanto K, Kasai K, Ito K, et al. First report of the isolation of *Balamuthia mandrillaris* in the northern region of Japan. *Parasitol Res.* 2018; 117: 2895-900.
- 57- Itoh K, Yagita K, Nozaki T, Katano H, Hasegawa H, Matsuo K, et al. An autopsy case of *Balamuthia mandrillaris* amoebic encephalitis, a rare emerging infectious disease, with a brief review of the cases reported in Japan. *Neuropathol.* 2015;35: 64-9.
- 58- Brasil, Ministério da Saúde. 2019. "Guia de Vigilância em Saúde " In, edited by Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços, 740 p.: Brasília - DF.
- 59- Ferreira, MECSC. Meningoencefalites infecciosas causadas por amebas de vida livre: *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e *Acanthamoeba* spp. Centro Universitário de Brasília - UNICEUB. 2019.
- 60- Alvarenga LS, Freitas D, Hofling-Lima AL. Ceratite por *Acanthamoeba*, *Arq Bras Oftalmol.* 2000; 63:155-59.
- 61- Carvalho FR, Foronda AS, Mannis MJ, Hofling-Lima AL, Belfort Jr. R, de Freitas D. Twenty years of *Acanthamoeba keratitis*. *Cornea.* 2009;28: 516-9.
- 62- Salles-Gomes Jr. CE, Barbosa ER, Nóbrega JPS, Scaff M, Spina-Franca A. Meningoencefalomielite amebiana primária: registro de caso. *Arq Neuropsiquiatr.* 1978; 36:139-42.
- 63- Chimelli L, Hahn MD, Scaravilli F, Wallace S, Visvesvara GS. Granulomatous amoebic encephalitis due to leptomyxid amoebae: report of the first Brazilian case. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992;86: 635.
- 64- Silva-Vergara ML, Da Cunha Colombo ER, De Figueiredo Vissotto E, Silva AC, Chica JE, Etchebehere RM, et al. Disseminated *Balamuthia mandrillaris* amoeba infection in an AIDS patient from Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77:1096-8.
- 65- Frade MTS, de Melo LF, Pessoa CRM, Araújo JL, Figuera RA, Souza AP, et al. Systemic acanthamoebiasis associated with canine distemper in dogs in the semiarid region of Paraíba, Brazil. *Pesq Vet Bras [online].* 2015; 35: 160-64.
- 66- Henker LC, Cruz RAS, Silva FS, Driemeier D, Sonne L, Uzal FA, et al. Meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* in cattle in southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2019;28: 514-17.
- 67- Pimentel LA, Dantas AF, Uzal F, Riet-Correa F. Meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in cattle of northeast Brazil. *Res Vet Sci.* 2012; 93: 811-2.
- 68- Salazar HC, Moura H, Ramos RT. Isolamento de amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. *Rev Saúde Publ São Paulo.* 1982; 16:261-67.
- 69- Silva MA, Rosa JA. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. *Rev Saúde Pública [Internet].* 2003; 37:242-46.
- 70- Magliano ACM. Diversidade de *Acanthamoeba* spp. no Brasil: isolamento, aspectos fisiológicos, genotipagem e relações filogenéticas entre isolados de ambientes e de casos clínicos. Universidade de São Paulo (USP). 2011.
- 71- Alves DSMM, Moraes AS, Nitz N, de Oliveira MGC, Hecht MM, Gurgel-Gonçalves R et al. Occurrence and characterization of *Acanthamoeba* similar to genotypes T4, T5, and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasilia, Federal District, Brazil. *Exp Parasitol.* 2012;131: 239-44.

- 72- Jahangeer M, Mahmood Z, Munir N, Waraich UE, Tahir IM, Akram M, et al. *Naegleria fowleri*: Sources of infection, pathophysiology, diagnosis, and management; a review. *Clin and Exp pharmacol & physiol.* 2020; 47: 199–212.
- 73- Lekkla A, Sutthikornchai C, Bovornkitti S, Sukthana Y. Free-living amoeba contamination in natural hot springs in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005;36 Suppl 4: 5-9.
- 74- Page FC. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae: With Instructions for Culture* (Freshwater Biological Association). 1988.
- 75- Rondanelli EG, Scaglia M. *Atlas of human protozoa* (Milano: Masson). 1993.
- Roy SL, Metzger R, Chen JG, Laham FR, Martin M, Kipper SW, et al. Risk for transmission of *Naegleria fowleri* from solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2014; 14:163-71.
- 76- Castrillon JC, Orozco LP. *Acanthamoeba* spp. as opportunistic pathogens parasites. *Rev Chilena Infectol.* 2013;30: 147-55.
- 77- Chelkha N, Jardot P, Moussaoui I, Levasseur A, La Scola B, Colson P. Core gene-based molecular detection and identification of *Acanthamoeba* species. *Sci Rep.* 2020;10: 1583.
- 78- Wagner C, Reyes-Batlle M, Ysea MA, Perez MV, de Rondon CG, Paduani AJ, et al. Genotyping of clinical isolates of *Acanthamoeba* genus in Venezuela. *Acta Parasitol.* 2016; 61:796-801.
- 79- Corsaro D, Walochnik J, Kohsler M, Rott MB. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res.* 2015;114: 2481-90.
- 80- Behera HS, Satpathy G, Tripathi M. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba meningitis*/meningoencephalitis (AME) patients in India. *Parasit Vectors.* 2016; 9:442.
- 81- Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebas. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15:342-54.
- 82- Dacks JB, Kuru T, Liapounova NA, Gedamu L. Phylogenetic and primary sequence characterization of cathepsin B cysteine proteases from the oxymonad flagellate *Monocercomonoides*. *J Eukaryot Microbiol.* 2008; 55: 9-17.
- 83- Page FC. Marine Gymnamoebae. Institute of Terrestrial Ecology Culture Centre of Algae and Protozoa Cambridge England. 1983.
- 84- Kühn SF. *Rhizamoeba schneppii* sp. nov., a naked amoeba feeding on marine diatoms (North Sea, German Bight). *Arch. Protistenkd.* 1996; 147: 277-282.
- 85- Smirnov A, Nassonova E, Fahrni J, Pawlowski J. *Rhizamoeba neglecta* n. sp. (Amoebozoa, Tubulinea) from the bottom sediments of freshwater Lake Leshevoe (Valamo Island, North-Western Russia), with notes on the phylogeny of the order Leptomyxida. *Europ J Protistol.* 2009; 45:251–259.
- 86- De Obeso Fernandez Del Valle A, Lorenzo-Morales J, Maciver SK. *Leptomyxa valladaresi* n. sp. (Amoebozoa, Tubulinea, Leptomyxida), from Mount Teide, Tenerife, Spain. *Exp Parasitol.* 2017; 183:85-91.
- 87- Brown S, Smirnov AV. Diversity of gymnamoebae in grassland soil in southern Scotland. *Protistol.* 2004; 3:191-195.
- 88- Shmakova LA, Fedorov-Davydov DG, Rivkina EM. The amoeboid protists of cryogenic soils in the Kolyma Lowland. *Eurasian Soil SC.* 2013; 46:1211-1218.
- 89- Bamforth SS. Protozoa of biological soil crusts of a cool desert in Utah. *J Arid Environ.* 2008; 72: 722-729.

- 90- Singh BN. Studies on giant amoeboid organisms 2. Nuclear division and cyst formation in *Leptomyxa reticdata* Goodey with remarks on the systematic position of the organism. *J. Gen. Microbiol.* 1948; 2:89-96.
- 91- Smirnov A, Nasonova E, Geisen S, Bonkowski M, Kudryavtsev A, Berney C, et al. Phylogeny and Systematics of Leptomyxid Amoebae (Amoebozoa, Tubulinea, Leptomyxida). *Protist.* 2017; 168:220–252.
- 92- Wilhelm WE, Anderson JH. *Vahlkampfia lobospinosa* (Craig, 1912) Craig, 1913: Rediscovery of a Coprozoic Ameba. *J Parasitol.* 1971; 115: 241-246
- 93- Aitken D, Hay J, Kinnear FB, Kirkness CM, Lee WR, Seal DV. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *Ophthalmol.* 1996; 103(3):485–494.
- 94- Brown S, De Jonckheere JF. Isolation of a new vahlkampfiid amoeba from soil: *Paravahlkampfia lenta* n. sp. *Europ J of Protistol.* 2004; 40(4): 289–294.
- 95- Hoffmann R, Michel R, Schmid EN, Muller KD. Natural infection with microsporidian organisms (KW19) in *Vannella* spp. (Gymnamoebia) isolated from a domestic tap-water supply. *Parasitol Res.* 1998; 84: 164-6.
- 96- Todd CD, Reyes-Battle M, Valladares B, Lindo JF, Lorenzo-Morales J. Vannellid Species Isolated from Freshwater Source in a Park in Jamaica, West Indies. *Microbiol Insights.* 2015; 8:7-9.
- 97- Bovee EC. An emendation of the amoeba genus *Flabellula* and a description of *Vannella* gen. nov. *Trans Am Microsc Soc.* 1965; 84: 217-27.
- 98- Maciver SK, De Obeso Fernandez Del Valle A, Koutsogiannis Z. *Vannella pentlandii* n. sp., (Amoebozoa, Discosea, Vannellida) a small, cyst-forming soil amoeba. *Exp Parasitol.* 2017; 183:109-16.
- 99- Amaral-Zettler LA, Cole J, Laatsch AD, Nerad TA, Anderson OR, Reysenbach AL. *Vannella epipetala* n. sp. isolated from the leaf surface of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) growing in the dry forest of Costa Rica. *J Eukaryot Microbiol.* 2006; 53:522-30.
- 100- Smirnov AV, Nasonova E, Holzmann M, Pawlowski J. Morphological, ecological and molecular studies of *Vannella simplex* Wohlfarth-Bottermann 1960 (Lobosea, Gymnamoebia), with a new diagnosis of this species. *Protist.* 2002; 153:367-77.
- 101- Smirnov AV, Nasonova ES, Chao E, Cavalier-Smith T. Phylogeny, evolution, and taxonomy of vannellid amoebae. *Protist.* 2007; 158:295-324.
- 102- Fučíková K, Lahr DJG. Uncovering cryptic diversity in two Amoebozoan species using complete mitochondrial genome sequences. *J Eukaryot Microbiol.* 2016; 63:112–122.
- 103- Delafont V, Rodier MH, Maisonneuve E, Cateau E. *Vermamoeba vermiformis*: a Free-Living Amoeba of Interest. *Microbial ecol.* 2018; 76(4): 991–1001.
- 104- Buse HY, Ji P, Gomez-Alvarez V, Pruden A, Edwards MA, Ashbolt NJ. Effect of temperature and colonization of *Legionella pneumophila* and *Vermamoeba vermiformis* on bacterial community composition of copper drinking water biofilms. *Microbial biotech.* 2017; 10(4): 773–788.
- 105- Abedkhozasteh H, Niyayati M, Rahimi F, Heidari M, Farnia S, Rezaeian M. First Report of *Hartmannella* keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. *Iran J of Parasitol.* 2013; 8(3):481–485.
- 106- Scheid PL, Lâm TT, Sinsch U, Balczun C. *Vermamoeba vermiformis* as etiological agent of a painful ulcer close to the eye. *Parasitol Res.* 2019; 118: 1999–2004.

- 107- Calixto PHM, Trindade FR, Ballarini AJ, Dias CAGM, Campos EC, Sá-Oliveira JC. Aspectos Biológicos das Principais Amebas de Vida-Livre de Importância Médica. *Biota Amaz.* 2014; 4:124-29.
- 108- Bloch KC, Schuster FL. Inability to make a premortem diagnosis of *Acanthamoeba* species infection in a patient with fatal granulomatous amoebic encephalitis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:3003-6.
- 109- Walochnik J, Scheikl U, Haller-Schober EM. Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. *J Eukaryot Microbiol.* 2015; 62:3-11.
- 110- Webster D, Umar I, Kolyvas G, Bilbao J, Guiot MC, Duplisea K, et al. Treatment of granulomatous amoebic encephalitis with voriconazole and miltefosine in an immunocompetent soldier. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87:715-8.
- 111- Matsui T, Maeda T, Kusakabe S, Arita H, Yagita K, Morii E, et al. A case report of granulomatous amoebic encephalitis by Group 1 *Acanthamoeba* genotype T18 diagnosed by the combination of morphological examination and genetic analysis. *Diagn Pathol.* 2018; 13:27.
- 112- Cabello-Vílchez AM. Free-living amoebae (*Balamuthia mandrillaris*) in Peru. *Int J Clin Med Microbiol.* 2019; 4:140.
- 113- Ficker L, Seal D, Warhurst D, Wright P. *Acanthamoeba keratitis*-resistance to medical therapy. *Eye (Lond).* 1990; 4(Pt 6): 835-8.
- 114- Lamb DC, Warrillow AG, Rolley NJ, Parker JE, Nes WD, Smith SN, et al. Azole Antifungal Agents To Treat the Human Pathogens *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* through Inhibition of Sterol 14alpha-Demethylase (CYP51). *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: 4707-13.
- 115- Bacon AS, Frazer DG, Dart JK, Matheson M, Ficker LA, Wright P. A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba keratitis*, 1984-1992. *Eye (Lond).* 1993; 7(Pt 6):719-25.
- 116- Illingworth CD, Cook SD. *Acanthamoeba keratitis*. *Surv Ophthalmol.* 1998; 42:493-508.
- 117- Patel DV, Rayner S, McGhee CN. Resurgence of *Acanthamoeba keratitis* in Auckland, New Zealand: a 7-year review of presentation and outcomes. *Clin Exp Ophthalmol.* 2010; 38:15-20; quiz 87.
- 118- Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba keratitis*: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite.* 2015; 22:10.
- 119- Lim N, Goh D, Bunce C, Xing W, Fraenkel G, Poole TR, et al. Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of *Acanthamoeba keratitis*. *Am J Ophthalmol.* 2008; 145:130-5.
- 120- Martin-Navarro CM, Lorenzo-Morales J, Machin RP, Lopez-Arencibia A, Garcia-Castellano JM, de Fuentes I, et al. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and application of statins as a novel effective therapeutic approach against *Acanthamoeba* infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 375-81.
- 121- Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 1997; 7:583-98.
- 122- Jayasekera S, Sissons J, Tucker J, Rogers C, Nolder D, Warhurst D, et al. Post-mortem culture of *Balamuthia mandrillaris* from the brain and cerebrospinal fluid of a case of granulomatous amoebic meningoencephalitis, using human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol.* 2004; 53:1007-12.
- 123- White JM, Barker RD, Salisbury JR, Fife AJ, Lucas SB, Warhurst DC, et al. Granulomatous amoebic encephalitis. *Lancet.* 2004; 364:220.

- 124- Schafer KR, Shah N, Almira-Suarez MI, Reese JM, Hoke GM, Mandell JW, et al. Disseminated *Balamuthia mandrillaris* Infection. *J Clin Microbiol.* 2015; 53:3072-6.
- 125- Magnet A, Henriques-Gil N, Galvan-Diaz AL, Izquierdo F, Fenoy S, del Aguila C. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitol Res.* 2014; 113:2845-50.
- 126- Visvesvara GS, Callaway CS. Light and electron microscopic observations on the pathogenesis of *Naegleria fowleri* in mouse brain and tissue culture. *J Protozool.* 1974; 21:239-50.
- 127- De Carli GA. *Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas* (São Paulo; Atheneu). 2001.
- 128- Jaroli KL, McCosh JK, Howard MJ. The role of blood vessels and lungs in the dissemination of *Naegleria fowleri* following intranasal inoculation in mice. *Folia Parasitol (Praha).* 2002; 49:183-8.
- 129- Rojas-Hernandez S, Jarillo-Luna A, Rodriguez-Monroy M, Moreno-Fierros L, Campos-Rodriguez R. Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitol Res.* 2004; 94:31-6.
- 130- Betanzos A, Banuelos C, Orozco E. Host Invasion by Pathogenic Amoebae: Epithelial Disruption by Parasite Proteins. *Genes (Basel).* 2019; 8: 618.
- 131- Grace E, Asbill S, Virga K. *Naegleria fowleri*: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: 6677-81.
- 132- Kato H, Mitake S, Yuasa H, Hayashi S, Hara T, Matsukawa N. Successful treatment of granulomatous amoebic encephalitis with combination antimicrobial therapy. *Intern Med.* 2013; 52: 1977-81.
- 133- Sticca MP, Carrijo-Carvalho LC, Silva IMB, Vieira LA, Souza LB, Junior RB, et al. *Acanthamoeba* keratitis in patients wearing scleral contact lenses. *Cont Lens Anterior Eye.* 2018; 41:307-10.
- 134- Elsheikha HM, Siddiqui R, Khan NA. Drug Discovery against *Acanthamoeba* Infections: Present Knowledge and Unmet Needs. *Pathogens.* 2020; 9.
- 135- Lasjerdi Z, Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Haghighi A, Taghipour N. Ophthalmology hospital wards contamination to pathogenic free living amoebae in Iran. *Acta Parasitol.* 2015; 60: 417-22.
- 136- Martinez AJ. *Free-living amoebas: natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease* (CRC Press: Boca Raton, Florida, USA). 1985
- 137- da Rocha-Azevedo B, Tanowitz HB, Marciano-Cabral F. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009; 251406.
- 138- Laurie MT, White CV, Retallack H, Wu W, Moser MS, Sakanari JA, et al. Functional Assessment of 2,177 U.S. and International Drugs Identifies the Quinoline Nitroxoline as a Potent Amoebicidal Agent against the Pathogen *Balamuthia mandrillaris*. *mBio.* 2018; 5: e02051-18.
- 139- Wilson MR, Shanbhag NM, Reid MJ, Singhal NS, Gelfand JM, Sample HA, et al. Diagnosing *Balamuthia mandrillaris* Encephalitis With Metagenomic Deep Sequencing. *Ann Neurol.* 2015; 78:722-30.
- 140- Dykova I, Lom J, Schroeder-Diedrich JM, Booton GC, Byers TJ. *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *J Parasitol.* 1999; 85:1106-13.
- 141- Instituto de Ciência e tecnologia em Biomodelos. Primatas não humanos. Acessado em 20/ 05/ 2020. Disponível em: <https://www.ictb.fiocruz.br/>.

- 142- Valença-Montenegro M.M; Oliveira L.C; Pereira D. G; Borstelmann M.A & Rio do Valle R. Avaliação do Risco de Extinção de *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758) no Brasil. Instituto Chico Mendes de Conservação da biodiversidade. Acessado 03/11/2020. Disponível em:
<https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/7204-mamiferos-callithrix-jacchus-sagui-de-tufo-branco>.
- 143- Alonso C, Langguth A. Ecologia e comportamento de *Callithrix jacchus* (Primates: Callitrichidae) numa ilha de floresta atlântica. *Rev Nordest de Biol.* 1989; 6:105-137.
- 144- Araújo A, Arruda MF, Alencar AI, Albuquerque F, Nascimento MC, Yamamoto ME. Body weight of wild and captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Int J of Primatol.* 2000; 21:317-324.
- 145- Nagyová V, Nagy A, Timko J. Morphological, physiological and molecular biological characterisation of isolates from first cases of *Acanthamoeba keratitis* in Slovakia. *Parasitol Res.* 2010; 106:861-72.
- 146- Walochnik J, Obwaller A, Aspöck H. Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66:4408-13.
- 147- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, et al. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:1903-11.
- 148- Booton GC, Carmichael JR, Visvesvara GS, Byers TJ, Fuerst PA. Identification of *Balamuthia mandrillaris* by PCR assay using the mitochondrial 16S rRNA gene as a target. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:453-5.
- 149- Pelandakis M, Serre S, Pernin P. Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. *J Eukaryot Microbiol.* 2000; 47:116-21.
- 150- Montalbano Di Filippo M, Novelletto A, Di Cave D, Berrilli F. Identification and phylogenetic position of *Naegleria* spp. from geothermal springs in Italy. *Exp Parasitol.* 2017; 183:143–149.
- 151- El-Badry AA, Aufy SM, El-Wakil ES, Rizk EM, Mahmoud SS, Taha NY. First identification of *Naegleria* species and *Vahlkampfia ciguana* in Nile water, Cairo, Egypt: Seasonal morphology and phylogenetic analysis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020; 53: 259-265.
- 152- Nazar M, Haghighi A, Taghipour N, Ortega-Rivas A, Tahvildar-Biderouni F, Nazemalhosseini Mojarad E, et al. Molecular identification of *Hartmannella vermiformis* and *Vannella persistens* from man-made recreational water environments, Tehran, Iran. *Parasitol Res.* 2012; 111:835-9.
- 153- Velloso SAG, Mangini ACS, Nunes LR, Schlodtmann AG. Frequência de amebas de vida livre em fezes de indivíduos de uma creche da cidade de São Paulo / Frequency free-living amebas in the feces of persons from a nursery in São Paulo city. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 1984; 44:61-65.
- 154- Bradbury RS. Free-living amoebae recovered from human stool samples in *Strongyloides* agar culture. *J Clin Microbiol.* 2014; 52:699-700.
- 155- Chavatte N, Lambrecht E, Van Damme I, Sabbe K, Houf K. Free-living protozoa in the gastrointestinal tract and feces of pigs: Exploration of an unknown world and towards a protocol for the recovery of free-living protozoa. *Vet Parasitol.* 2016; 225:91-8.

- 156- Mulec J, Dietersdorfer E, Üstüntürk-Onan M, Walochnik J. *Acanthamoeba* and other free-living amoebae in bat guano, an extreme habitat. *Parasitol res.* 2016; 115:1375-83.
- 157- Lorenzo-Morales J, López-Darias M, Martínez-Carretero E, Valladares B. Isolation of potentially pathogenic strains of *Acanthamoeba* in wild squirrels from Canary Islands and Morocco, *Exp parasitol.* 2007; 117:74-9.
- 158- Tymi T, Dykova I. *Sappinia* sp. (Amoebozoa: Thecamoebida) and *Rosculus* sp. (SAR: Cercozoa) Isolated From King Penguin Guano Collected in the Subantarctic (South Georgia, Salisbury Plain) and their Coexistence in Culture. *J Eukaryot Microbiol.* 2018; 65:544-55.
- 159- Simitzis-Le Flohic AM, Chastel C. Les petits mammifères sauvages: vecteurs d'amibes libres? [Little savage mammals: free-living amoebae vectors? (author's transl)]. *Med trop: revue du Corps de sante colonial.* 1982; 42:275-279.
- 160- Schuster FL, De Jonckheere JF, Moura H, Sriram R, Garner MM, Visvesvara GS. Isolation of a thermotolerant *Paravahlkampfia* sp. from lizard intestine: biology and molecular identification. *J Eukaryot Microbiol.* 2003; 50:373-378.
- 161- Sesma MJM, Ramos LZ. Isolation of Free-Living Amoebas from the Intestinal Contents of Reptiles. *J Parasitol.* 1989; 75:322.
- 162- Franke ED, Mackiewicz JS. Isolation of *Acanthamoeba* and *Naegleria* from the intestinal contents of freshwater fishes and their potential pathogenicity. *The J of Parasitol.* 1982; 68:164-166.
- 163- Wildschutte H, Lawrence JG. Differential *Salmonella* survival against communities of intestinal amoebae. *Microbiol (Reading, England).* 2007; 153:1781-1789.
- 164- Zhang Y, Sun X, Wang Z, Li R, Luo S, Jin X, et al. Identification of 18S Ribosomal DNA Genotype of *Acanthamoeba* from Patients with Keratitis in North China. *Investig Ophthalmol Visual Sci.* 2004; 45:1904.
- 165- Zanzani SA, Gazzonis AL, Epis S, Manfredi MT. Study of the gastrointestinal parasitic fauna of captive non-human primates (*Macaca fascicularis*). *Parasitol Res.* 2015; 115(1):307-312.
- 166- Li M, Zhao B, Li B, Wang Q, Niu L, Deng J, et al. Prevalence of gastrointestinal parasites in captive non-human primates of twenty-four zoological gardens in China. *J of med primatol.* 2015; 44:168-173.
- 167- Gunasekera UC, Wickramasinghe S, Wijesinghe G, Rajapakse R. Parasitas gastrointestinais de primatas cativos nos Jardins Zoológicos Nacionais do Sri Lanka. *Taprobanica.* 2012; 4:37-41.
- 168- Gogarten JF, Calvignac-Spencer S, Nunn CL, Ulrich M, Saiepour N, Nielsen HV, et al. Metabarcoding of eukaryotic parasite communities describes diverse parasite assemblages spanning the primate phylogeny. *Mol Eco Res.* 2020; 20: 204-215.
- 169- Gomes TS, Gjirknuri J, Magnet A, Vaccaro L, Ollero D, Izquierdo F, et al. The Influence of *Acanthamoeba-Legionella* Interaction in the Virulence of Two Different *Legionella* Species. *Front in microbiol.* 20189: 2962.
- 170- Rizzo J, Albuquerque PC, Wolf JM, Nascimento R, Pereira MD, Nosanchuk JD, et al. Analysis of multiple components involved in the interaction between *Cryptococcus neoformans* and *Acanthamoeba castellanii*. *Fungal biol.* 2017; 121:602-614.
- 171- Nunes TE, Brazil NT, Fuentefria AM, Rott MB. *Acanthamoeba* and *Fusarium* interactions: A possible problem in keratitis. *Acta tropica.* 2016; 157:102-107.

- 172- Vieira A, Ramesh A, Seddon AM, Karlyshev AV. CmeABC Multidrug Efflux Pump Contributes to Antibiotic Resistance and Promotes *Campylobacter jejuni* Survival and Multiplication in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl environ microbiol*. 2017; 83:e01600-17.
- 173- Koga T, Aoki W, Mizuno T, Wakazono K, Ohno J, Nakai T, et al. Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) and eradication regimens. *J of microbiol, immunol, and infec*. 2017; 50:75–82.
- 174- Westmoreland SV, Rosen J, MacKey J, Romsey C, Xia DL, Visvesvera GS, et al. Necrotizing meningoencephalitis and pneumonitis in a simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaque due to *Acanthamoeba*. *Vet pathol*. 2004; 41:398–404.
- 175- Chilton FH, Lee TC, Willard SL, Ivester P, Sergeant S, Register TC, et al. Depression and altered serum lipids in cynomolgus monkeys consuming a Western diet. *Physiol & Behav*. 2011; 104: 222–227.
- 176- Frankel JS, Mallott EK, Hopper LM, Ross SR, Amato KR. The effect of captivity on the primate gut microbiome varies with host dietary niche. *Am J of Primatol*. 2019; 81:e23061.
- 177- Carrasco-Yepe M, Campos-Rodriguez R, Lopez-Reyes I, Bonilla-Lemus P, Rodriguez-Cortes AY, Contis-Montes de Oca A, et al. Intranasal coadministration of *Cholera* toxin with amoeba lysates modulates the secretion of IgA and IgG antibodies, production of cytokines and expression of plgR in the nasal cavity of mice in the model of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Exper Parasitol*. 2014; 145:S84–S92.
- 178- Moseman EA. Battling brain-eating amoeba: Enigmas surrounding immunity to *Naegleria fowleri*. *PLoS Pathog*. 2020; 16:e1008406
- 179- Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Rev in Immunol*. 2014; 14:667-85.
- 180- Rusiñol M, Martínez-Puchol S, Timoneda N, Fernández-Cassi X, Pérez-Cataluña A, Fernández-Bravo A, et al. Metagenomic analysis of viruses, bacteria and protozoa in irrigation water. *Int J of Hyg and Environ Health*. 2020; 224: 113440.
- 181- Saburi E, Rajaii T, Behdari A, Kohansal MH, Vazini H. Free-living amoebae in the water resources of Iran: a systematic review. *J of paras dis: official organ of the Indian Soc for Parasitol*. 2017; 41:919–928.
- 182- Chomicz L, Conn DB, Padzik M, Szaflik JP, Walochnik J, Zawadzki PJ, et al. Emerging Threats for Human Health in Poland: Pathogenic Isolates from Drug Resistant *Acanthamoeba keratitis* Monitored in terms of Their *In Vitro* Dynamics and Temperature Adaptability. *Biomed Res Int* 2015; 231-285.
- 183- Ng SL, Nordin A, Abd Ghafar N, Suboh Y, Ab Rahim N, Chua KH. *Acanthamoeba*-mediated cytopathic effect correlates with MBP and AhLBP mRNA expression. *Parasit Vectors*. 2017; 10:625.
- 184- Jercic MI, Aguayo C, Saldarriaga-Cordoba M, Muino L, Chenet SM, Lagos J, et al. Genotypic diversity of *Acanthamoeba* strains isolated from Chilean patients with *Acanthamoeba keratitis*. *Parasit Vectors*. 2019; 12: 58.
- 185- Memari F, Niyayati M, Lorenzo-Morales J, Jonaydi Z. Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from the oral cavity of immunosuppressed individuals in Tehran, Iran. *Acta parasitol*. 2016; 61: 451–455.
- 186- Niyayati M, Arab-Mazar Z, Lasjerdi Z, Lorenzo-Morales J, Espotin A, Yadegarynia D, et al. Molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from the

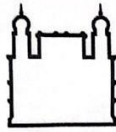
- oral cavity of hemodialysis patients in Iran. *Parasitol Res.* 2017; 116: 2965–2969.
- 187- Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Martín-Navarro CM, Mohebbali M, et al. First report of a mixed infection due to *Acanthamoeba* genotype T3 and *Vahlkampfia* in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. *Exp Parasitol.* 2010; 126(1):89–90.
- 188- Arnalich-Montiel F, Lorenzo-Morales J, Irigoyen C, Morcillo-Laiz R, López-Vélez R, Muñoz-Negrete F, et al. Co-isolation of *Vahlkampfia* and *Acanthamoeba* in *Acanthamoeba*-like keratitis in a Spanish population. *Cornea.* 2013; 32(5):608–614.
- 189- Arab-Mazar Z, Niyyati M, Lasjerdi Z, Spotin A, Alavi Darzam I, Gachkar L. Isolation, identification, and phylogenetic analysis of potentially pathogenic free-living amoebae isolated from nasal and oral mucosa of HIV/AIDS patients in Iran. *Parasitol Res.* 2019; 118:3061–3066.
- 190- Amato KR, Mallott EK, McDonald D, Dominy NJ, Goldberg T, Lambert JE, et al. Convergence of human and Old World monkey gut microbiomes demonstrates the importance of human ecology over phylogeny. *Gen Biol.* 2019; 20:201.
- 191- Zaman V. *Acanthamoeba* in human faeces from Karachi. *Ann Trop Med Parasitol.* 1999; 93:189–191.
- 192- Smirnov A, Nassonova E, Geisen S, Bonkowski M, Kudryavtsev A, Berney C, et al. Phylogeny and Systematics of Leptomyxid Amoebae (Amoebozoa, Tubulinea, Leptomyxida). *Protist.* 2016; 168:220-252.
- 193- Del Valle DOFA, Lorenzo-Morales J, Maciver SK. *Leptomyxa valladaresi* n. sp. (Amoebozoa, Tubulinea, Leptomyxida), from Mount Teide, Tenerife, Spain. *Exp Parasitol.* 2017; 91:183:85.
- 194- Dyková I, Lom J. Advances in the knowledge of amphizoic amoebae infecting fish. *Folia Parasitol.* 2004; 51: 81–97.
- 195- Lasjerdi Z, Niyyati M, Haghighi A, Zaeri F, Nazemalhosseini Mojarad E. First report of vannellidae amoebae (*Vannella* spp.) isolated from biofilm source. *Iran J Parasitol.* 2011; 6: 84-9.
- 196- Pinna A, Porcu T, Boscia F, Cano A, Erre G, Mattana A. Free-Living Amoebae Keratitis. *Cornea.* 2017; 36(7), 785–790.
- 197- Smirnov A, Brown S. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protistol.* 2004; 3:148-190.
- 198- Smirnov A, Nassonova E, Berney C, Fahrni J, Bolivar I, Pawlowski J. Molecular Phylogeny and Classification of the Lobose Amoebae. *Protist.* 2005; 156:129-142.
- 199- Schild M, Gianinazzi C, Gottstein B, Muller N. PCR-based diagnosis of *Naegleria* sp. infection in formalin-fixed and paraffin-embedded brain sections. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:564-7.
- 200- Ren M, Wu X. Evaluation of three different methods to establish animal models of *Acanthamoeba keratitis*. *Yonsei Med J.* 2010; 51:121-7.
- 201- Roy SL, Metzger R, Chen JG, Laham FR, Martin M, Kipper SW, et al. Risk for transmission of *Naegleria fowleri* from solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2014; 14:163-71.
- 202- Cope JR, Ali IK. Primary Amebic Meningoencephalitis: What Have We Learned in the Last 5 Years? *Curr Infect Dis Rep.* 2016; 18: 31.
- 203- Chen M, Ruan W, Zhang L, Hu B, Yang X. Primary Amebic Meningoencephalitis: A Case Report. *Korean J Parasitol.* 2019;57: 291-94.

- 204- DPDx. Free Living Amebic Infections. [Acanthamoeba spp.] [Balamuthia mandrillaris] [Naegleria fowleri] [Sappinia spp.]. Acessado em 02/ 08/ 2020. Disponível: <https://www.cdc.gov/dpdx/az.html>.
- 205- Su MY, Lee MS, Shyu LY, Lin WC, Hsiao PC, Wang CP, et al. A fatal case of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in Taiwan. *Korean J Parasitol*. 2013; 51:203-6.
- 206- El-Sayed NM, Hikal WM. Several staining techniques to enhance the visibility of *Acanthamoeba* cysts. *Parasitol Res*. 2015; 114: 823-30.
- 207- Chan LL, Mak JW, Ambu S, Chong PY. Identification and ultrastructural characterization of *Acanthamoeba* bacterial endocytobionts belonging to the Alphaproteobacteria class *PLoS One*. 2018;13 :e0204732.
- 208- Chavez-Munguia B, Salazar-Villatoro L, Lagunes-Guillen A, Omana-Molina M, Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A. *Acanthamoeba castellanii* cysts: new ultrastructural findings. *Parasitol Res*. 2013; 112:1125-30.
- 209- Ithoi I, Ahmad AF, Mak JW, Nissapatorn V, Lau YL, Mahmud R. Morphological characteristics of developmental stages of *Acanthamoeba* and *Naegleria* species before and after staining by various techniques. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2011; 42:1327-38.
- 210- Elddeek HE, Attia RAH, Nageeb MM, Sakla AA. Comparative evaluation of multiple staining techniques for identification of different developmental stages of *Acanthamoeba* and *Naegleria*. *J Egypt Soc Parasitol (JESP)*. 2019; 2:409-22.
- 211- Muchesa P, Mwamba O, Barnard TG, Bartie C. Detection of free-living amoebae using amoebal enrichment in a wastewater treatment plant of Gauteng Province, South Africa. *Biomed Res Int*. 2014; 575297.
- 212- Petry F, Torzewski M, Bohl J, Wilhelm-Schwenkmezger T, Scheid P, Walochnik J, et al. Early diagnosis of *Acanthamoeba* infection during routine cytological examination of cerebrospinal fluid. *J of clin microbiol*. 2006; 44:1903–1904.
- 213- Pirehma M, Suresh K, Sivanandam S, Anuar AK, Ramakrishnan K, Kumar GS. Field's stain-a rapid staining method for *Acanthamoeba* spp. *Parasitol Res*. 1999; 85:791-3.
- 214- Espinel-Ingroff A. *In vitro* activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol*. 1998; 198-202.
- 215- Schuster FL, Guglielmo BJ, Visvesvara GS. *In-vitro* activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp., and *Naegleria fowleri*. *J Eukaryot Microbiol*. 2006; 53:121-126.
- 216-Yuma Miyaoka, Wilasinee Yoochatchaval, Haruhiko Sumino, Pathan Banjongproo, Takashi Yamaguchi, Takashi Onodera, Tomohiro Okadera & Kazuaki Syutsubo. Evaluation of the process performance of a down-flow hanging sponge reactor for direct treatment of domestic wastewater in Bangkok, Thailand. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 2017 DOI: 10.1080/10934529.2017.1324708.
- 217- Chouari, R., Leonard, M., Bouali, M. et al. Eukaryotic molecular diversity at different steps of the wastewater treatment plant process reveals more phylogenetic novel lineages. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017; 33:44 <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2217-6>
- 218- Berney, C., Geisen, S., Van Wichelen, J., Nitsche, F., Vanormelingen, P., Bonkowski, M., & Bass, D. Expansion of the “Reticulosphere”: Diversity of Novel

Branching and Network-forming Amoebae Helps to Define Variosea (Amoebozoa). *Protist.* 2015. 166(2), 271–295.

APÊNDICES

Apêndice 1



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-5/16

Certificamos que o protocolo (P-8/14.5), intitulado “**CRIAÇÃO, PRODUÇÃO E MANUTENÇÃO DE PRIMATAS NÃO HUMANOS NO CENTRO DE CRIAÇÃO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO/CECAL PARA ATENDER AOS PROGRAMAS E PROJETOS DESENVOLVIDOS NA FIOCRUZ**”, sob a responsabilidade de **CARLA DE FREITAS CAMPOS** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Informamos que todos os animais encaminhados para experimento devem ser testados previamente para tuberculose e os proponentes deverão informar imediatamente à Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz o surgimento de animais positivos para a doença.

Esta licença tem validade até 29/02/2020 e inclui o uso total de:

Macaca mulatta

- 163 machos.
- 335 fêmeas.

Macaca fascicularis

- 19 machos.
- 39 fêmeas.


Saimiri sciureus

- 91 machos.
- 145 fêmeas.

Saimiri ustus

- 10 machos.
- 04 fêmeas.

Rio de Janeiro, 29 de fevereiro de 2016.


Etelcia M. Molinaro
Vice - Coordenadora
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 0463096

APÊNDICE 2

Sequências parciais do gene 18S de *Acanthamoeba* sp genótipo T4 obtidas neste estudo

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AH51	AGGACGACCGCA-	CCGATGGTGGTGT	TTTTGTATTCAACGT	CTCCTAATCGCTGGT	CGGCATCGTTTATGG	TAAAGACTACGACGGT	ATCTGATCGTCTTC			
AM6	-
AM41	A.
AG66	-----
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
AH51	GATCCCCTAAC	TTTCGTTCTTGAT	TAAATGAAAACAT	CCTTGGCAGATG	CTTTYGCAGAAG	TAAATCTTTCATA	TAAATCCAAGAAT	TTTCACCTCTG	ACAATT	
AM6
AM41
AG66
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
AH51	AAATATTAATG	CCCCAAC	TATCCCTATTAAT	CATTACCC	TAGTCC	TGCGCTGCCAAA	CCAAC	TGAAAATAGG	AGGACAGGGT	CCT-ATTCCATTATC
AM6
AM41
AG66	T.....
	310	320	330	340	350	360	370			
AH51	CCATGCT-AAT	GTATT	CAGTGGCAG	AAAAATTGGAT	CTGCCTG	CTTTGAAC	ACTCTAAATTTTTT	CACCGTAAGT		
AM6	-	G.....	-T.G	-----	-----	-----		
AM41	-	G.....	-	-----	-----	-----		
AG66	T.....	G.....	-----	-----	-----	-----	-----		

APÊNDICE 3

Sequência parcial do gene 18 S de *Vermamoeba vermiformis* obtida neste estudo

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
AM4  TCGTAGTTGGATTTTCGGAGGTCCTTAGCAGTCCGCCCTTCGGGGAGCGGGCTGCTGGCCTCCTATGTTCCCTAACGGTCCATCCGCGAGGGTGGGGAA
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AM4  TCAACCGCTAGGATCGTTTACTTTGAGGAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCGTAACTCGCCTCCGAATACGTTAGCATGGGATAATGGAATACGACTTCG
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
AM4  GTCCTGTTTCGTTGGTTTCGCTTGGCTGAAGTAATGATTTGATAGGGACAGTTGGGGGCATTAGTATTTAGTTGTCAGAGGTGAAATTCAGGATTTACTA
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
AM4  AAGACTGACCAATGCGAAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTAGGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTCTACC
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
AM4  GTAAACTATGCCGACCAAGGATCCGGAGAGTTTGCATGGATGACTCCCCGGGCACCTTGTGAGAAATCATAAGTGTTTGGGTTTTGGGGGGAGTATGGTC
      510     520     530     540     550     560     570     580     590
AM4  GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGAACCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTACGAGTCAG
```