

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

***Acanthamoeba spp.* EM AMBIENTES HOSPITALARES E
ACADÊMICOS DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

JANICE DE FÁTIMA PAVAN ZANELLA

Caxias do Sul

2011

JANICE DE FÁTIMA PAVAN ZANELLA

***Acanthamoeba spp.* EM AMBIENTES HOSPITALARES E
ACADÊMICOS DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul, visando a obtenção do grau de
Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Sergio Echeverrigaray

Co-orientador: Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Caxias do Sul

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

Z28a Zanella, Janice de Fátima Pavan, 1960-
Acanthamoeba spp. em ambientes hospitalares e acadêmicos do
Rio Grande do Sul / Janice de Fátima Pavan Zanella. - 2011.
v. 98 f. : il. : 30 cm.

Apresenta bibliografia.

Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.

“Orientação: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray, Co-orientação:
Dr^a. Ana Paula Longaray Delamare.”

1. Acanthamoeba. 2. Microorganismos patogênicos. 3. Doenças
parasitárias. 4. Biotecnologia. I. Título.

CDU 2.ed.: 561.24

Índice para o catálogo sistemático:

1. Acanthamoeba	561.24
2. Microorganismos patogênicos	579.61:616-092
3. Doenças parasitárias	616.99
4. Biotecnologia	57.08

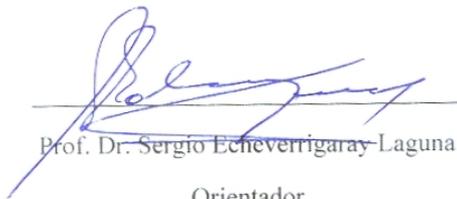
Catalogação na fonte elaborada pelo bibliotecário
Marcelo Votto Teixeira – CRB 10/1974

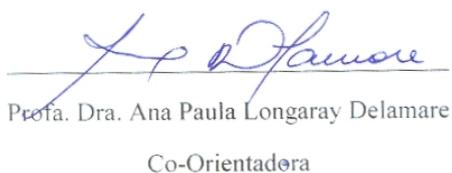
JANICE DE FÁTIMA PAVAN ZANELLA

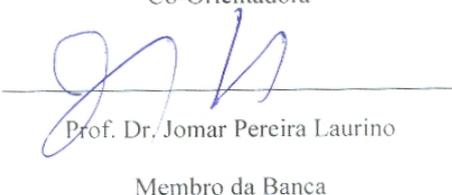
***Acanthamoeba* spp. EM AMBIENTES HOSPITALARES E
ACADÊMICOS DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

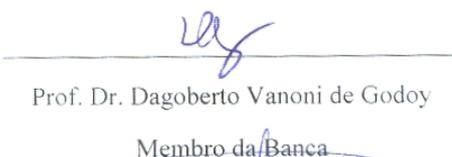
tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul, visando a obtenção do grau
de Doutor em Biotecnologia.

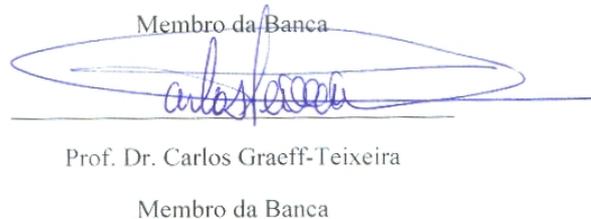
TESE APROVADA EM 20 DE DEZEMBRO DE 2011.


Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna
Orientador


Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare
Co-Orientadora


Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino
Membro da Banca


Prof. Dr. Dagoberto Vanoni de Godoy
Membro da Banca


Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira
Membro da Banca

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
Biblioteca Central

DEDICATÓRIA

Dedico,

Esta tese à minha mãe, meu pai (*in memoriam*) meus filhos Alice e Victório e ao meu esposo Elton que compartilharam do meu ideal incentivando-me a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos e que pacientemente souberam tolerar a minha ausência, compreendendo e apoiando minhas horas de esforço. Este momento só foi possível por vocês, MEUS AMORES!

E, claro, às inúmeras amebas sacrificadas no decorrer de minhas atividades científicas. “Meninas”, espero que não tenha sido em vão! Valeu!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por permitir que tudo isto acontecesse...

À Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia pela disponibilidade de toda a estrutura humana, física e material, para a execução desta pesquisa.

Ao Prof^o. Dr. Sergio Echeverrigaray, o mais carinhoso agradecimento pela oportunidade de convívio e aprendizado iniciado ainda no período de mestrado; pela sabedoria e competência com que conduziu a orientação e execução deste trabalho; pela paciência, compreensão e estímulo para a superação das dificuldades que houve neste período. Obrigada pela amizade, pela influência científica e ética, pelas lições profissionais e de vida. Foi um privilégio conhecê-lo e compartilhar estes momentos. Muito obrigada, MESTRE.

À Prof^a. Dra. Ana Paula Delamare, pela amizade que cultivamos ao longo do tempo e que com certeza permanecerá. Obrigada pelo convívio, trocas de experiências e aprendizado na orientação de atividades integrantes desta pesquisa.

Ao Prof^o. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa, pela amizade e preocupação na execução deste trabalho e, especialmente pela confiança ao me apresentar às Amebas de Vida Livre.

Ao Prof^o. Dr. Jomar Pereira Laurino, que apesar do pouco tempo de convívio, mas o suficiente para a admiração e respeito. Foi um prazer conhecê-lo.

Aos mestres: Prof^o. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, Prof^o. Dr. Maurício Moura da Silveira, Prof^a. Dra. Mirian Salvador que participaram de forma direta ou indireta nesta minha trajetória científica e, que além de transmitirem seus conhecimentos e experiências, fizeram a diferença, pelo exemplo profissional, postura e ética.

Aos funcionários do Instituto de Biotecnologia, especialmente, Lucimara e Claudete.

Às bolsistas Camila Alves e Ronize Rohr dos Santos pelo companheirismo e apoio durante a realização deste trabalho.

À “Família” do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IB/UCS: Angélica, Ana Rita, Abhay, Bibiana, Caroline, Camila, Cleonice, Cristiane, Débora, Evanise, Fernanda, Fernando, Franciele, Guilherme, Keoma, Lélis, Luciane, Morgana, Maurício, Ronize, Scheila, pela amizade, companheirismo e contribuições na elaboração deste trabalho. Obrigada pela torcida e carinho nos momentos em que precisei, ao longo deste curso.

E, por último, mas não menos importante, aos meus “irmãos”: Luciana (Lú), Jucimar (Juci) e Manuela (Manú): este momento também é de vocês!! ...que sempre foram INCONDICIONAIS... Não tenho palavras... AMO VOCE.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	li
LISTA DE FIGURAS	lii
RESUMO	Iv
ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Amebas de Vida Livre	2
2.2 Taxonomia e Morfologia de AVL	2
2.2.1 Gênero <i>Acanthamoeba</i>	4
2.2.2 Gênero <i>Naegleria</i>	6
2.2.3 Gênero <i>Balamuthia</i>	7
2.2.4 Gênero <i>Sappinia</i>	8
2.3 Doenças causadas por AVL	8
2.4 Ciclo de Vida de <i>Acanthamoeba</i>	12
2.4.1 Mecanismo de Infecção	14
2.4.2 Resposta Imune	17
2.5 Fatores de Patogenicidade de <i>Acanthamoeba</i>	19
2.6 Marcadores Moleculares na determinação de <i>Acanthamoeba</i>	21
3. REFERÊNCIAS	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
Capítulo 1- A Rapid and Reliable Method for the Clonal Isolation of <i>Acanthamoeba</i> from Environmental Samples	39
Capítulo 2- Laboratory characterization of free-living amoebae isolated from academic environments.	46
Capítulo 3- Isolamento e estudo citomorfológico de amebas de vida livre do gênero <i>Acanthamoeba</i> em diferentes ambientes úmidos na Universidade de Cruz Alta, RS, Brasil	58
Capítulo 4- Potencial patogênico de <i>Acanthamoeba spp.</i> isoladas de ambientes internos hospitalares e acadêmicos de duas regiões do Rio Grande do Sul, Brasil.	70
Capítulo 5- Protease diversity among environmental isolates of <i>Acanthamoeba spp.</i>	90
5. CONCLUSÕES GERAIS	99

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1- Samples and isolates 43

Capítulo 2

Tabela 1- Isolamento de AVL potencialmente patogênicas em amostras de poeiras e biofilmes, segundo os respectivos locais de coleta 51

Tabela 2- Características morfológicas de cistos sugestivos de *Acanthamoeba spp.*, encontrados nas amostras 53

Capítulo 3

Tabela 1- Distribuição de amebas de vida livre (AVL) em amostras coletadas de acordo com os ambientes estudados 61

Tabela 2- Caracterização morfológica dos cistos de *Acanthamoeba spp.* isolados de ambientes úmidos de uma comunidade acadêmica do Rio Grande do Sul 65

Capítulo 4

Tabela 1- Número total de coletas realizadas de acordo como local de procedência. 73

Tabela 2- Distribuição de *Acanthamoeba* em relação ao local e ao número de coleta 76

Tabela 3- Caracterização morfológica segundo Pussard & Pons (1977) dos cistos de *Acanthamoeba spp* 78

Tabela 4- Avaliação da capacidade de crescimento de *Acanthamoebas spp.* em diferentes temperaturas e pHs 79

Capítulo 5

Tabela 1- *Acanthamoeba* isolates used in this study 93

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- Figura 1-** Classificação dos principais gêneros de amebas de vida livre (Marciano-Cabral & Cabral, 2003, e Visvesvara, G.S.; Moura, H. & Schuster, F.L. 2007- adaptado). 4
- Figura 2-** Esquema de um trofozoíto de *Acanthamoeba*, mostrando a presença de acantopódios (Oddó, 2006). 4
- Figura 3-** A) Trofozoítos de *Acanthamoeba* B) Cistos de *Acanthamoeba* (adaptado de Khan & Siddiqui, 2009). 5
- Figura 4-** Esquema de cistos de *Acanthamoeba*, mostrando a parede cística dupla, ectocisto e endocisto (Oddó, 2006). 5
- Figura 5-** Trofozoítos de *Naegleria fowleri* fotografados por microscopia invertida (Schuster & Visvesvara, 2004). 7
- Figura 6-** Esquema de um trofozoíto de *Balamuthia mandrillaris* (tamanho médio de 15 a 60 μ), com presença dos lamelipódios (Oddó, 2006). 7
- Figura 7-** Esquema de um cisto de *Balamuthia mandrillaris* (Oddó, 2006). 7
- Figura 8-** Aspecto da ceratite amebiana (Cooke, 2008; Pens *et al.*, 2008). 11
- Figura 9-** Ciclo biológico de *Acanthamoeba* (adaptado de Rivas, 2002). 13
- Figura 10-** Esquema do cistron ribossômico em *Acanthamoeba* (Alves, 2001). 24

Capítulo 1

- Figura 1-** - Flowchart of the optimized process for the isolation of monocystic *Acanthamoeba* clones. 42
- Figure 2** - ssu rDNA RFLP-PCR profiles of *Acanthamoeba* clones 44

Capítulo 2

- Figura 1-** Morfologia de trofozoítos e cistos com distintas colorações. 52
- Figura 2-** Trofozoíto *Acanthamoeba* spp. Presença de acantopódios a fresco com salina de Page 53
- Figura 3-** Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp, onde se observa o vacúolo contrátil a fresco com salina de PAGE. 53

Capítulo 4

- Figura 1-** Cisto de *Acanthamoeba* spp.- forma estrelada; cisto de *Acanthamoeba* spp. - forma poligonal. 77
- Figura 2-** Medida dos cistos de *Acanthamoeba* spp.; trofozoíto com observação de vacúolo contrátil e acantopódios. 77
- Figura 3-** Viabilidade de cistos após 60 minutos na presença de (A) desinfetante Ramalet[®], (B) Fácil 31[®], (C) água sanitária Ramalet[®]. 80
- Figura 4-** Redução de viabilidade do isolado C52 em função do tempo de exposição. 81

Capítulo 5

- Figura 1-** Extracellular specific protease activity of environmental isolates of *Acanthamoeba*. 94
- Figura 2-** Extracellular protease profiles of environmental isolates of *Acanthamoeba* on gelatin co-polymerized SDS-PAGE gel. 95
- Figura 3-** Hierarchical cluster analysis (Single Linkage Method) based on the extracellular protease profiles of ten *Acanthamoeba* isolates on gelatin co-polymerized SDS-PAGE gels 96
- Figura 4-** Extracellular protease profiles of *Acanthamoeba* isolates on SDS-PAGE gels co-polymerized with different substrates. 97

RESUMO

Protozoários do gênero *Acanthamoeba* estão entre os organismos de vida-livre mais abundantes sendo encontrados em uma ampla gama de ambientes naturais como água, solo, poeira, vegetais, hospitais, sistemas de ventilação e esgotos. Algumas espécies de *Acanthamoeba* são consideradas patógenos oportunistas e têm sido associadas a infecções cutâneas, queratite, encefalite granulomatosa amebiana (EGA) e a outras afecções em menor frequência. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença de *Acanthamoeba* em áreas comunitárias de unidades acadêmicas e hospitalares, assim como determinar o risco potencial dos isolados. Amostras foram coletadas em dois hospitais e duas universidades do Rio Grande do Sul, Brasil. As amebas foram isoladas e caracterizadas utilizando métodos morfológicos, fisiológicos e genéticos. Além disso, a variação e a especificidade de proteases extracelulares foram determinadas por análise de zimogramas. A detecção e isolamento de amebas em amostras clínicas e ambientais envolve a amostragem e cultura em meio ágar não nutriente. Apesar de eficiente, este sistema requer diversas passagens visando eliminar contaminantes e não é apropriado para o isolamento de amebas individuais de amostras biodiversas. Para solucionar este problema foi desenvolvido um método alternativo que envolve amostragem, enriquecimento, indução de encistamento e micromanipulação de cistos e cultura direta em placas de ágar não nutriente. Utilizando os métodos convencional e alternativo, 429 amostras de áreas comunitárias de hospitais e universidades foram avaliadas mostrando alta prevalência de *Acanthamoeba* tanto em ambientes secos (13,77%) como úmidos (19,29%). A maior parte dos isolados (77,4%) foram classificados dentro do grupo II, o qual inclui a maioria das espécies patogênicas. Os isolados apresentaram tolerância à temperatura e pH, assim como resistência a desinfetantes, características que devem contribuir para a sobrevivência e proliferação de *Acanthamoeba* em ambientes fechados, aumentando o risco de contaminação das pessoas. Como as proteases extracelulares são consideradas um dos mais importantes fatores de patogenicidade das amebas de vida-livre, dez isolados foram avaliados quanto à atividade, padrão e especificidade de proteases. Análise com azocaseína mostrou variação significativa na atividade proteolítica volumétrica e específica dos distintos isolados, independente do “status” patogênico e não patogênico das espécies. Zimogramas em géis copolimerizados com gelatina mostraram três padrões de bandas em isolados de

A. castellanii, e perfis particulares para as outras espécies. Todas as proteases secretadas por *A. castellanii*, *A. pearcei* e *A. healyi* foram caracterizadas como serino proteases, enquanto apenas cisteino e metaloproteases foram identificadas em *A. astronyxis*. Algumas proteases extracelulares apresentaram importante atividade sobre gelatina, fibrinogênio e γ -globulina, e podem estar implicadas na patogenicidade de *Acanthamoeba* e na resposta do hospedeiro.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*, prevalência, método de isolamento, patogenicidade, diversidade de proteases.

ABSTRACT

Protozoa of the genera *Acanthamoeba* are one of the most abundant free-living organisms. This microorganisms are found in a wide variety of natural habitats including water, soil, dust, vegetables, hospital units, ventilation areas and sewage. Some species of *Acanthamoeba* are considered opportunistic pathogens, and have been associated with cutaneous infections, keratitis, granulomatous amoebic encephalitis (GAE), among other less frequent diseases. The aim of this study was to evaluate the presence of *Acanthamoeba* in community areas of academic and hospital units, and to determine their potential risk. Samples were collected from two hospitals and two universities of Rio Grande do Sul, Brazil. Amoebas were isolated and characterized using morphological, physiological and genetic methods. Additionally, extracellular proteases variation and specificity was determined by zymogram analysis. The conventional detection and isolation of amoeba from clinical and environmental samples involves sampling and culture on non-nutrient Agar medium. Although efficient, this system requires several transfers in order to eliminate contaminants, and is not appropriate for the isolation of individual amoeba from samples with a biodiverse community. To solve this problem we developed an alternative method that involves sampling, enrichment, encystment induction, and direct cysts micromanipulation and culture on Agar plates. Using the conventional and alternative method, 429 samples from community areas of hospitals and universities were evaluated showing high prevalence of *Acanthamoeba* in both dry (13.77%) and humid (19.29%) environments. Most of this isolates (77.4%) were classified within group II, which includes the great majority of pathogenic species. Isolates exhibited temperature and pH tolerance, as well as resistance to disinfectants. These characteristics may contribute for the maintenance and proliferation of *Acanthamoeba* in the indoor environments, increasing the risk of people contamination. As extracellular proteases are considered one of the most important pathogenic factors of free-living amoeba, ten isolates were evaluated to determined proteases activity, patterns and specificity. Azocasein assays showed significant variation on the overall and specific protease activity in *Acanthamoeba*-conditioned media, independently of the pathogenic or nonpathogenic status of the species. The zymographic assays on gelatin co-polymerized gels showed three banding patterns for *A. castellanii* isolates, and specific profiles for other species. All the proteases secreted by *A. castellanii*, *A. pearcei*, and *A. healyi* were characterized as serine proteases, but only cysteine and metalloproteases were identified in *A. astronyxis*. Some extracellular proteases exhibited important activity on gelatin, fibrinogen and γ -globulin, and may be implicated in *Acanthamoeba* pathogenicity and host response.

Keywords: *Acanthamoeba*, prevalence, isolation method, pathogenic potential, protease diversity.

1. INTRODUÇÃO

Os protistas possuem um importante papel ecológico em sistemas naturais, pois constituem um dos principais componentes dos ciclos biogeoquímicos globais. Caracterizam-se pela capacidade de regular o suprimento e a demanda de carbono orgânico, a ciclagem de nutrientes e o balanço de gás carbônico e oxigênio dentro e entre os ecossistemas. Estão ainda envolvidos na regeneração de alguns constituintes orgânicos celulares (carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo) e podem mobilizar elementos essenciais, como vitaminas, para o crescimento e o metabolismo.

Assim sendo, as amebas de vida livre (AVL) constituem um grupo de protozoários de ampla dispersão ambiental, isoladas em todos os continentes, nos mais diversos habitats. Possuem como uma das suas principais características, juntamente com a ampla distribuição, a resistência a extremas condições de temperatura, pH, produtos químicos e salinidade.

No entanto estes organismos podem ser considerados parasitas oportunistas emergentes, uma vez que possuem a capacidade de invadir o Sistema Nervoso Central (SNC) e outros órgãos, causando morte ou incapacidade permanente. As principais doenças relatadas em descrições clínicas caracterizadas por amebas são: ceratites, meningoencefalite fatal, ulcerações da pele e infecções da córnea. Da grande diversidade de protistas, quatro gêneros de amebas têm sido descritos como parasitos humanos e de animais domésticos: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* e *Sappinia*.

Ainda é importante salientar que, as AVLs, se mostram como carreadoras de outros patógenos emergentes em ambientes hospitalares, dada sua resistência à temperatura e sistemas de desinfecção. Neste aspecto, bactérias endossimbiontes, como *Legionella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* e *Listeria monocytogenes* tem maior possibilidade de proliferação nesses locais.

Dentro dos principais gêneros de interesse clínico já foram descritos casos de doenças e organismos identificados nos Estados Unidos, Bélgica, Inglaterra, Irlanda, Austrália, Nova Zelândia, Papua Nova Guiné, Tailândia, Índia, África Ocidental, Venezuela, Panamá, Coréia, Japão e Peru.

Apesar de já terem sido descritos no Brasil casos de doenças humanas causadas por amebas de vida livre, são poucos os relatos destas em ambientes fechados. Isso se deve, principalmente, a falta de estudos específicos para detecção destes organismos e a dificuldade na descrição e identificação de gêneros e espécies de amebas pelas metodologias tradicionais.

Assim, a utilização de técnicas de Biologia Molecular para caracterização e identificação de AVL em amostras ambientais e clínicas tem sido uma alternativa importante na verificação dos isolados de amebas de vida livre.

Portanto o presente trabalho teve como objetivo estudar a ocorrência de *Acanthamoeba* com potencial patogênico em amostras provenientes de diversos ambientes fechados hospitalares e acadêmicos, através do isolamento, classificação citomorfológica e molecular e determinação dos fatores de patogenicidade, visando contribuir para o conhecimento deste protozoário e estabelecer um método alternativo rápido e eficiente para o isolamento e caracterização de *Acanthamoeba* spp.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Amebas de Vida Livre

As amebas de vida livre (AVL), também chamadas de límax ou anifzóicas, constituem um grupo de protozários de ampla dispersão ambiental, isolados em praticamente todos os ambientes aquáticos, solo e ar. Existem registros de amebas sobreviventes em água doce de locais remotos, sedimentos de oceanos, piscinas, água mineral engarrafada, água da rede urbana, aparelhos de ar condicionado, praias marinhas, vegetais, peixes, répteis, aves, mamíferos, material de diálise, instrumental cirúrgico e lentes de contato, entre outros habitats (Cursons, 1980; Silva & Rosa, 2003). Em seres humanos foram isoladas de cavidade nasal, faringes, intestino, tecidos infectados, cérebro, pulmão, pele e córnea (Stevens et al., 1977; Sawyer, 1989; Rivera et al., 1993; Gautom et al., 1994; Rohr et al., 1998; Barbeau & Buhler, 2001; Sheehan et al., 2003; Silva & Rosa, 2003; Tsvetkova et al., 2004; Morales et al., 2005).

Esses organismos pertencem aos protistas, os quais possuem papel ecológico importante, pois participam dos ciclos biogeoquímicos globais (Ardnt, 1993). Foram isolados em todos os continentes, nas mais diversas altitudes. Resistem a extremas condições de temperatura e de pH, bem como ao cloro e a outros sistemas de desinfestação (Silva & Rosa, 2003).

Durante muito tempo, o estudo das Amebas de Vida Livre esteve restrito ao campo da zoologia, até que Fowler & Carter, em 1965 na Austrália, e Butt, em 1966 nos Estados Unidos, relataram os primeiros casos de meningoencefalite fatal em humanos atribuídos a AVLS e determinaram o início dos estudos aprofundados destes organismos em relação à patogenicidade e a classificação por espécie.

Sabe-se hoje que algumas espécies de amebas de vida livre podem comportar-se como parasitas facultativos de seres humanos e animais domésticos, podendo invadir o SNC e outros órgãos, causando morte ou incapacidade permanente (Martinez, 1985; Giazzi, 1996). As mais importantes espécies de AVLS de interesse médico são: *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba spp*, *Balamuthia mandrilaris* e *Sappinia diploidea* (Silva & Rosa, 2003; Visvesvara, G.S.; Moura, H. & Schuster, F.L. 2007).

2.2 Taxonomia e Morfologia de Amebas de Vida Livre

A ameba comum (*Amoeba sp.*), de água doce limpa, que contenha vegetação verde, serve para uma introdução aos *Protozoas* e aos *Sarcodinas* (*Sarcodes* = carnosos). Este organismo parece ser a forma de vida mais simples do Reino Protista, uma célula independente com núcleo e citoplasma, mas com poucas organelas permanentes. Ela tem sido estudada intensivamente, na esperança de descoberta de alguns aspectos fundamentais da vida. A despeito da sua aparente simplicidade ela pode mover-se, capturar, digerir e assimilar alimento complexo, eliminar resíduos não digeridos, respirar,

produzir secreções e excreções, responder a mudanças (estímulos) de vários tipos, tanto do ambiente interno como do externo, crescer e reproduzir-se (Storer et al., 1998).

Tradicionalmente, as amebas podem ser classificadas de acordo com seu mais notável traço morfológico: seu corpo de frutificação. Baseado nesse argumento, três grupos têm sido propostos nos mais variados trabalhos: *Dictyostelium*, sem ramificação ou com corpo se ramificando lateralmente; *Polysphodylium*, quando o corpo de frutificação consiste de vários verticilos com ramos de tamanhos regulares e iguais e; *Acytostelium*, diferente dos demais grupos, apresenta corpos de frutificação em haste e são organismos acelulares (Raper, 1984; Schaap et al., 2006).

Dessa forma a ameba viva é uma massa de protoplasma gelatinoso, flexível, de forma irregular e passa por frequentes mudanças de forma. Consiste em uma membrana celular externa denominada de plasmalema (elástica, muito fina) e, abaixo desta, existe uma zona estreita de ectoplasma (de coloração clara, não granular) circundando a massa principal do corpo de endoplasma granular. Este consiste de plasmagel externo (mais duro), um plasmassol externo e um plasmassol interno, no qual movimentos de correnteza (ciclose) são visíveis (Storer et al., 1998).

Dentro do endoplasma há um núcleo, não facilmente visível no animal vivo; um vacúolo contrátil esférico, preenchido de líquido, o qual, periodicamente, se move para a superfície, contrai-se, descarrega seu conteúdo na água circundante e então se refaz; um ou mais vacúolos digestivos de vários tamanhos, contendo pequenas porções de alimento em digestão e; vários outros vacúolos, cristais, glóbulos de óleo e outras inclusões celulares, decrescendo em tamanho até o limite de visibilidade microscópica ou mesmo abaixo deste (Storer et al., 1998).

As principais estruturas descritas nas *Amoebas* são: a membrana celular que retém o protoplasma dentro da célula, mas permite a passagem de água, oxigênio e dióxido de carbono; o ectoplasma que dá forma ao corpo celular; o endoplasma que contém as outras estruturas e serve para a locomoção; o núcleo que controla os processos vitais do organismo; o vacúolo contrátil que regula o conteúdo de água; os vacúolos digestivos que contêm alimento em digestão e em outras inclusões celulares que atuam como reservas alimentares ou outros materiais essenciais ao metabolismo (Storer et al., 1998).

A taxonomia tradicional tem sido revisada pela Sociedade Internacional de Protozoologia através de novos marcadores morfológicos, bioquímicos e filogenia molecular. Assim, Marciano-Cabral e Cabral (2003) propuseram a classificação para as Amebas em dois grupos denominados Acantamoebidae e Vahlkampfiidae. Dessa forma, *Acanthamoeba* e *Balamuthia* se encontram no grupo I devido sua similaridade morfológica e genética. Enquanto *Naegleria* representa o grupo II (Figura 01).

Adl et al. (2005) corroboraram com esta classificação em estudo utilizando análises filogenéticas com 16S rDNA, com o acréscimo de *Sappinia* classificada como pertencentes ao grupo *Flabellinea: Thecamoebidae*.

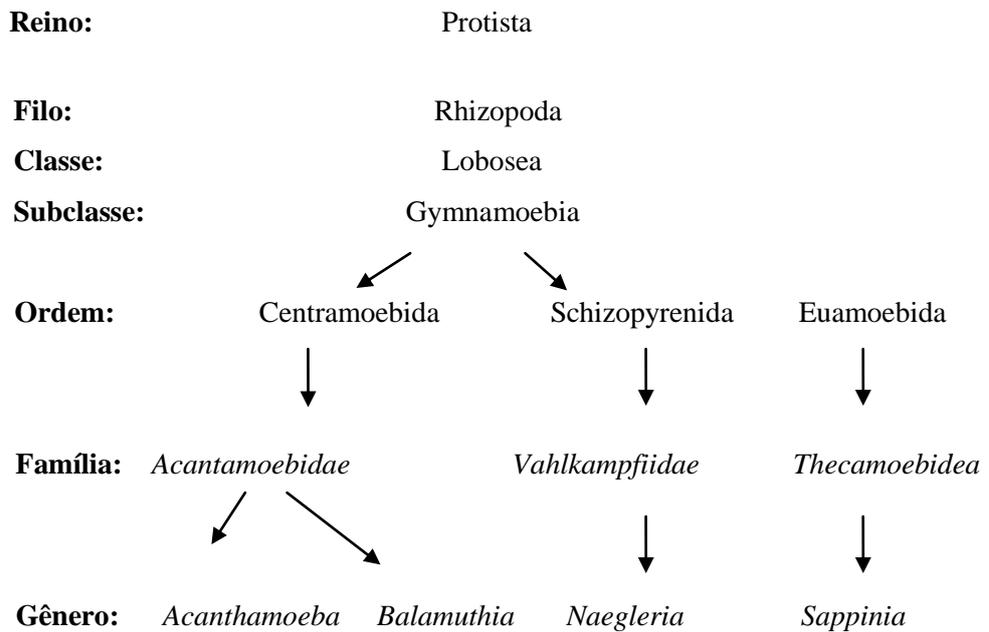


Figura 01: Classificação dos principais gêneros de amebas de vida livre (Marciano-Cabral & Cabral, 2003 e Visvesvara, G.S.; Moura, H. & Schuster, F.L. 2007- adaptado).

2.2.1 Gênero *Acanthamoeba*

As amebas do gênero *Acanthamoeba* apresentam no seu ciclo de vida uma fase trofozoítica, ativa, que se alimenta e se reproduz, e uma forma cística, observada quando as condições são desfavoráveis, como a falta de nutrientes, alterações de pH ou de temperatura e dessecação. O trofozoíto apresenta um tamanho variando entre 20µm a 40µm. Possui um núcleo com um grande cariossoma central, rodeado por halo claro. O citoplasma do trofozoíto de *Acanthamoeba* é abundante e apresenta-se granuloso com movimentos polidirecionais através da emissão de pseudópodos globosos e hialinos, de onde surgem numerosas projeções filiformes (Figuras 02 e 03). Também fica aparente a presença de vacúolos pulsáteis contraíndo-se e ajudando na regulação osmótica (Oddó, 2006; Crozetta et al., 2007).

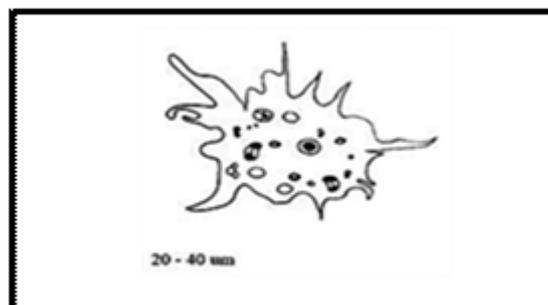


Figura 02: Esquema de um trofozoíto de *Acanthamoeba*, mostrando a presença de acantopódios (Oddó, 2006).

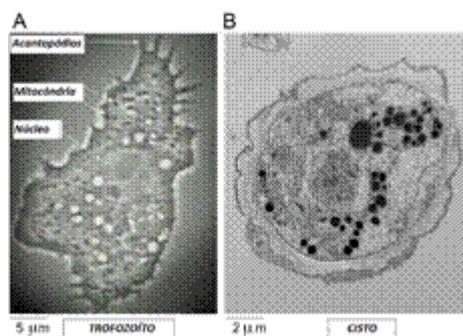


Figura 03: A) Trofozoítos de *Achantamoeba* B) Cistos de *Acanthamoeba* (adaptado de Khan & Siddiqui, 2009).

Os cistos do gênero *Acanthamoeba* apresentam diâmetro variando entre 15µm a 25µm e são uninucleados. São facilmente caracterizados pela parede dupla provida de poros chamados ostíolos (Figura 04).

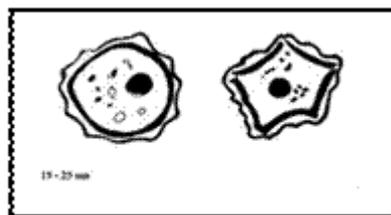


Figura 04: Esquema de cistos de *Acanthamoeba*, mostrando a parede cística dupla, ectocisto e endocisto (Oddó, 2006).

A parede externa ou ectocisto é mais ou menos ondulado e a mais interna ou endocisto pode apresentar-se poligonal, esférico ou estrelado. Os dois envoltórios são separados entre si, mas se unem nos ostíolos (Page, 1967; Giazzi, 1996; Silva, 2001). Ainda cabe salientar que os cistos são resistentes a detergentes, cloro e antibióticos, porém são destruídos pela autoclavagem ou com tratamento por Freon ou óxido de metileno (De Jonckheere & Van de Voorde, 1976; Turner et al., 2000; Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

Em 1977, Pussard & Pons propuseram a divisão do gênero *Acanthamoeba* em três grupos morfológicos baseados no tamanho e na forma dos cistos. Esta classificação que originalmente envolvia 18 espécies abriga atualmente outras 24 amebas (Crozzetta et al., 2007):

Grupo I: Espécies *A. astronyxis*, *A. commandoni*, *A. echinulata*, *A. pearci* e *A. tubiashi* (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Estas espécies são caracterizadas por apresentarem cistos grandes, em relação às do grupo II e III, e não serem patogênicas. Os cistos se caracterizam pela forma estrelada da parede cística interna ou endocisto e a parede externa do cisto ou ectocisto, é esférica (Pussard & Pons, 1977; Silva, 2001; Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

Grupo II: Espécies *A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes*, *A. stevensoni* e *A. triangularis* (Walochnik et al., 2000; Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Seus cistos possuem um tamanho médio, sendo que o endocisto pode apresentar-se de forma estrelada, oval, triangular ou quadrangular. Já o ectocisto segue o contorno do endocisto e são patogênicas com casos reportados clinicamente (Walochnik et al., 2000; Fernandez & Crespo, 1992 *apud* Silva, 2001; Schuster & Visvesvara, 2004).

Grupo III: Espécies *A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. jacobsi*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. postulosa* e *A. royreba* (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Compreende as espécies que também possuem tamanho médio, com endocisto de forma oval ou globosa, nunca estrelado. O ectocisto delgado e liso justaposto ao endocisto é, às vezes, difícil de ser observado (Pussard & Pons, 1977; Silva, 2001; Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

2.2.2 Gênero *Naegleria*

As amebas do gênero *Naegleria* apresentam-se sob três formas: trofozoíto, forma biflagelada e cisto. Os trofozoítos apresentam a forma cilíndrica, medem entre 10 e 30µm, tem um núcleo com cariossoma central grande, excepcionalmente podendo apresentar dois, três e até quatro núcleos (Figura 05). Caracteriza-se por possuir movimentação rápida através de pseudópode do tipo lobópode (único, hialino e de forma variada). Quando se encontram em ambiente onde podem mover-se de forma rápida, emitem um pseudópodo bidirecional, assumindo a forma característica de um “Y” (Crozetta et al., 2007).

No citoplasma de *Naegleria*, são observados vários vacúolos digestivos formados no momento de realizar a fagocitose, assim como vacúolos pulsáteis na periferia da célula com função de osmorregulação. A forma biflagelada pode ser encontrada ao lado dos trofozoítos, apresentando aspecto piriforme, com dois flagelos que emergem do núcleo (Ho-Joon & Kyung, 2004; Silva, 2001; Crozetta et al., 2007).

Os cistos de *Naegleria* são uninucleados, esféricos, poligonais, lisos, providos de poros que, em algumas espécies, não podem ser observados por microscopia óptica, mas cuja existência foi constatada para a maioria das espécies por microscopia eletrônica (Ho-Joon & Kyung, 2004).

Estes cistos podem ser encontrados no meio ambiente, no solo e em culturas envelhecidas (Neves, 2003). Silva & Rosa (2003) determinaram, no estudo da avaliação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeiras de hospitais, que espécies do gênero *Naegleria* preferem ambientes aquáticos, natural ou artificialmente aquecidos e o solo. Dentro do ambiente hospitalar determinaram a ocorrência de 39% de existência do gênero, apesar do cuidado sanitário.

Uma característica particular do gênero *Naegleria* é a existência, em seu ciclo, de uma forma flagelada que, em condições experimentais, consegue-se por hipotonização do meio (Page, 1967). Esta forma possui aspecto piriforme, sem citóstoma e possui dois flagelos (excepcionalmente, três ou quatro). Essa forma é temporária e transitória (Silva, 2001; Ho-Joon & Kyung, 2004).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero podemos encontrar *Naegleria fowleri*, já descrita clinicamente como patogênica humana (Khan, N.A., 2001; Crozetta et al., 2007).

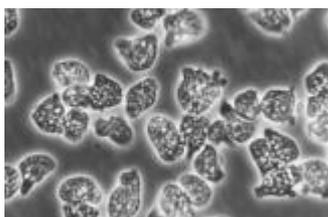


Figura 05: Trofozoítos de *Naegleria fowleri* fotografados por microscopia invertida (Schuster & Visvesvara, 2004).

As espécies deste gênero são difíceis de serem caracterizados morfológicamente, por isso outros métodos são utilizados para tal procedimento: crescimento em meio axênico SCGYEM (meio composto por soro, caseína, glicose e extrato de levedura), temperatura ótima de crescimento, patogenicidade experimental em camundongos, efeito citopatogênico sobre cultura de células, aglutinação com concavalina e identificação via marcadores moleculares (Fernandez & Crespo, 1992 *apud* Silva, 2001).

2.2.3 Gênero *Balamuthia*

O ciclo de vida de *Balamuthia* é reconhecidamente semelhante ao de *Acanthamoeba sp.*, principalmente no aspecto e tamanho dos trofozoítos e cistos. No entanto, os trofozoítos se caracterizam por medir de 15µm a 60µm e apresentam um retículo endoplasmático acentuado, que se move lentamente através de projeções, denominadas de lamelipódios (Figura 06). Seus cistos possuem de 15 a 30µm de diâmetro e uma parede tripla característica do gênero, sem poros, conforme pode ser observado na figura 07 (Oddó, 2006).



Figura 06: Esquema de um trofozoíto de *Balamuthia mandrillaris* (tamanho médio de 15 a 60 µ), com presença dos lamelipódios (Oddó, 2006).



Figura 07: Esquema de um cisto de *Balamuthia mandrillaris* (Oddó, 2006).

Balamuthia é considerada uma ameba de vida livre que pode provocar Encefalite Amebiana Granulomatosa em humanos e outros animais (Dunnebacke et al., 2004). As infecções por *Balamuthia* têm sido reportadas, principalmente, em indivíduos com o estado de saúde comprometido por AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e outros diagnósticos, bem como em indivíduos imunocompetentes (Anzil et al., 1991; Gordon et al., 1992).

2.2.4 Gênero *Sappinia*

Sappinia pedata tem sido isolada do solo e de fezes humanas, alce e gado (Gelmasn, 2003). É considerada uma ameba grande, sendo que a forma trofozoítica mede em torno de 45 a 85µm de diâmetro, apresenta dois núcleos compactos, o que a diferencia dos demais gêneros e a reprodução é considerada sexual. Os cistos apresentam parede fina, medem de 13 a 37µm, são binucleados e não possuem poros. Sobrevivem à ação dos ácidos gástricos e da bile, ao contrário da *Acanthamoeba* e *Negleria* (Schuster & Visvesvara, 2004). São encontradas em todos os continentes e em diversas altitudes e são capazes de resistir a altas temperaturas (Martinez & Visvesvara, 1997; Flisser & Perez, 2006; Tavares & Carneiro, 2009). Como a via de entrada de *Sappinia pedata* não está bem esclarecida, admite-se a disseminação via hematogênica ou por inalação de cistos ou trofozoítos (Gelman et al., 2003).

2.3 Doenças causadas por Amebas de Vida Livre

Segundo Foronda & Campos (1991), o pesquisador Culbertson em 1958, ao detectar numerosas amebas em cortes de cérebro de camundongos que haviam sido inoculados com líquido de cultura de tecido, num estudo sobre vacinação de poliomielite, forneceu uma importante contribuição sobre o conhecimento da patogenia das AVL. Fowler & Carter (1965), na Austrália, e Butt (1966), nos EUA, descreveram os primeiros casos de meningoencefalite por amebas de vida livre em seres humanos.

A partir destes, novos casos foram diagnosticados, apontando as amebas dos gêneros *Naegleria* e *Acanthamoeba* como os principais agentes etiológicos (Page, 1974). No Brasil, Foronda (1976) e Campos et al. (1977) descreveram os primeiros casos desta doença.

A ceratite em humanos, causada por *Acanthamoeba spp.*, foi descrita pela primeira vez na Inglaterra por Jones et al., (1975). No Brasil, os primeiros casos foram relatados por Nosé e colaboradores (1988).

É importante salientar que as infecções cutâneas causadas por *Acanthamoeba* são mais comuns em pacientes com AIDS, com ou sem degeneração do SNC (Helton et al., 1993; Murakawa et al., 1995; Duluol et al., 1996; Casper et al., 1999). Estas doenças cutâneas são também frequentemente documentadas por pacientes não infectados por HIV (Human Immunodeficiency Virus), principalmente reportando casos comprovados de encefalite amebiana. No entanto é mais comum

estes relatos clínicos ocorrerem em pessoas imunocomprometidas, transplantados (Slater et al., 1994, Van Hamme et al., 2001), ou em indivíduos com doenças imunológicas (Martinez, 1982; Visvesvara et al., 1983; Gordon et al., 1992; Slater et al., 1994; Oliva et al., 1999).

Assim, as doenças causadas em seres humanos por AVL são, principalmente, a Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG), a Acantamebíase Cutânea, a Ceratite Amebiana ou Ceratite por *Acanthamoeba* (CA) e a Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP) (Crozetta et al., 2007).

As três primeiras são infecções de curso crônico e evolução prolongada. O período de incubação é ainda desconhecido, mas são necessárias semanas ou meses para estabelecer o período clínico da doença (De Jonckheere, 1991; Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

a) Meningoencefalite Amebiana Primária: seu agente etiológico é comprovadamente *Naegleria fowleri*. É caracterizada por lesões necrotizantes e hemorrágicas do SNC com evolução clínica rápida e fatal, que ocorre principalmente em crianças e jovens saudáveis (Martinez, 1985; Fernandez & Crespo, 1992; Pacheco & Martins, 2008). Essa doença foi diagnosticada em todos os continentes, sendo que o maior número de casos publicados foi reportado nos Estados Unidos e Austrália, com ocorrência predominante nos meses do verão (Tsvetkova, 2004; Crozetta et al., 2007).

A porta de entrada da ameba parece ser a cavidade nasal, por aspiração de água contaminada ou inalação de poeira contendo cistos amebianos. A via de invasão do SNC é o epitélio neuro-olfativo (Martinez, 1985; Fernandez & Crespo, 1992; Silva & Rosa, 2003). O período de incubação varia de dois a três dias, podendo prolongar-se por sete a quinze dias, dependendo da quantidade de amebas inaladas ou aspiradas e da virulência e do parasita. Os primeiros sintomas são: cefaléia intensa e repentina, anorexia, febre, náuseas e vômitos que precedem sinais de irritação meníngea. Em alguns casos, foram observadas faringite e obstrução nasal. Rapidamente, evolui com sinais mais raros de meningoencefalite como transtornos mentais, confusão, sonolência, delírio e posteriormente comatose (Fernandez & Crespo, 1992; Crozetta et al., 2007).

b) Encefalite Amebiana Granulomatosa - é uma doença de curso clínico prolongado, com um quadro subagudo ou crônico, causada por várias espécies de amebas do gênero *Acanthamoeba*, uma espécie do gênero *Balamuthia* (*B. mandrillaris*) e uma espécie do gênero *Sapinia* (*S. diploidea*) (Martinez et al., 1994; Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Dentre as *Acanthamoebas*, as mais frequentes são *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes* e *A. divionensis* (Martinez et al., 1994, Walochnik et al., 2000). É considerada uma infecção oportunista, que ocorre principalmente em indivíduos com imunidade comprometida, alcoólatras, doentes crônicos, pessoas submetidas a tratamento com drogas imunossupressoras e pacientes imunocomprometidos.

Está também, geralmente, associada as outras doenças que provocam alto grau de debilitação ao organismo, como: diabetes, lúpus eritematoso sistêmico, insuficiência renal, cirrose, tuberculose, úlceras de pele, doença de Hodgkin e infecção por HIV (Visvesvara et al., 1983; Anderlini et al., 1994; Murakawa et al., 1995; Sisson et al., 1995 *apud* Silva, 2001; Steenbergen et al., 2001; Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

A porta de entrada da ameba pode ser tanto através do trato respiratório quanto de úlceras de pele (qualquer ferida aberta na superfície do corpo), inclusive através de cateteres de diálise peritoneal (Martinez et al., 1982; Visvesvara & Sther-Green, 1990). A via de invasão no SNC parece ser a hematogênica, a partir do foco primário de entrada da ameba, embora possa ocorrer também por meio do epitélio neuro-olfativo (Fernandez & Crespo, 1992; Martinez et al., 1994).

Dessa forma, o período de incubação da doença não é bem conhecido, podendo ser de semanas a meses. Já foi relatado que alguns pacientes podem apresentar nódulos na pele poucos dias antes do aparecimento dos sintomas neurológicos, devido à disseminação da infecção amebiana (Sisson et al., 1995 *apud* Silva, 2001). Outros pacientes apresentam, inicialmente, infecção respiratória ou gastrintestinal (Martinez & Janitschke, 1985). Os principais sintomas provocados pela encefalite amebiana granulomatosa são: desordens no estado mental, aumento da pressão intracraniana, cefaléia intensa, febre, rigidez da nuca, náuseas, vômitos e um nível diminuído de consciência (Martinez, 1985; Foronda & Campos, 1991). Nas infecções cerebrais algumas áreas são consideradas como mais propícias, como: diencéfalo, hipotálamo e bulbo raquidiano. Nestes casos a deterioração pode ser considerada progressiva, com edema intenso e necrose com presença dos trofozoítos e cistos. Em alguns casos a encefalite se apresenta como um tumor cerebral, chegando a ocupar um espaço bem definido (Pearl, 1990; Sangruchi et al., 1994; Murakawa et al., 1995).

c) Ceratite por *Acanthamoeba* – é considerada a mais comum das doenças provocadas por amebas. Caracteriza-se por ser uma infecção crônica da córnea, causada por várias espécies de *Acanthamoeba*. As amebas identificadas clinicamente são: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. rhysodes* e *A. griffini*. A contaminação pode ocorrer pela água contaminada ou partículas do ar ou solo contendo cistos amebianos (Visvesvara & Sther-Green, 1990).

A infecção é mais frequente entre usuários de lentes de contato, onde as lesões oculares ocorrem provavelmente por meio de um microtraumatismo do olho. Outros segmentos oculares também podem ser invadidos como a câmara anterior. Isso porque, o olho apresenta uma zona circular externa hipervascularizada e uma infiltração córnea. Além disso, pode aparecer, simultaneamente, uma uveíte com posterior ulceração supurativa, com zona necrótica e edema de estroma. O exame anatomopatológico da córnea revela a presença de um infiltrado de polimorfonucleares e uma zona hipervascularizada onde podem ser vistos trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* (Visvesvara & Sther-Green, 1990; Fernandez & Crespo, 1992; Obeid et al., 2003; Ruthes et al., 2004).

Segundo Alvarenga e colaboradores (2000), as lentes de contato podem levar à ruptura epitelial, facilitando a adesão amebiana à córnea, além de agirem como carreadoras dos organismos infectantes, uma vez que as amebas podem estar aderidas a elas (Figura 08). Os sintomas mais comuns da ceratite por *Acanthamoeba* são fotofobia, opacidade da córnea, dores intensas (normalmente desproporcionais à gravidade aparente das lesões) e, diminuição da visão (Illingworth & Cook, 1998).

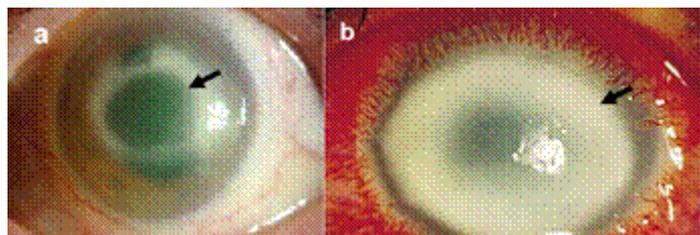


Figura 08: Aspecto da ceratite amebiana. A) Anel infiltrado em estágio inicial. B) Anel de infiltrado em ceratite em estado avançado (cinco meses depois do início dos sintomas) (Cooke, 2008; Pens et al., 2008).

Na fase precoce da infecção, os achados são erosões epiteliais pequenas, edema microcístico envolvendo o epitélio corneal, conferindo a este um aspecto grosseiro em regiões esparsas. Com progressão da infecção, ocorrem alterações do epitélio, apresentando lesões na forma de um dendrito. A limbite, o infiltrado perineural, o infiltrado em anel e os infiltrados subepiteliais são achados típicos na ceratite amebiana (Alvarenga et al., 2000).

Um dos problemas mais sérios e preocupantes nas infecções oculares por *Acanthamoeba* é a deficiência de um diagnóstico rápido e correto. A porcentagem de um diagnóstico errado costuma ser muito alta. Na maioria dos casos, o diagnóstico efetuado refere-se à presença de herpes, fungos e bactérias. A presença de *Acanthamoeba* muitas vezes só é detectada através de raspado ou biópsia corneana, somente após a remoção da córnea (Illingworth & Cook, 1998; Schaumberg et al., 1998). Em muitos desses casos foi realizada ceratoplastia sem sucesso devido à recidiva da infecção, levando à necessidade de remoção do globo ocular.

Por este motivo, técnicas de Biologia Molecular têm sido veiculadas como ferramentas importantes no estudo e na aplicação do diagnóstico exato de ceratite amebiana de forma rápida e precisa. Assim, apesar da existência de uma ampla variabilidade de genótipos de *Acanthamoeba*, descritos e detalhados no item 2.6, apenas os isolados dos genótipos T2, T3, T4, T6 e T11 têm sido associados com a ceratite (Walochnik et al., 2000; De Jonckheere, 2003). Dentre estes genótipos, o caracterizado como T4 apresenta dominância de 90% nos casos de ceratite causadas por *Acanthamoeba* spp. Desta forma, podemos definir sete espécies mais frequentemente associadas a infecções oculares: *A. castellanii* (T4), *A. lugdunensis* (T4), *A. polyphaga* (T4), *A. rhysodes* (T4), *A. culbertsoni* (T3), *A. hatchetti* (T11), *A. griffini* (T3) (Yu et al., 2004).

Mesmo após um diagnóstico correto, outro problema é determinar um tratamento eficaz, uma vez que as amebas desse gênero, especialmente quando na forma de cistos, mostram-se bastante resistentes a uma série de quimioterápicos (Lindquist, 1998; Schaumberg et al., 1998).

É importante salientar que as *Acanthamoebas* aderem-se às glicoproteínas manosiladas, expostas em alguma lesão do epitélio córneo, através de uma adesina. O contato com a manose induz o trofozoíto a produzir uma protease extremamente citotóxica e citolítica para o epitélio córneo,

iniciando a invasão córnea (Muñoz et al., 1982; Huston, 2004).

Os trofozoítos penetram então pela membrana de Bowman e invadem o estroma. Em seguida a ameba produz várias proteases como: serino-protease, cisteíno-protease, elastase e metaloprotease (Hadas & Mazur, 1993; Marciano-Cabral & Cabral, 2003), as quais podem ser identificadas facilmente por avaliação de proteases através da ferramenta molecular de análise de proteínas (SDS-PAGE).

A atividade das enzimas vai produzir a lesão característica da infecção (Fig.8): o infiltrado em forma de anel (He et al., 1990). A dor associada com a ceratite amebiana é causada pela ação das enzimas sobre o tecido nervoso da córnea e dos tecidos adjacentes, que podem ser induzidos a apoptose (Pettit et al., 1996).

O tratamento pode recorrer através de vários agentes:

- Antimicrobianos: geralmente são os primeiros recursos a serem usados contra a *Acanthamoeba* (Auran et al., 1987; Bacon et al., 1993). Entretanto, devido à sua capacidade de formação de cistos podem facilmente tornar-se resistentes ao tratamento.

Os principais antimicrobianos utilizados são: A) Aminoglicosídeos: o principal recurso utilizado no tratamento de *Acanthamoeba* é a neomicina e a paramomicina que inibem a síntese protéica, sendo constantemente utilizados em conjunto com outros agentes; B) Imidazoles: têm função de desestabilizar a parede celular (cisto), sendo utilizados em conjunto com os aminoglicosídeos. Os exemplos mais comuns são o clotrimazol, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e o miconazol. A terapêutica é mantida entre 6 a 12 meses (Auran et al., 1987); C) Antiparasitários: seu uso também já foi relatado no tratamento de ceratite amebiana como o metronidazol (Boccacio et al., 1997).

- Anti-sépticos catiônicos: são conhecidos inibidores das funções de membrana e um tratamento por vezes eficiente contra a infecção amebiana (Auran et al., 1987), sendo efetivos contra trofozoítos e parcialmente contra cistos (digluconato de clorhexidina e biguanida polihexametileno/PHMB) (Larkin & Easty, 1990). Além disto, em conjunto com outros antimicrobianos como a hexamidina, pentamidina ou o isotionato de propamidina (Brolene®) que agem inibindo as sínteses de DNA têm sido reportados como o melhor tratamento em relação à ceratite amebiana.

- Corticóide tópico: geralmente tem seu uso associado com a terapia antimicrobiana, no entanto sua aplicação é controversa (Scully et al., 1985; Illingworth et al., 1995). Alguns estudos reportaram a redução de formação de cistos *in vitro*, porém estes resultados não são reproduzidos *in vivo* (Moore & McCulley, 1989; Illingworth et al., 1995). Assim, seu uso faz-se somente após a melhora clínica do quadro com o uso de anti-amebianos (Wysenbeek et al., 2000).

2.4 Ciclo de vida de *Acanthamoeba*

De forma geral, quando as amebas atingem certo tamanho, dividem-se por fissão binária. O corpo celular torna-se esférico e coberto por pseudópodos curtos, que depois se alonga e finalmente o

organismo divide-se em duas partes. Enquanto isso, o núcleo já se dividiu por mitose. Ainda é importante salientar que, em condições ordinárias de laboratório, é possível fazer com que a ameba divida-se em poucos dias e a mitose ocorra em torno de 33 minutos a uma temperatura controlada de 24°C (Storer et al., 1998).

Segundo Ferrante (1991), a única forma em que as amebas são consideradas invasivas é o trofozoíto. Os cistos não são invasivos, mas são potencialmente infectivos, já que podem se converter para a forma vegetativa rapidamente sob condições apropriadas.

Assim, o ciclo de vida das *Acanthamoebas* desenvolve-se em duas fases: uma fase trofozoítica em que a *Acanthamoeba* se alimenta e se multiplica de forma ativa, ou seja, a própria forma invasiva e uma fase cística ou de resistência que as amebas adquirem quando as condições do meio são favoráveis ao encistamento (Figura 09).

Os trofozoítos de *Acanthamoeba spp.* podem penetrar através da pele lesada, pelas vias geniturinárias (Iglésias, 1997), pelo epitélio neuro-olfativo (Silva & Rosa, 2003) e pela córnea lesada, devido ao uso de lentes de contato contaminadas ou pelo contato com água e soluções salinas caseiras contaminadas (Alvarenga et al., 2000). Podem chegar ao SNC por via hematogênica ou via epitélio neuro-olfativo. Os cistos são encontrados em ambientes variados, inclusive nos tecidos humanos (Neves, 2003; Silva & Rosa, 2003).

O estágio de vida ativa de *Acanthamoeba* (trofozoíto) varia de tamanho em torno de 25 a 40µm. Esta variação pode estar associada às condições de crescimento e/ou à espécie. Assim os diâmetros maiores são: 21 a 45µm para *A. castellanii*, 25 a 60µm para *A. astronyxes*, e 14 a 41µm para *A. polyphaga* (Oddó, 2006).

Em preparações frescas, o trofozoíto amebóide das diferentes espécies de *Acanthamoeba* é irregular e apresenta múltiplas projeções pseudopodiais retráteis, filamentosas ou espinhosas (Acantopódios). Alimentam-se de bactérias, algas e leveduras distribuídas no ambiente em que estão alojadas, mas também podem sobreviver axenicamente em relação aos nutrientes líquidos ingeridos por meio dos pinocistos (Bowers & Korn, 1968; Bowers, 1977; Kahn, 2006).

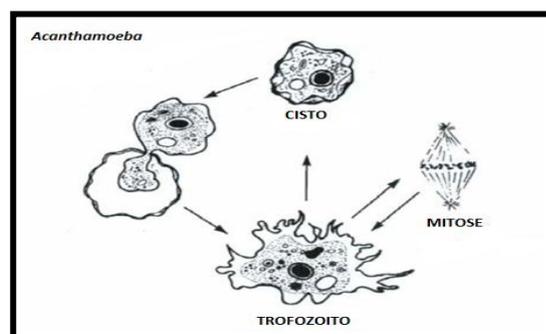


Figura 09: Ciclo biológico de *Acanthamoeba* (adaptado de Rivas, 2002).

Nos tecidos infectados, os trofozoítos de *Acanthamoeba sp.* são sempre ovóides e os contornos ligeiramente irregulares, de parede delgada, citoplasma granular e vacuolado, com um único núcleo esférico, anfólico e um nucléolo central proeminente hematofílico com um cariossoma. O citoplasma ainda possui numerosos vacúolos alimentares distribuídos em torno do núcleo. Às vezes, estes mesmos vacúolos podem ser contráteis e esvaziam seu conteúdo aquoso em intervalos de 40 a 50 segundos (Oddó, 2006).

Segundo Alves (2001), a parede dos cistos de *Acanthamoeba sp.* são compostas por celulose e diversas proteínas. Apresentam ainda um opérculo, o qual se caracteriza por ser um ponto determinado do cisto por onde a ameba sai ao desencistar, assim que as condições ambientais forem mais favoráveis.

Ainda é importante destacar que no estágio de trofozoíto as *Acanthamoebas* podem ser mantidas com suplementação abundante, pH neutro, temperatura apropriada (30°C) e osmolaridade entre 50-80 mOsmol. No entanto, condições desfavoráveis (falta de alimento, aumento da osmolaridade ou hipo-osmolaridade, extremos de temperatura ou pH) induzem a transformação do trofozoíto no estágio cístico (quando necessita de menos atividade metabólica) (Kahn, 2006).

Durante o crescimento exponencial das células, há uma predominância da fase G2 da mitose (ocupando aproximadamente 90% do ciclo) e uma fase G1 curta. Ainda na mitose 2 a 3% é ocupado pela fase S, responsável pela síntese do novo material (Band & Mohrlök, 1973; Byers et al., 1990, Byers et al., 1991).

2.4.1 Mecanismo de infecção

Para que a *Acanthamoeba* possa manifestar seus efeitos citopáticos sobre seu hospedeiro, este organismo requer uma série de processos prévios como: adesão às células ou superfícies epiteliais, secreção de proteases para desorganização dos tecidos e fagocitose celular.

Já foi observado que a fixação é um dos passos cruciais para a patogenicidade da ameba. Portanto, é característica importante dos organismos não patogênicos apresentarem níveis muito baixos de adesão às células do seu hospedeiro (Yang et al., 1997; Khan et al., 2000).

O mecanismo com que a *Acanthamoeba* ultrapassa a barreira hemato-encefálica é muito complexa e geralmente envolve determinantes existentes no parasita (adesinas, proteases, fosfolipases) e no hospedeiro (receptor interleucina β , fator tumoral de necrose α , interferon γ). O sucesso no aumento da permeabilidade devido à indução de fatores de apoptose das células endoteliais cerebrais possibilita a total invasão do parasito no SNC (Khan, 2008).

Dessa forma, outras estruturas presentes no organismo também são importantes no auxílio da fixação das *Acanthamoeba*. O número de acantópódios que uma ameba apresenta está relacionado com sua capacidade de adesão. As amebas patogênicas apresentam mais de 100 tipos desta estrutura por célula (Khan et al., 2000). A capacidade do parasito em aderir-se ao epitélio celular será, portanto,

um pré-requisito para o estabelecimento da doença e também um importante fator de virulência, capaz de determinar a patogenicidade das cepas (Van Klink et al., 1992; Alsam et al., 2003).

Dessa forma, o mecanismo do processo de adesão ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que glicoproteínas e glicolipídios de membrana celular facilitam a união dos trofozoítos de *Acanthamoeba*, como ocorrem no caso de muitas bactérias, fungos e outros protozoários patogênicos (Panjwani et al., 1992).

Geralmente a adesão é mediada por uma manose presente na membrana do parasita (Yang et al., 1997; Alsam et al., 2003; Garate et al., 2004). Já foi possível caracterizar *in vitro* que, aumentando a concentração desta manose nas células do epitélio corneal também ocorre a lise das mesmas, induzindo os trofozoítos a liberarem fatores citolíticos, principalmente colagenolíticos e serinoproteases. No entanto, foi importante a verificação de que o possível emprego de outros tipos de açúcares, como a lactose, não apresenta a reprodução do mesmo efeito (Leher et al., 1998).

Dessa forma, as enzimas proteolíticas têm uma grande importância no desenvolvimento da patogenicidade de *Acanthamoeba*. Assim dentre as enzimas que possuem maior relevância estão associadas às fosfolipases e as neuramidases, sendo que as cepas virulentas produzem maiores quantidades desta última enzima (Pellegrin et al., 1991).

Existem diferentes teorias sobre os processos de invasão dos trofozoítos:

- O mecanismo denominado como processo de trogocitose ou *picemeal nibbling*: caracteriza-se por ser um mecanismo de transferência intercelular de fragmentos de membrana e de moléculas que dependem do contato entre as amebas (Marciano-Cabral & John, 1986);

- a invasão por meio através de fagostomas ou copas alimentícias: cujo processo ocorre por meio da interação de distintas enzimas hidrolíticas (Marciano-Cabral & John, 1986; Moore et al., 1991);

- processo de lise celular: ocorre a liberação dos trofozoítos e não existe a possibilidade de realização da trogocitose e;

- mediante sistemas combinados: em que podemos em geral observar conjuntamente a citólise com a digestão de células inteiras. No entanto, é provável que a *Acanthamoeba* seja capaz de adaptar seu método de colonização e invasão em função da superfície celular que encontra-se fixada (Taylor et al., 1995; Leher et al., 1998).

Na citólise estão implicados elementos do citoesqueleto amebiano, relacionados com a mobilidade e com a fagocitose, sendo que sua desorganização interfere nos mecanismos líticos. Isto pode ser observado ao tratar os trofozoítos com certos inibidores do citoesqueleto, como é o caso da citocalasina D. Em condições normais de cultivo celular, os trofozoítos de *Acanthamoeba* podem lisar, após uma hora de incubação, 81% das células, enquanto que na presença de citocalasina D a citólise decai para 54% das células. Se a incubação com este inibidor se prolongar durante três horas, a lise tende a afetar 17% das células do cultivo (Taylor et al., 1995; Khan, 2008).

Os trofozoítos de *Acanthamoeba* podem infectar células normais e tumorais de mamíferos empregando o mecanismo de citólise. Tal mecanismo se parece às células agressoras naturais denominadas de Linfócitos T Citotóxicos. Outras amebas, como *Naegleria* e *Entamoeba*, também possuem a mesma semelhança (Young et al., 1982). Geralmente atuam provocando a formação de poros na membrana da célula, alterando a pressão osmótica da mesma, provocando sua desorganização iônica e induzindo a morte (Krahenbuhl & Tschopp, 1991). A citólise ou morte celular é calcio-dependente, favorecendo-se, portanto, quando os canais de cálcio são ativados, e inibindo-se, quando estes se bloqueiam (Taylor et al., 1995).

Os trofozoítos de *Acanthamoeba* são também capazes de induzir apoptose. Células normais ou tumorais de mamíferos, expostos a trofozoítos ou aos extratos aquosos de suas células mortas, apresentam aspectos morfológicos característicos do estado de apoptose, como flacidez celular, desorganização da membrana, formação de corpos apoptóticos, condensação nuclear e presença de DNA fragmentado (180 a 200bp) (Alizadeh et al., 1995).

As amebas do grupo da *A. culbertsoni* são capazes de induzir apoptose nas células neurogliais, o que poderia ter importância para o esclarecimento da interação de *Acanthamoeba* patógenas com células nervosas, principalmente no desenvolvimento da Encefalite Granulomatosa Amebiana (Shin et al., 2000). Estudos *in vitro* demonstraram que os trofozoítos apresentam respostas quimiotáticas potentes em extratos de células neuronais e células originárias da crista neural (Pidherney et al., 1993) provocando a citólise direta ou apoptose de células nervosas (Pettit et al., 1996).

Já é determinada que a avaliação *in vitro* de culturas primárias de células endoteliais microvasculares do cérebro humano tem sido identificadas e caracterizadas por determinantes moleculares desta região que são requeridos pela interação parasito-hospedeiro (Stins et al., 1997; Alsam et al., 2003).

Assim, os marcadores comuns a serem testados como respostas diretas na infecção por *Acanthamoeba* e, geralmente reportados na maior parte das amostras com infecção por este organismo são: fator VIII, anidrase carbônica, aglutinina I e transpeptidase β -glutamil.

Em adição serinas proteases dos tipos I, III e IV (colágeno, elastina e fibronectina) que são componentes da matriz extracelular, podem degradar enzimas proteolíticas da matriz extracelular do hospedeiro (fibrinogênio, IgG, IgA, albumina, plasminogênio e a hemoglobina). Desta forma, facilitam a migração de *Acanthamoeba* pelo sistema circulatório no interior do cérebro, facilitando a invasão e provocando uma resposta imunológica do hospedeiro (Kong et al., 2000; Sissons et al., 2006).

2.4.2 Resposta Imune

Mais de 50% da população apresenta anticorpos frente à *Acanthamoeba*, o que indica ser este um organismo comum em nosso meio (Cursons et al., 1980; Cerva, 1989; Niederkorn et al.,

1999). Os mecanismos de defesa que se desenvolvem no ser humano estão relacionados com os processos de citólise e ação celular, tanto de macrófagos, como de neutrófilos, ambos mediado pelo Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e o Interferon gama (IFN- γ); favorecidos pela presença de anticorpos específicos (Berke, 1991; Van Klink et al., 1996).

No entanto, o papel exato dos neutrófilos durante o desenvolvimento da resposta imune ainda é desconhecido. Mas, é possível encontrá-los em análises histológicas em número elevado principalmente em úlceras cutâneas e em córneas de pacientes com ceratite. Sua atividade pode ser influenciada pela presença do TNF- α (Ferrante, 1991). Dessa forma, já foi possível a verificação que estes possuem um papel importante na eliminação de *Acanthamoeba* durante a infecção da córnea, através da constatação em animais de experimentação (diminuição do número de neutrófilos diretamente proporcionais ao aparecimento precoce da patologia) (Hurt et al., 2001).

Assim, é importante caracterizar que são os macrófagos que desempenham a função de primeira defesa na eliminação dos trofozoítos. Observou-se que o desaparecimento dos macrófagos conjuntivos favorece o aumento da incidência da infecção, agravando a enfermidade e determinando que se acelere o início da ceratite de curso mais prolongado (Stewart et al., 1992).

Experimentos *in vitro* mostram que anticorpos específicos são capazes de ativar o ciclo lítico da célula, ainda que se observe que o mecanismo de reações em cascata do mesmo também pode ativar-se frente aos próprios trofozoítos de *Acanthamoeba*. Isto é possível devido a presença de proteínas reguladoras do complemento, como o CD55, pois na composição da lágrima e do epitélio corneal é ativado o complemento de forma local, protegendo a célula humana dos trofozoítos de *Acanthamoeba* mediante ação lítica (Ferrante & Rowan-Kelly, 1983; Toney & Marciano-Cabral, 1998).

Em modelos animais, após a infecção corneal não se tem conseguido detectar níveis de IgG sérica e reação de hipersensibilidade retardada. A imunização sistêmica por aplicação intramuscular provoca este tipo de resposta, mas não previne o desenvolvimento da ceratite por *Acanthamoeba*. Ainda na tentativa de imunização, alguns estudos empregaram a combinação da aplicação subconjuntival com a intramuscular do parasita. Dessa maneira podem-se alcançar taxas de maior grau de imunização das vias testadas. Entretanto, na presença de infecção corneal a imunização total acontece somente na mucosa ocular. Permitindo a detecção de anticorpos anti-*Acanthamoeba* específicos do tipo IgA na lágrima (Alizadeh et al., 1995; Niederkorn, 2002).

Os mecanismos de defesa imunológicos que atuam contra *Acanthamoeba* ainda não estão bem elucidados. No entanto, já foi relatado que as amebas são resistentes inclusive a antibióticos, sendo encontradas até mesmo em amostras de pacientes assintomáticos (Cursons et al., 1980; Cerva, 1989; Newsome et al., 1992, Powell et al., 1994; Marciano-Cabral et al., 2000; Chappell et al., 2001).

Apesar da presença de cistos e trofozoítos de amebas no meio ambiente serem elevadas, a incidência de infecção é reduzida. Alguns casos são reportados clinicamente com algumas espécies de amebas patogênicas. Em adição, *Acanthamoebas*, têm sido frequentemente isoladas da nasofaringe de

pacientes saudáveis (Rivera et al., 1984; Badenoch et al., 1988; Cerva, 1989; Rivera et al., 1991; Newsome et al., 1992; Michel et al., 1994). Dessa forma, este organismo é responsável por causar infecções transitórias nestes indivíduos e estimular o sistema imune do hospedeiro.

A resposta imune celular às infecções oculares provocadas por *Acanthamoeba* tem sido estudada num número limitado de pacientes humanos e em animais experimentais (Mathers et al., 1987; Kremer et al., 1994). Macrófagos e neutrófilos são os principais tipos de células inflamatórias encontrados em tecidos que circundam amebas ou cistos. Estudos avançados têm demonstrado, em dois pacientes com inflamação crônica (ceratite amebiana), que tiveram seus tecidos infectados avaliados por microscopia eletrônica e imunohistoquímica, a identificação exata dos tipos de células envolvidas na resposta imune. O uso específico de anticorpos monoclonais marcadores de superfície da célula demonstram que o estroma da córnea é caracterizado por ter leucócitos polimorfonucleares e macrófagos com ausência de linfócitos estromais (Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

Dessa maneira, Larkin & Easty (1990, 1991) demonstraram em estudos com ratos Wistar que foram inoculados com *A. polyphaga*, diretamente no interior do estroma corneal, uma intensa resposta inflamatória insidindo com a presença de neutrófilos e macrófagos. O papel das células imunes pode ser alterado durante a progressão e o avanço da doença. Inicialmente, neutrófilos são proeminentes nos locais da infecção, no entanto, macrófagos tendem a se acumular em lesões mais tardias (Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

Dessa maneira é importante caracterizar como a infecção por amebas pode ser prevenida. A principal forma de realizar a profilaxia é através da educação da população a respeito do perigo de nadar em ambientes com águas que apresentam deficiência no saneamento básico, sendo mais facilmente transmitida a infecção.

Devem-se evitar parques aquáticos, piscinas e similares sem notícia prévia de tratamento adequado. Assim, a recomendação adequada da manutenção de condições higiênicas básicas, como a tentativa da eliminação da matéria orgânica e o tratamento da água com cloro, podem auxiliar na diminuição da concentração de formas viáveis dessas amebas (Pacheco & Martins, 2008).

É de grande importância no programa de profilaxia o papel dos oftalmologistas na orientação quanto ao uso das lentes de contato, na limpeza, manuseio e armazenamento, evitando assim o uso de soluções não salinas e não estéreis (Obeid, 2003).

2.5 Fatores de Patogenicidade de *Acanthamoeba*

A capacidade patogênica do gênero *Acanthamoeba*, a resistência a desinfetantes e aumento da prevalência em infecções sugere a importância da caracterização dos fatores de patogenicidade destes organismos. Dessa forma, os principais fatores de virulência em *Acanthamoeba* dividem-se em fatores diretos e indiretos (Khan, 2006):

Fatores Diretos:

A) Mecanismos dependentes de contato: caracteriza-se pela habilidade de invasão da *Acanthamoeba* na célula hospedeira, provocando eventos secundários, como a interferência nas sinalizações intracelulares das células do hospedeiro, secreções de proteínas e a habilidade de fagocitar as células do hospedeiro levando estas células à morte.

- Adesão: A aderência é uma importante propriedade para a colonização dos parasitos nas células do hospedeiro. Assim, Morton et al., (1991) demonstraram que a ligação inicial de *Acanthamoebas* às células epiteliais da córnea de coelhos é mediada por uma ameba adesina, isto é, uma MBP, expressa na superfície do parasita. Dessa forma, determinou-se que o início da ligação é dependente da expressão da MBP. Essa proteína transmembrana é composta de glicoproteínas e manoses, com peso molecular de 400KDa e constituída de múltiplas subunidades de 130KDa (Yang et al., 1997; Garate et al., 2004). A MBP é caracterizada como a responsável pela adesão do parasita na célula do hospedeiro como também pela indução do efeito citopático (Garate et al., 2005).

Khan (2006), sugere que a MBP de *Acanthamoeba* é a proteína responsável pela sua propriedade patogênica e pode servir como importante marcador de virulência. De acordo com a classificação dos grupos genéticos de *Acanthamoeba*, definiu-se que existe correlação direta entre os genótipos e o grau de patogenicidade, no entanto estes fatores ainda não estão bem esclarecidos.

- Fagocitose: a fagocitose é estimulada pelo início da infecção das células hospedeiras por *Acanthamoeba*. Dessa forma, a fagocitose caracteriza-se como um processo de engolfamento das células hospedeiras e partículas de alimentos, incluindo formas circulares de látex (Dearborn & Korn, 1974; Avery et al., 1995), bactérias (Preston & King, 1984) e leveduras (Bowers & Olszewski, 1983; Allen & Dawidowicz, 1990). A habilidade da *Acanthamoeba* para formar aglomerados de alimentos, denominados de amoebastomas, durante a incubação com células hospedeiras sugere que ela tem um papel importante na patogenicidade de *Acanthamoeba* (Khan, 2006). Assim, determinou-se que a adesão por MBP e a fagocitose de *Acanthamoeba* são mecanismos cruciais para o início da infecção à célula hospedeira e a determinação da patogenicidade destes organismos (Allen & Dawidowicz, 1990; Alsam et al., 2005; Khan, 2006).

- Ecto-ATPases: As Ecto-ATPases são glicoproteínas presentes na membrana plasmática. Quando estas proteínas extracelulares são hidrolisadas o ADP (Adenosina difosfatada) é formado (Sissons et al., 2004). Este ADP pode ter efeitos tóxicos na células hospedeiras, sugerindo que as ATPases possuem um importante papel na patogênese de *Acanthamoeba*.

B) Fatores independentes de contato: para produzir danos às células hospedeiras e/ou aos seus tecidos, a maioria dos patógenos possui a habilidade de produzir enzimas hidrolíticas. Essas enzimas podem ser constitutivas, como as requeridas para rotina de funções celulares, ou induzíveis, como são as produzidas em condições específicas, por exemplo, no contato com a célula alvo. Essas enzimas podem ter um efeito devastador nas células hospedeiras, causando disfunção na membrana ou ruptura física (Khan 2006).

- Proteases: são bem conhecidas como fatores de virulência em vírus, bactérias, protozoários e patógenos multicelulares. Essas enzimas possuem ligações peptídicas e exibem a habilidade para degradar vários substratos.

Nesse sentido, as *Acanthamoebas* são conhecidas por secretarem uma grande quantidade de proteases. Interessantemente, tanto os isolados clínicos como não clínicos, possuem intensa atividade proteásica, mas são observadas formas e proporções diferenciadas. Isso sugere que o principal papel fisiológico das proteases é a possibilidade de degradação de substratos para fins de alimentação. Tal mecanismo reforça a idéia de que as *Acanthamoebas* são primeiramente organismos de vida livre e que, secundariamente podem ser organismos oportunistas através de seu papel nas infecções humanas/animais (Khan, 2006).

Dessa forma, as proteases mais comumente secretadas por *Acanthamoeba* são: aspártica, cisteína, serina e metaloproteases (Khan, 2006). Todos os isolados de *Acanthamoeba* estudados mostram uma maior atividade serina protease em todos os genótipos determinados. No entanto, os estudos demonstram a diferença de peso molecular das serinas proteases excretadas por *Acanthamoeba* de acordo com o genótipo definido pela amostra (Hadas & Mazur, 1993; Mitro et al., 1994; Mitra et al., 1995; Cao et al., 1998; Alfieri et al., 2000; Khan et al., 2000).

Determinou-se em estudo de He et al. (1990), um papel funcional direto da serina protease na infecção de *Acanthamoeba* injetada por via intraestromal, resultando na produção de lesões corneais similares àquelas observadas em pacientes com ceratite avançada por *Acanthamoeba*.

Em adição, as serinas e cisteínas possuem atividade de metaloproteases em *Acanthamoebas* (Mitro et al., 1994; Alfieri et al., 2000). Todos os estudos demonstram que a ameba exibe diversas proteases e elastases, que possuem um papel importante na infecção de *Acanthamoeba*. No entanto, o modelo preciso de ação ao nível de molécula não está totalmente elucidado (Ferrante & Bates, 1988).

- Fosfolipases: é um grupo diversificado de enzimas hidrolases unidas por ligações glicerofosfolipídeos que podem causar disfunção na membrana. As cinco fosfolipases mais comuns são: A1, A2, B, C e D; e cada uma tem a habilidade de clivar de forma específica ligações ester do substrato no alvo da membrana. As principais ações dessas enzimas são: possível papel na disrupção da membrana, penetração nas células hospedeiras, lise celular e interferência na sinalização intracelular. Assim, estudos sugerem que as fosfolipases e/ou lipofosfolipases de *Acanthamoeba* possuem papel direto no risco das infecções para as células hospedeiras assim como indução da resposta imune e facilidade de virulência de *Acanthamoeba* (Khan, 2006).

Fatores Indiretos

- Tolerância à temperatura e osmolaridade: ao entrar em contato com a lágrima e células epiteliais da córnea, *Acanthamoeba* se expõem à alta osmolaridade (salinidade da lágrima), bem como a altas temperaturas. Para que a transmissão ocorra com sucesso, as amebas devem se tornar tolerante, exibindo crescimento normal. O crescimento a altas temperaturas e alta osmolaridade são descritos

como extremamente importantes para a patogênese de *Acanthamoeba* (De Jonckheere, 1983; Walochnik et al., 2000; Khan et al., 2001; Khan et al., 2002).

- Tolerância a diferentes pHs: a patogenicidade de *Acanthamoeba* pode ocorrer em faixas de pH de 4 a 12, visto seu potencial de crescimento em diferentes condições ambientais (Khan, 2006).

- Morfologia: As diferentes formas de vida apresentadas por *Acanthamoeba* (cistos e trofozoítos) são consideradas mecanismos associados ao poder patogênico deste organismo. Os cistos são resistentes a vários agentes antimicrobianos, condições adversas de temperatura, pH e osmolaridade (Weisman, 1976; Byers, 1979; Cordingley et al., 1996; Turner et al., 2000). Dessa forma, cistos de *Acanthamoeba* podem sobreviver durante muitos anos mantendo suas características patogênicas (Mazur et al., 1995).

- Resistência a drogas (desinfetantes): os trofozoítos de *Acanthamoeba* são considerados sensíveis a maior parte dos agentes químicos, enquanto os cistos mostram alto grau de resistência aos desinfetantes do tipo biguanidinas, compostos quaternários de amônia, cloro, dióxido de cloro e peróxido de hidrogênio (Coulon et al., 2010).

- Ubiquidade: a ampla dispersão de *Acanthamoeba* e sua habilidade em sobreviver nos diferentes habitats também caracterizam o potencial patogênico desta espécie (Khan, 2006).

- Biofilmes: caracterizam-se por serem expansões de colônias microbianas sob superfícies aquosas ou algum material de origem médico, como, cateteres, lentes de contato, material de lentes intraoculares. Dessa forma, possuem um papel importante na patogênese das ceratites por *Acanthamoeba* (Khan, 2006).

2.6. Método Molecular na determinação de Acanthamoebas

As técnicas moleculares para identificação de AVLS têm sido utilizadas não somente para auxiliar no diagnóstico de infecções humanas, mas também para identificar os genótipos destes organismos em amostras ambientais e clínicas (Lehman et al., 1998; Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

Assim, a focalização isoelétrica de enzimas foi uma das primeiras técnicas moleculares aplicadas na tentativa de identificação de *Acanthamoeba spp.* No entanto, estudos de isoenzimas sugerem que os agrupamentos desse organismo não são consistentes quando levado em consideração somente essa ferramenta molecular (Pussard & Pons, 1977; Costas & Griffithes, 1980; Mathews et al., 1983). Já os trabalhos realizados por meio de análises de Aloenzimas e Proteínas Totais permitiram concluir que *A. paratuberculosis* e *A. tuberculosa* são consideradas a mesma linhagem R4c de *A. rhysodes*, definindo dessa forma a reclassificação do grupo por meio dos marcadores moleculares (De Jonckheere, 1983).

No gênero *Acanthamoeba*, onde existe alta taxa de variação entre as espécies e, onde são encontrados alguns dos organismos considerados potencialmente patogênicos, já é possível o

estabelecimento de relações filogenéticas dentro do grupo por meio de Biologia Molecular (Gast et al., 1996; Stothard et al., 1998).

Do mesmo modo, embora o número de relatos de ceratite por *Acanthamoeba* venha aumentando, ainda existe uma desproporção evidente entre o número de casos e a dispersão ambiental desses protozoários. Esse fato pode ser devido à existência de organismos com diferentes graus de patogenicidade, à resistência do hospedeiro e/ou ao desconhecimento da classe médica em relação às *Acanthamoeba*. Dessa maneira, fica explícita a necessidade cada vez maior da utilização de métodos rápidos e eficazes para o diagnóstico correto destes organismos.

Tradicionalmente o diagnóstico em isolados clínicos é feito a partir de cultura de material proveniente de raspados de córnea. Além de ser demorado e pouco sensível nos casos de amostras com baixa quantidade de amebas, este método não permite a identificação adequada do isolado, devido à falha dos métodos morfológicos em distinguir a maioria das espécies do gênero.

Assim, a classificação do gênero, subgêneros e espécies de AVLs têm se mostrado extremamente difícil. No entanto, essa identificação pode ser realizada com maior simplicidade e rapidez quando são aplicadas as técnicas de Biologia Molecular (Visvesvara, 1991; Kong et al., 1995; Chung et al., 1996).

Dessa forma, Lehmann et al., (1998) mostraram que é possível a determinação dos genótipos de *Acanthamoeba* em amostras clínicas de pacientes suspeitos de infecção na córnea. Portanto, o ensaio de PCR das lágrimas oriundas dos pacientes pode servir como uma importante ferramenta no diagnóstico da infecção por *Acanthamoeba*, além de permitir o monitoramento da resposta ao tratamento.

Cabe ressaltar que amostras ambientais também têm sido pesquisadas quanto à presença de *Acanthamoeba* através de PCR em nível interespecífico e intergênico, na tentativa de caracterização e elucidação destes organismos (Lorenzo-Morales et al., 2005).

O mtDNA é uma molécula encontrada nas mitocôndrias de células eucarióticas. Apesar de constante em eucariotos, a variação do genoma mitocondrial é uma importante característica genética para determinação de filogenia, através do uso da subunidade menor do rDNA (SSU) realizada por meio de RFLP-PCR (Yu et al., 1999). Estudos de RFLP-PCR do mtDNA têm demonstrado ser esta a ferramenta molecular mais eficiente na identificação de genótipos de *Acanthamoeba* (Kong et al., 1995; Chung et al., 1996; Kong & Chung, 1996).

Análises do mtDNA, usando sequências e dados produzidos através da ferramenta molecular RFLP-PCR, talvez permitam identificar espécies problemáticas quanto a classificação e ao conhecimento dentro de *Acanthamoeba* (Well & Sperling, 1999). Entre os genes mitocondriais, o SSU do rDNA pode ser aplicado com sucesso na investigação de relações entre os gêneros e entre os grupos mais distantes (Flook & Rowell, 1997). Assim, as análises de RFLP do genoma mitocondrial têm sido empregadas em estudos taxonômicos e filogenéticos de *Acanthamoeba* spp (Byers et al., 1983; Yagita & Endo, 1990).

Gast et al. (1996), através da análise por RFLP-PCR da subunidade 18S ribossomal do DNA, estabeleceram um novo critério de identificação para *Acanthamoeba*. Assim, por meio desse trabalho foi possível a utilização da sequência do gene que codifica a subunidade menor do ribossomo para organizar o gênero em 12 grupos genéticos, classificados de T1 a T12. Ainda foi possível a definição da importância da análise da subunidade menor do rDNA por meio de RFLP (Chung et al., 1998).

Dessa maneira, foi possível a determinação de que as amebas do grupo morfológico I encontram-se nas denominações genéticas T7, T8 e T9. As do grupo II estão presentes nas subdivisões genéticas T3, T4 e T11. Já os organismos classificados no grupo morfológico III encontram-se distribuídos nas seções genéticas T1, T2, T5, T6, T10 e T12 (Gast et al., 1996).

Dessa forma, Stothard et al., (1998) puderam classificar 53 espécies de *Acanthamoeba* dentro dos 12 grupos genotípicos conhecidos, através de estudos com o gene 18S rDNA. Eles ainda definiram que essa porção genética apresenta resultados promissores para a caracterização molecular em nível de gênero e tamanho (cerca de 2000pb no SSU rDNA). Assim a grande quantidade de cópias no genoma, a ubiquidade e a grande quantidade de dados que já foram gerados sobre essas sequências em diversos grupos de organismos permitem o início de estudos aprofundados também em análise comparativa (Alves, 2001).

Recentemente, Stothard et al., (1998) reclassificaram o gênero de *Acanthamoeba* em 13 diferentes grupos, baseados por análises em sequências do rDNA. Sendo assim definidos como grupos genéticos de T1-T12 e T14. No entanto, duas espécies de *A. polyphaga* determinadas como ATCC 30871 e CCAP 1501/3c (Page, 1967), foram colocadas em outros grupos genéticos devido a análise de rDNA. Assim a linhagem ATCC 30871 foi remanejada para o grupo T4 (organismos mais patogênicos) e a linhagem CCAP 1501/3c foi reagrupada com *A. palestinensis* e remanejada para o grupo T2 (organismos considerados como não-patogênicos).

Contudo, a análise da sequência do 18S rDNA tem sido limitada para distinguir espécies pertencentes ao grupo genético T4, devido ao elevado polimorfismo encontrado nesse agrupamento (Stothard et al., 1998; Lee et al., 2006).

Em *Acanthamoeba*, já foi determinada que a unidade de repetição do cistron ribossômico é de cerca de 12.000pb. O número de unidades de repetição parece ser em torno de 600 cópias por genoma (Byers et al., 1990) e estão organizadas conforme esquematizado na figura 10.

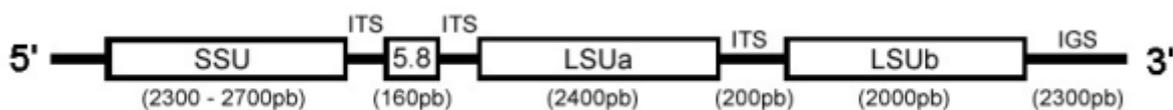


Figura 10: Esquema do cistron ribossômico em *Acanthamoeba* (Alves, 2001).

A subunidade maior (LSU rDNA), da mesma maneira que ocorre, por exemplo, em tripanosomatídeos (Gray, 1979; Castro et al., 1981), está subdividida em dois segmentos de 2.400pb (LSU a) e 2.000pb (LSU b), separados por um espaçador interno transcrito (ITS) de cerca de 200pb, que é removido do transcrito primário (Stevens & Pachler, 1972).

O RNA da subunidade menor de *Acanthamoeba* tem um tamanho de cerca de 2300 a 2700pb, sendo considerado um dos loci gênicos mais conhecidos (Chalwatzis et al., 1995). Recentemente, descobriu-se que nem todas as cópias do SSU rDNA são obrigatoriamente idênticas, uma vez que sete entre 53 isolados estudados apresentaram mais de um alelo do gene (Stothard et al., 1998). No entanto, não foi determinado se as diferentes variantes são todas expressas ou se algumas delas podem ser pseudogenes. Os alelos identificados em cada isolado se mostram muito semelhantes entre si (1 a 4 diferenças por 1000 bases), sendo que a diferença, entre eles, é considerada menor do que entre os mesmos e outras.

Kong (2009) analisou 23 espécies de referência de *Acanthamoeba*, incluindo 18 novos tipos de espécies para classificação por meio da técnica de *riboprinting*. O dendrograma final coincidiu com o agrupamento realizado por Pussard & Pons (1977) baseado em análises morfológicas, com algumas alterações mais precisas de agrupamento e identificação. Dessa forma, definiu-se que o *riboprinting* pode ser aplicado para uma rápida e eficiente identificação de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba*.

Dessa forma, pesquisas têm utilizado com sucesso marcador moleculares na caracterização de *Acanthamoeba*, como: isoenzimas, PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorfism) avaliando o mtDNA, RFLP-PCR da subunidade menor do DNA ribossômico (SSU rDNA) e a análise de sequência do SSU rDNA (Kong, 2009).

Dentre estes marcadores, a Reação da Polimerase em Cadeia tem permitido a identificação e a avaliação de isolados causadores de ceratites. Além disso, por meio do PCR foi possível a determinação da classificação de *Acanthamoeba* pertencentes ao grupo genético T1 e T4 e ao grupo morfológico II. Tais estudos, ainda determinaram a classe morfológica e genética em amostras de organismos como: *A. castellanii*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhysodes*, *A. triangularis*. Essa caracterização genotípica proporcionada pela PCR confirma a importância das ferramentas de biologia molecular para determinação dos genótipos de *Acanthamoeba* (Gast et al., 1996; Walochnik, 2000; Mortazavi et al., 2010).

3. REFERÊNCIAS

- Alfieri, S.C.; Correia, C.E.; Motegi, S.A.; Pral, E.M. (2000). Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **J. Parasitol.** 86: 220-227.
- Alizadeh, H.; He, Y.; McCulley, J.P.; Ma, D.; Stewart, G.L.; Via, M.; Haehling, E., Niederkorn, J.Y. (1995). Successful immunization against *Acanthamoeba* keratitis in a pig model. **Cornea.** 14:180-186.

- Allen, P.G. & Dawidowicz, E.A. (1990). Phagocytosis in *Acanthamoeba* I. A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. **J. Cell. Physiol.** 145: 508-513.
- Alsam, S.; Kim, K.S.; Rivas, A.O.; Sissons, J.; Khan, N.A. (2003). *Acanthamoeba* interactions with human brain microvascular endothelial cells. **Microb. Pathog.** 35: 235-241.
- Alsam, S.; Sissons, J.; Dudley, R.; Khan, N.A. (2005). Mechanisms associated with *Acanthamoeba castellanii* (T4) phagocytosis. **Parasitol Res.** 96: 402-409.
- Alvarenga, L.S.; Freitas, D.; Hofling-Lima, A.L. (2000). Ceratite por *Acanthamoeba*. **Arq. Bras. Oftalmol.** 63: 155-159.
- Alves, J. (2001). Caracterização e filogenia moleculares de *Acanthamoeba*. **Tese de Doutorado**. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Parasitologia. São Paulo.
- Anderlini, P.; Przepiorka, D.; Luna, M.; Langford, L.; Andreef, M.; Claxton, D.; Deiseroth, A.B. (1994). *Acanthamoeba* meningoencephalitis after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant.** 14: 459-461.
- Anzil, A.P.; Rao, C.; Wrzolek, M.A.; Visvesvara, G.S.; Sher, J.H.; Kozlowsky, P.B. (1991). Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. **Arch. Pathol. Lab. Med.** 115:21-25.
- Ardnt, H. (1993). A Critical review of the importance of rhizopods (naked and testate amoebae) and actinopods (heliozoan) in lake plankton. **Marine Microbiol. Food Webs.** 7: 3-29.
- Auran, J. D; Starr, M. B.; Jakobiec, F.A. (1987). *Acanthamoeba* keratitis. A review of the literature. **Cornea.** 6:2-26.
- Avery, S.V.; Harwood, J.L.; Lloyd, D. (1995). Quantification and Characterization of Phagocytosis in the Soil Amoeba *Acanthamoeba castellanii* by Flow Cytometry. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1124-1132.
- Bacon, A.S.; Frazer, D.G.; Dart, J.K.; Matheson, M.; Ficker, L.A.; Wright, P. (1993). A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984-1992. **Eye.** 7:719-25.
- Badenoch, P.R.; Grimmond, T.R.; Cadwagan, J.; Deayton, S.E.; Essery, M.S.L. (1988). Nasal carriage of free-living amoebae. **Microb. Ecol. Health Dis.** 1: 209-211.
- Band, R.N. & Mohrlök, S. (1973). The cell cycle and induced amitosis in *Acanthamoeba*. **J. Protozool.** 20: 654-657.
- Barbeau, J. & Buhler, T. (2001). Biofilmes augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. **Res. Microbiol.** 152: 753-760.
- Berke, G. (1991). Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Lymphocyte triggered internal target disintegration. **Immunol. Today.** 12: 396-399.
- Boccacio, F.; Kwitko, S.; Boelter, M. C.; Rymer, S.; Marinho, D.; Alves, L. S. (1997). Ceratite por *Acanthamoeba*: relato de casos no rio grande do sul. **Arq. Bras. Oftalmol.** 60:268-74.

- Bowers, B. & Korn, E.D. (1968). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. **J. Cell. Biol.** 41: 786-805.
- Bowers, B. (1977). Comparison of pinocytosis and phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. **Exp. Cell. Res.** 110: 409-417.
- Bowers, B. & Olszewski, T.E. (1983). *Acanthamoeba* discriminates internally between digestible and indigestible particles. **JCB.** 97: 317-322.
- Butt, C.G. (1966). Primary amebic meningoencephalitis. **N. Engl. J. Med.** 274: 1473-1476.
- Byers, T.J. (1979). Growth, reproduction, and differentiation in *Acanthamoeba*. **Int. Rev. Cytol.** 61: 283-338.
- Byers, T.J.; Bogler, S.A.; Burianek, L.L. (1983). Analysis of mitochondrial DNA variation as an approach to systematic relationships in the genus *Acanthamoeba*. **J. Protozool.** 30: 198-203.
- Byers, T.J.; Hugo, E.R.; Stewart, V.J. (1990). Genes of *Acanthamoeba*: DNA, RNA and protein sequences (a review). **J. Protozool.** 37: 17S-25S.
- Byers, T.J.; Kim, B.G.; King, L.E.; Hugo, E.R. (1991). Molecular aspects of the cell cycle and encystment of *Acanthamoeba*. **Rev. Infect. Dis.** 13: S373-S384.
- Campos, R.; Gomes, M.C.O.; Prigenzi, L.S.; Stecca, J. (1977). Meningoencefalite por ameba de vida livre. Apresentação do primeiro caso latino-americano. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** 19: 349-351.
- Cao, Z.; Jefferson, M.D.; Panjwani, N. (1998). Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. **J. Biol Chem.** 273: 15838-15845.
- Casper, T.; Basset, D.; Leclercq, C.; Fabre, J.; Peyron-Raison, N.; Reynes, J. (1999). Disseminated *Acanthamoeba* infection in a patient with AIDS: response to 5-fluorocytosine therapy. **Clin. Infect. Dis.** 29: 944-945.
- Castro, C.; Hernández, R.; Castañeda, M. (1981). *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large molecular-mass species and number of genes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 2:219-233.
- Cerva, L. (1989). *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man. **J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.** 33:22-103.
- Chalwatzis, N.; Baur, A.; Stetzer, E.; Kinzelbach, R.; Zimmerman, F.K. (1995). Strongly expanded 18S rRNA genes correlated with a peculiar morphology in the insect order of Strepsiptera. **Zoology.** 98:115-126.
- Chappell, C.L.; Wright, J.A.; Coletta, M.; Newsome, A.L. (2001). Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 8: 724-730.
- Chung, D.I.; Kong, H.H.; Yu, H.S.; Oh, Y.M.; Yee, S.T.; Lim, Y.J. (1996). Biochemical and molecular characterization of a strain KA/S2 of *Acanthamoeba castellanii* isolated from Korean soil. **Korean J. Parasitol.** 34: 79-85.

- Chung, D.I.; Yu, H.S.; Hwang, M.Y.; Kim, T.H.; Kim, T.O.; Yun, H.C.; Kong, H.H. (1998). Subgenus classification of *Acanthamoeba* by riboprinting. **Korean J. Parasitol.** 36: 69-80.
- Chung, D.L.; Yu, H.S.; Hwang, M.Y.; Kim, T.O.; Yun, H.C.; Kim, T.H.; Kong, H.H. (1999). Phylogenetic relationships among *Acanthamoeba* spp. Based on PCR-RFLP analyses of mitochondrial small subunit rRNA gene. **Korean J. Parasitol.** 37:181-188.
- Clark, C.G.; Martin, D.S.; Diamond, L.S. (1995). Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes as revealed by riboprinting. **J. Euk. Microbiol.** 42: 92-96.
- Cooke, P. (2008). *Acanthamoeba* keratitis: ASCRS infectious disease task force report and recommendations (Homepage na internet). **Washington**. The American Society of Cataract and Refractive Surgery (atualizada em janeiro de 2008. Acesso em: janeiro de 2008).
- Costas, M & Griffiths, A.J. (1980). The suitability of starch gel electrophoresis of esterases and acid phosphatases for the study of *Acanthamoeba* taxonomy. **Arch. Protistenk.** 123: 272-279.
- Coulon, C.; Collignon, A.; McDonnell, G.; Thomas, V. (2010). Resistance of *Acanthamoeba* Cysts to Disinfection Treatments Used in Health Care Settings. **J. Clin. Microbiol.** 48: 2689-2697.
- Crozetta, M.A.S.; Costa, A.O.; Castro, E.A. (2007). Identificação morfológica e molecular de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* isoladas em poeira de ambiente hospitalar. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná.
- Cursons, R.T.M.; Brown, T.J.; Keys, E.A. (1980). Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic condition. **Appl. Environ. Microbiol.** 40: 62-66.
- Dearborn, D.G. & Korn, E.D. (1974). Lipophosphoglycan of the Plasma Membrane of *Acanthamoeba castellanii*. **J. Biol. Chem.** 249: 3342-3346.
- De Jonckheere, J.F. & Van De Voorde, H. (1976). Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. **Appl. Environ. Microbiol.** 31: 294-297.
- De Jonckheere, J.F. (1983). Isoenzyme and total protein analysis by Ágarose isoelectric focusing and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. **J. Protozool.** 30: 701-706.
- De Jonckheere, J.F. (1991). Ecology of *Acanthamoeba*. **Rev. Infect. Dis.** 13: 385-387.
- Duluol, A.M.; Teilhac, M.F.; Poirot, J.L. (1996). Cutaneous lesions due to *Acanthamoeba* sp. in patients with AIDS. **J. Eukaryot. Microbiol.** 43: 130-131.
- Dunnebacke, T.H.; Schuster, F.L.; Yagi, S.; Booton, G.C. (2004). *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. **Microbiology.** 150: 2837-2842.
- Fernandez, M.C.A. & Crespo, E.P. (1992). Las amebas de vida libre o anfitriónica (Protozoa, Lobosea). **Avan. Parasitol. Serv. Public. Univers. de Santiago de Compostela.** 143-162.
- Ferrante, A & Bates, E.J. (1988). Elastase in the pathogenic free-living amoebae, *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. **Infect. Immun.** 56: 3320-3321.
- Ferrante, A. & Rowan-Kelly, B. (1983). Activation of the alternative pathway of complement by *Acanthamoeba culbertsoni*. **Clin. Exp. Immunol.** 54: 477-485.

- Ferrante, A. (1991). Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. **Parasit. Immunol.** 13: 31-47.
- Flisser, A. & Pérez R. (2006). **Amibas de vida livre. En: Aprendizaje de la Parasitología Basado en Problemas.** México D.F.: Editores de Textos Mexicanos.
- Flook, P.K. & Rowell, C.H.F. (1997). The effectiveness of mitochondrial rRNA gene sequences for the reconstruction of the phylogeny of an insect order (Ortophera). **Mol. Phylogenet. Evol.** 8: 177-192.
- Foronda, A.S. (1976). Crescimento de amebas de vida livre em meios semeados com líquido cefalorraquidiano humano (nota prévia). **Rev. Paul. Med.** 87:140.
- Foronda, A.S. & Campos, R. (1991). **Infecções por amebas de vida livre.** In: VERONESI R. Doenças Infecciosas e Parasitárias, 8º Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Fowler, M. & Carter, R.F. (1965). Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. A preliminary report. **BMJ.** 2:740-742.
- Garate, M.; Cao, Z.; Bateman, E.; Panjwani, N. (2004). Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. **J Biol Chem.** 279: 29849-29856.
- Garate, M. Cubillos, I.; Marchant, J.; Panjawani, N. (2005). Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein. **Infect Immun.** 73:5775-5781.
- Gast, R.J.; Ledee, D.R.; Fuerst, P.A.; Byers, T.J. (1996). Subgenus systematic of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. **J. Eukaryot. Microbiol.** 43: 498-504.
- Gautom, R.K.; Lory, S.; Seyedirashti, S.; Bergeron, D.L.; Fritsche, T.R. (1994). Mitochondrial DNA fingerprinter of *Acanthamoeba* spp. Isolated from clinical and environmental sources. **J. Clin. Microbiol.** 32: 1070-1073.
- Gelman, B.; Popov, V.; Chaljub, G.; Nader, R.; Rauf. S.; Nauta, H. (2003). Neuropathological and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 62: 990-98.
- Giazzi, J.F. (1996). Contribuição para o estudo do isolamento, cultivo e manutenção das amebas de vida livre. **Tese de Livre-docência.** Araraquara. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP.
- Gordon, S.; Steinberg, J.P.; Dupuis, M.H.; Kozarsky, P.E.; Nickerson, J.F.; Visvesvara, G.S. (1992). Culture isolation of *Acanthamoeba* species and leptomyxid amebas from patients with amebic meningoencephalitis, including two patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.** 15: 1024-1030.
- Gray, M.W. (1979). The ribosomal RNA of trypanosomatid protozoa *Crithidia fasciculata*: physical characteristics and methylated sequences. **Can. J. Biochem.** 57:914-926.
- Hadas, E. & Mazur, T. (1993). Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. **Trop. Med. Parasitol.** 44 (3): 197-200.

- He, Y.; Jerry, Y.; Niedderkorn, J.Y.; Mcculley, G.L.; Stewart, D.R.; Meyer, R.S.; Dougherty, J. (1990). *In vivo* and *in vitro* collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. **Invest. Ophthalm. Vis. Sci.** 31: 2235-2240.
- Helton, J.; Loveless, M.; White Jr., C.R. (1993). Cutaneous *Acanthamoeba* infection associated with leukocytoclastic vasculitis in an AIDS patient. **Am. J. Dermatopathol.** 15: 146-149.
- Ho-Joon & Kyung, I.L. (2004). Pathogenic free-living amoebae in Korea. **Korean J. Parasitol.** 42(3): 93-119.
- Hurt, M.; Apte, S.; Leher, H.; Howard, K.; Niederkorn, J.; Alizadeh, H. (2001). Exacerbation of *Acanthamoeba* keratitis in animals treated with anti-macrophage inflammatory protein 2 or antineutrophil antibodies. **Infect. Immun.** 69:2988-2995.
- Huston, C.D. (2004). Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. **Trends Parasitol.** 20: 23-26.
- Iglésias, J.D. (1997). Amebas de vida livre potencialmente patogênicas. In: IGLÉSIAS, J.D. Aspectos Médicos das Parasitoses humanas. Rio de Janeiro: **Medsi.** 116-120.
- Illingworth, C.D.; Cook, S.D.; Karabatsas, C.H.; Easty, D.L. (1995). *Acanthamoeba* keratitis: risk factors and outcome. **Br. J. Ophthalmology.** 79:1078-82.
- Illingworth, C.D. & Cook, S.S. (1998). *Acanthamoeba* keratitis. **Surv. Ophthalmol.** 42(6): 493-508.
- Jerome, C.A. & Lynn, D.H. (1996). Identifying and distinguishing sibling species in the *Tetrahyema puriformis* complex (Ciliophora Oligohymenophorea) using PCR/RFLP analysis of nuclear ribosomal DNA. **J. Eukaryot. Microbiol.** 43: 492-497.
- Jones, D.B.; Visvesvara, G.S.; Robinson, N.M. (1975). *Acanthamoeba* polyphaga keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. **Trans. Ophthalmol. Soc. UK.** 95: 221-232.
- Khan, N.A.; Greenman, J.; Topping, K.P.; Hough, V.C.; Temple, G.S.; Paget, T.A. (2000). Isolation of *Acanthamoeba*-specific antibodies from a bacteriophage display library. **J. Clin. Microbiol.** 38: 2374-2377.
- Khan, N.A. (2001). Pathogenicity, morphology and differentiation of *Acanthamoeba*. **Curr. Microbiol.** 43: 391-395.
- Khan, N.A.; Jarroll, E.L.; Paget, T.A. (2001). *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Curr. Microbiol.** 43: 204-208.
- Khan, N.A. Jarroll, E.L.; Paget, T.A. (2002). Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. **Curr. Microbiol.** 45: 197-202.
- Khan, N.A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiol. Rev.** 30: 564-595.
- Khan, N.A. (2008). *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. **J. Med. Microbiol.** 57: 1051-1057.
- Khan, N.A. & Siddiqui, F. (2009). *Acanthamoeba* affects the integrity of human brain microvascular

- endothelial cells and degrades the tight junction proteins. **Int. J. Parasitol.** 39: 1611-1616.
- Kong, H.H.; Park, J.H.; Chung, D.I. (1995). Interstrain polymorphisms of isoenzyme profiles and mitochondrial DNA fingerprints among seven strains assigned to *Acanthamoeba polyphaga*. **Korean J. Parasitol.** 33: 331-340.
- Kong, H.H.; Kim, T.H.; Chung, D.I. (2000). Purification and characterization of a secretory proteinase of *Acanthamoeba* healy isolates from GAE. **J. Parasitol.** 86: 12-17.
- Kong, H.H. & Chung, D.I. (1996). PCR and RFLP variation of conserved region of small subunit ribosomal DNA among *Acanthamoeba* isolates assigned to either *A. castellanii* or *A. polyphaga*. **Korean J. Parasitol.** 43: 127-134.
- Kong, H.H. (2009). Molecular Phylogeny of *Acanthamoeba*. **Korean J. Parasitol.** 47: 21-28.
- Krahenbuhl, O. & Tschopp, J. (1991). Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Perforin-induced pore formation. **Immunol. Today.** 12: 399-402.
- Kremer, I.; Cohen, E.J.; Eagle, R.C.; Udell, Jr.I.; Laibson, P.R. (1994). Histopathologic evaluation of stromal inflammation in *Acanthamoeba* Keratitis. **CLAO J.** 20: 45-48.
- Larkin, D.F. & Easty, D.L. (1990). Experimental Keratitis. I. Preliminary findings. **Br. J. Ophthalmol.** 74: 551-555.
- Larkin, D.F. & Easty, D.L. (1991). Experimental *Acanthamoeba* keratitis. II. Immunohistochemical evaluation. **Br. J. Ophthalmol.** 75: 421-424.
- Lee, S.J.; Jeong, H.J.; Lee, J.E.; Xuan, Y.H.; Kong, H.H.; Chung, D.I.; Ock, M.S.; Yu, H.S. (2006). Molecular characterization of *Acanthamoeba* spp. isolated from amebic keratitis related to orthokeratology lens overnight wear. **Korean J. Parasitol.** 44: 313-320.
- Ledee, D.R.; Booton, G.C.; Awwad, M.H.; Sharma, S.; Aggarwal, R.K.; Niszl, I.A.; Markus, M.B.; Fuerst, P.A.; Byers, T.J. (2003). Advantages of using mitochondrial 16S rDNA sequences to classify clinical isolates of *Acanthamoeba*. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 44: 1142-1149.
- Lehmann, O.J.; Green, S.M.; Morlet, N. (1998). Polymerase chain reaction of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. **Invest. Ophthalm. Vis. Sci.** 39 (7): 1261-1265.
- Leher, H.; Silvany, R.; Alizadeh, H.; Huang, J.; Niederkorn, J.Y. (1998). Mannose induces the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. **Infect. Immun.** 66: 5-10.
- Lindquist, T. M. (1998). Treatment of *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea.** 17: 11-16.
- Lorenzo-Morales, J.; Otega-Rivas, A.; Martínez, E.; Khoubbane, M.; Artigas, P.; Periago, M.V.; Foronda, P.; Abreu-Acosta, N.; Valladares, B.; Mas-Coma, S. (2006). *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. **Acta Tropica.** 100: 63-69.
- Marciano-Cabral, F., & John, D.T. (1986). Cytopathology of pathogenic and non pathogenic *Naegleria* species for cultured rat neuroblastoma cells. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 1133-1137.

- Marciano-Cabral, F.; Puffenbarger, R.; Cabral, A. (2000). The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. **J. Eukaryot. Microbiol.** 47: 29-36.
- Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. **Clin. Microbiol. Rev.** 16: 273-307.
- Martinez, J. M.; Sotelo-Avila, C.; Alcalá, H.; Willaert, E. (1980). Granulomatous encephalities, intracranial arteritis and mycotic aneurysm due to a free-living ameba. **Acta Neuropathol.** 49: 7-12.
- Martinez, A.J. (1982). Acanthamoebiasis and immunosuppression. Case report. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 41: 548-557.
- Martinez, A.J. (1985). **Free-living amebas: natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of the disease.** Boca Raton: CRC Press.
- Martinez, A.J. & Janitschke, K. (1985). *Acanthamoeba*, an opportunistic Microorganism. **Infection.** 13: 251-256.
- Martinez, J.M.; Guerra, A.E.; Garcia-Tamayo, J.; Céspedes, G.; Gonzáles-Alfonzo, J.; Visvesvara, G. (1994). Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of spontaneous case from Venezuela. **Acta Neuropathol.** 87: 430-434.
- Martínez, A.J. & Visvesvara, G. (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amibas. **Brain Pathol.** 7:583-598.
- Mathers, W.; Stevens, G. Jr.; Rodrigues, M.; Chan, C.C.; Gold, J.; Visvesvara, G.S., Lemp, M.A.; Zimmerman, L.E. (1987). Immunopathology and electron microscopy of *Acanthamoeba* Keratitis. **Am. J. Ophthalmol.** 103: 626-635.
- Mathews, H.M.; Moss, D.M.; Healy, G.R.; Visvesvara, G.S. (1983). Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Isoenzymes from *Entamoeba* species. **J. Clin. Microbiol.** 17: 1009-1012.
- Mazur, T.; Hadas, E.; Iwanicka, I. (1995). The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. **Trop. Med. Parasitol.** 46: 106-108.
- Michel, R.; Hauröder-Philipczyk, B.; Müller, K.; Weishaar, I. (1994). *Acanthamoeba* from human nasal mucosa infected with an obligate intra-cellular parasite. **Eur. J. Protisol.** 30:104-110.
- Mitro, K.; Bhagavathiammai, A.; Zhou, O.M.; Bobbett, G.; McKerrow, J.H.; Chokshi, R.; Chokshi, B.; James, E.R. (1994). Partial characterization of the proteolytic secretions of *Acanthamoeba polyphaga*. **Exp. Parasitol.** 78: 377-385.
- Mitra, M.L.; Alizadeh, H.; Gerard, R.D.; Niederkorn, J.Y. (1995). Characterization of a plasminogen activator produced by *Acanthamoeba castellanii*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 73: 157-164.
- Moore, M.B. & McCulley, J.P. (1989). *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lenses: six consecutive cases of successful management. **Br. J. Ophthalmol.** 73:271-275.
- Moore, M.B.; Ubelaker, J.E.; Martin, J.H.; Silvany, R.; Dougherty, J.M.; Meyer, D.R.; McCulley, J.P. (1991). *In vitro* penetration of human corneal epithelium by *Acanthamoeba castellanii*: a scanning and transmission electron microscopy study. **Cornea.** 10: 291-298.

- Morales, J.L.; Rivas, A.O.; Foronda, P.; Martínez, E.; Valladares, B. (2005). Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water source. **Parasitol. Res.** 95: 273-277.
- Mortazavi, P.N.; Goldsworthy, G.; Kirk, R.; Khan, N.A. (2010). *Acanthamoeba* produces disseminated infection in locusts and traverses the locust blood-brain barrier to invade the central nervous system. **BMC Microbiology.** 10: 1471-2180.
- Morton, L.D.; McLaughlin, G.L.; Whiteley, H.E. (1991). Effects of temperature, amebic strain, and carbohydrates on *Acanthamoeba* adherence to corneal epithelium in vitro. **Infect. Immun.** 59: 3819-3922.
- Muñoz, M.L.; Calderón, J.; Rojkind, M. (1982). The collagenase of *Entamoeba histolytica*. **J. Exp. Med.** 155: 42-51.
- Murakawa, G.J.; Mccalmont, T.; Altman, J.; Telang, G.H.; Hoffman, M.D.; Kantor, G. R.; Berger, T.G. (1995). Disseminated acanthamebiasis in patients with AIDS. A report of five cases and a review of the literature. **Arch. Dermatol.** 131:1291-1296.
- Neves, D.P. (2003). Giardíase. In: Neves, D.P. **Parasitologia Dinâmica.** 10º edição. São Paulo: Atheneu.
- Newsome, A.L.; Curtis, F.T.; Culbertson, C.G.; Allen, S.D. (1992). Identification of *Acanthamoeba* in bronchoalveolar lavage specimens. **Diagn. Cytophatol.** 8: 231-234.
- Nieder Korn, J.Y.; Alizadeh, H.; Leher, H.; McCulley, J.P. (1999). The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. **Microbes Infect.** 1: 437-43.
- Nieder Korn, J.Y. (2002). The role of the innate and adaptive immune responses in *Acanthamoeba* keratitis. **Arch. Immunol. Ther. Ex.** 50: 53-59.
- Nosé, W.; Sato, E.H.; Freitas, D. (1988). Úlcera de córnea por *Acanthamoeba*: quatro primeiros casos no Brasil. **Arq. Bras. Oftalmol.** 51: 223-226.
- Obeid, W.N.; Araújo, R.; Vieira, L.A.; Machado, M.A.C. (2003). Ceratite bilateral por *Acanthamoeba* –Relato de Caso. **Arq. Bras. Oftalmol.** 66: 876-880.
- Oddó, B. (2006). Infecciones por amebas de vida libre: Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. **Rev. Chil. Infectol.** 23: 200-14.
- Oliva, S.; Jantz, M.; Tiernan, R.; Cook, D.L.; Judson, M.A. (1999). Successful treatment of widely disseminated acanthamoebiasis. **Southern Med. J.** 92: 55-57.
- Pacheco, L.G. & Martins, A.V. (2008). A importância do estudo das amebas de vida livre. **Saúde e Ambiente em Revista.** 3 (1).
- Page, F.C. (1967). Re-Definition of the Genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. **J. Protozool.** 14: 709-724.
- Page, F.C. (1974). A further study of taxonomic criteria for limax amoebae, with description of new species and a key to genera. **Arch. Protistenk.** 116: 149-184.

- Panjwani, N.; Zhao, Z.; Baum, J.; Pereira, M.; Zaidi, T. (1992). *Acanthamoeba* bind to glycolipids of rabbit corneal epithelium. **Infect. Immun.** 60: 3460-3463.
- Pearl, M. (1990). *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections. **Rev. Infect. Dis.** 12: 490-513.
- Pellegrin, J.L.; Ortega-Barria, E.; Barza, M.; Baum, J.; Pereira, M.E. (1991). Neuraminidase activity in *Acanthamoeba* species trophozoites and cysts. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 32: 3061-3066.
- Pens, C.J.; Rott, M.B.; Costa, M. (2008). Estudo da frequência de *Acanthamoeba* e bactérias em biofilmes e líquido de conservação de estojos de lente de contato. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Pettit, D.A.; Williamson, J.; Cabral, G.A.; Marciano-Cabral, F. (1996). *In vitro* destruction of nerve cell cultures by *Acanthamoeba* spp.: a transmission and scanning electron microscopy study. **J. Parasitol.** 82: 769-777.
- Pidherney, M.S.; Alizadeh, H.; Stewart, G.L.; McCulley, J.P.; Niederkorn, J.Y. (1993). *In vitro* and *in vivo* tumoricidal properties of a pathogenic/free-living amoeba. **Cancer Lett.** 72: 91-98.
- Powell, E.L.; Newsome, A.L.; Allen, S.D.; Knudson, G.B. (1994). Identification of antigens of pathogenic free-living amoebae by protein immunoblotting with rabbit immune and human sera. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 1: 493-499.
- Preston, T.M. & King, C.A. (1984). Binding Sites for bacterial Flagella at the Surface of the soil Amoeba *Acanthamoeba*. **J. Gen. Microbiol.** 130: 1449-1458.
- Pussard, M. & Pons, R. (1977). Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica.** 13: 557-610.
- Raper, K.B. (1984). **The Dictyostelids.** Princeton, N.J.: Princeton Univ. Press.
- Rivas, O. (2002). Aplicación de La técnica de RAPD para La caracterización de especies de género *Acanthamoeba*. **Tese de Doutorado.** Depto. de parasitología, Ecología y genética. Facultad de Farmacia. Universidade de La Laguna.
- Rivera, F.; Medina, F.; Ramirez, P.; Alcocer, J.; Vilaclara, G.; Robles, E. (1984). Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients. **Environ. Res.** 33: 428-440.
- Rivera, F.; Lares, F.; Ramirez, E.; Bonilla, P.; Rodeiguez, S.; Labastida, A.; Ortiz, R.; Hernandez, D. (1991). Pathogenic *Acanthamoeba* isolated during on atmospheric survey in Mexico City. **Rev. Infect. Dis.** 13: 388-389.
- Rivera, F.; Ramírez, E.; Bonilla, P.; Caderón, A.; Gallegos, E.; Rodríguez, S.; Ortiz, R.; Zaldívar, B.; Ramírez, P.; Durán, A. (1993). Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. **Environ. Res.** 62: 43-45.
- Rodriguez, M.L.P & Oviedo, J.J.A. (2009). Amibas de vida libre en seres humanos. **Salud Uninorte** 25: 280-292

- Rohr, U.; Weber, S.; Michel, R.; Selenka, F.; Wilhelm, M. (1998). Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 1822-1824.
- Ruthes, A.C.C; Wahab, S.; Wahab, N.; Moreira, H.; Moreira, L. (2004). Conjuntivite presumível por *Acanthamoeba*. **Arq. Bras. Oftalmol.** 67: 897-900.
- Sangruchi, T.; Matinez, A.J.; Visvesvara, G.S. (1994). Spontaneous granulomatous amebic encephalitis: report of four cases from Thailand. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.** 25: 309-313.
- Sawyer, T.K. (1989). Free-living pathogenic and nonpathogenic amoebae in Maryland soils. **Appl. Environ. Microbiol.** 55:1074-1077.
- Schaap, P.; Winckler, T.; Nelson, M.; Alvarez-Curto, E.; Elgie, B.; Hagiwara, H.; Cavender, J.; Milano-Curto, A.; Rozen, D.E.; Dingermann, T.; Mutzel, R.; Baldauf, S. (2006). Molecular phylogeny and evolution of morphology in the social amoebas. **Science.** 314: 661-663.
- Schaumberg, D.A.; Snow, K.K.; Dana, M.R. (1998). The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: where do we stand. **Cornea.** 17: 3-10.
- Schuster, F.L. & Visvesvara, G. S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **Int. J. Parasitol.** 34: 1001-1027.
- Scully, R.E.; Mark, E.J.; Mcneely, B.U. (1985). A 29-year-old native of India with bilateral ulcerative keratitis. **New Engl. J. Med.** 312: 634-641.
- Sheehan, K.B.; Faagg, J.A.; Ferris, M.J.; Henson, J.M. (2003). PCR detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 5914-5918.
- Shen, L.; Black, E.D.; Witkowski, E.D.; Lencer, W.I.; Guerriero, V.; Shneerberger, E.E.; Turner, J.R. (2006). Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. **J. Cell Sci.** 119: 2095-2106.
- Shin, H.J.; Cho, M.S.; Kim, H.I.; Lee, M.; Park, S.; Sohn, S.; Im, K.I. (2000). Apoptosis of primary-culture rat microglial cells induced by pathogenic *Acanthamoeba* spp. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 7: 510-514.
- Silva, M.A. (2001). Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de poeira de hospitais da cidade de Presidente Prudente – SP. **Dissertação de Mestrado.** Facul. Ciênc. Farmac. Univ. Est. São Paulo.
- Silva, M.A. & Rosa J.A. (2003). Isolation of potentially pathogenic free-living amebas in hospital dust. **Rev. Saúde Pública.** 37: 242-246.
- Sison, J.P.; Kemper, C.A.; Loveless, M.; Mcshane, D.; Visvesvara, G.S. & Deresinski, S.C. (1995). Disseminated *Acanthamoeba* infection in patients with AIDS: case reports and review. **Clin. Infect. Dis.** 20: 1207-1216.

- Sissons, J.; Alsam, S.; Jayasekera, S.; Khan, A. (2004). Ecto-ATPases of clinical and non-clinical isolates of *Acanthamoeba*. **Microb. Pathogenesis** . 37(5): 231-239.
- Sissons, J.; Alsan, S.; Goldsworthy, G.; Lightfoot, M.; Jarrol, E.L.; Khan, N.A. (2006). Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatus encephalitis. **BMC Microbiol.** 6:42.
- Slater, C.A.; Sichel, Z.; Visvesvara, S.; Pabico, R.C.; Gaspari, A.A. (1994). Brief report: successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. **New Engl. J. Med.** 331: 85-87.
- Stevens, A. R. & Pachler, P. F. (1972). Discontinuity of 26S RNA in *Acanthamoeba castellanii*. **J. Mol. Biol.** 66: 225-237.
- Stevens, A.R.; Tyndall, R.L.; Coutant, C.C.; Willaert, E. (1977). Isolation of the etiological agent of primary amoebic meningoencephalitis from artificially heated waters. **Appl. Environ. Microbiol.** 34: 701-705.
- Steenbergen, J.N.; Schuman, H.A.; Casadevall, A. (2001). *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proc. Natl. Acad. U.S.A.** 98: 15245-15250.
- Stewart, G.L.; Kim, I.; Shupe, K.; Alizadeh, H.; Silvany, R.; McCulley, J.P.; Niederkorn, J.Y. (1992). Chemotactic response of macrophages to *Acanthamoeba castellanii* antigen and antibody-dependent macrophage-mediated killing of the parasite. **J. Parasitol.** 78: 849- 855.
- Stins, M.F.; Gilles, F.; Kim, K.S. (1997). Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. **J. Neuroimmunol.** 76: 81-90.
- Storer, T.I.; Usinger, R.L.; Stebbins, R.C.; Nybakken, J.W. (1998). **Zoologia Geral.** 6º Ed.
- Stothard, D.R.; Schroeder-Diedrich, J.M.; Awwad, M.H.; Gast, R.J.; Ledee, D.R.; Rodriguez-Zaragoza, S.; Dean, C.L.; Fuerst, P.A.; Byers, T.J. (1998). The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **J. Eukaryot. Microbiol.** 45: 45-54.
- Tavares, W. & Carneiro, L. (2009). Infección por amebas de vida libre. En: **Diagnóstico y tratamiento en Infectología y Parasitología.** México D.F.: Manual Moderno: 574-51.
- Taylor, W.M.; Pidherney, M.S.; Alizadeh, H.; Niederkorn, J.Y. (1995). *In vitro* characterization of *Acanthamoeba castellanii* cytopathic effect. **J. Parasitol.** 81: 603-609.
- Toney, D.M. & Marciano-Cabral F. (1998). Resistance of *Acanthamoeba* species to complement lysis. **J. Parasitol.** 84: 338-44.
- Tsvetkova, N.; Schild, M.; Panaiotov, S.; Kurdova-Mintcheva, R.; Gottstein, B.; Walonik, J.; Aspöck, H.; Lucas, M.S.; Müller, N. (2004). The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. **Parasitol. Res.** 92: 405-413.
- Turner, N.A.; Harris, A.D.; Lioyd, D. (2000). Observation microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents. **J. Appl. Microbiol.** 89: 751-758.

- Van Hamme, C.; Dumont, M.; Delos, M.; Lachapelle, M. (2001). Acanthamebiase cutanee chez un transplant pulmonaire. **Ann. Dermatol. Vener.** 128: 1237-1240.
- Van Klink, F.; Taylor, W.M.; Alizadeh, H.; Jager, M.J.; Van Rooijen, N.; Niederkorn, J.Y. (1996). The role of macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. **Invest. Opth. Vis. Sci.** 37: 1271-1281.
- Van Klink, F.; Alizadeh, H.; Stewart, G.L.; Pidherney, M.S.; Silvany, R.E.; He, Y.; Mcculley, J.P.; Niederkorn, J.Y. (1992). Characterization and pathogenic potential of a soil isolate and an ocular isolate of *Acanthamoeba castellanii* in relation to *Acanthamoeba* Keratitis. **Curr. Eye Res.** 11: 1207-1220.
- Visvesvara, G.S.; Mirra, S.S.; Brandt, F.H.; Moss, D.M.; Mathews, H.M.; Martinez, A.J. (1983). Isolation of two strains of *Acanthamoeba castellanii* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. **J. Clin. Microbiol.** 18: 1405-1412.
- Visvesvara, G.S. & Sther- Green, J. (1990). Epidemiology of free-living ameba infection. **J. Protozool.** 37: 25-33.
- Visvesvara, G.S. (1991). Classification of *Acanthamoeba*. **Rev. Infect. Dis.** 13: 369-372.
- Visvesvara, G.S.; Moura, H. & Schuster, F.L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 50:1-26
- Walochnik, J.; Obwaller, A.; Aspöck, H. (2000). Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 4408-4413.
- Weisman, R.A. (1976). Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. **Ann. Rev. Microbiol.** 30: 189-219.
- Wysenbeek, Y.S.; Blank-Porat, D.; Harizman, N.; Wagnanski-Jaffe, T.; Keller, N.; Avni, I. (2000). The reculture technique: individualizing the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea.** 19:464-7.
- Yagita, K. & Endo, T. (1990). Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. **J. Protozool.** 37: 570-575.
- Yang, Z.; Cao, Z.; Panjwani, N. (1997). Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: carbohydrate-mediated host-parasite interactions. **Infect. Immun.** 65: 439-445.
- Young, J.D. ; Young, T.M. ; Lu, L.P. ; Unkeless, J.C. ; Cohn, Z.A. (1982). Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. **J. Exp. Med.** 156: 1677-1690.
- Yu, H.S.; Hwang, M.Y.; Kim, T.O.; Yun, H.C.; Kim, T.H.; Kong, H.H.; Chung, D.I. (1999). Phylogenetic relationships among *Acanthamoeba* spp. based on PCR-RFLP analyses of mitochondrial small subunit rRNA gene. **Korean J. Parasitol.** 37: 181-188.
- Yu, H.S.; Kong, H.H.; Kim, S.Y.; Hahn, Y.H.; Hahn, T.W.; Chung, D.I. (2004). Laboratory investigation of *Acanthamoeba lugdunensis* from patients with keratitis. **Invest. Opth. Vis. Sci.** 45: 1418-1426.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados em cinco capítulos, correspondentes a:

Capítulo 1- A Rapid and Reliable Method for the Clonal Isolation of *Acanthamoeba* from Environmental Samples.

Capítulo 2- Caracterização laboratorial de amebas de vida livre isoladas de ambientes acadêmicos.

Capítulo 3- Isolamento e estudo citomorfológico de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* em diferentes ambientes umidos na Universidade de Cruz Alta, RS, Brasil.

Capítulo 4- Potencial patogênico de *Acanthamoeba spp.* isoladas de ambientes internos hospitalares e acadêmicos de duas regiões do Rio Grande do Sul, Brasil.

Capítulo 5- Protease diversity among environmental isolates of *Acanthamoeba spp.*

CAPÍTULO 1

A rapid and reliable method for the clonal isolation of *Acanthamoeba* from environmental samples.

(Artigo aceito para publicação em Brazilian Archives of Biology and Technology)

A Rapid and Reliable Method for the Clonal Isolation of *Acanthamoeba* from Environmental Samples

Janice Zanella^{1,2}; Sergio Olavo Pinto da Costa³; Jucimar Zacaria¹; Sergio Echeverrigaray¹

¹*Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, RS, Brazil;* ² *Depto. de Citopatologia e Microbiologia, Faculdade de Biomedicina, Universidade de Cruz Alta, RS;* ³ *Catholic University of Santos, SP.*

ABSTRACT

Acanthamoeba are abundant in a wide range of environments, and some species are responsible for cutaneous infections, keratitis, and granulomatous amoebic encephalitis (GAE). The conventional detection and isolation of amoeba from clinical and environmental samples involves sampling and culture on non-nutrient Ágar medium. Although efficient, this system requires several transfers in order to eliminate contaminants, and is not appropriate for the isolation of individual amoeba from samples with a biodiverse community. In this study we propose an alternative method for the isolation of monocystic clones of *Acanthamoeba*. The propose method involves sampling, enrichment, encystment induction, and direct cysts micromanipulation and culture on Ágar plates.

Key words: *Acanthamoeba*, monocystic culture, micromanipulation

INTRODUCTION

Free-living amoebae are abundant in soil, dust and water. These organisms have been isolated from fresh water, seawater, surface water, swimming pools, mineral water, dust, contact lens solutions, among other environments (Khan, 2006; Visvesvara et al. 2007; Caumo et al., 2009; Costa et al., 2010). Several amphizoic amoebae occasionally invade hosts and cause infections, such as *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia* spp. and *Naegleria* spp. (Khan, 2003; Schuster and Visvesvara, 2004; Khan, 2006).

Acanthamoeba can invade human's skin, eye and central nervous system been responsible for cutaneous infections, keratitis, and granulomatous amoebic encephalitis (GAE), respectively (Kahn, 2003, 2006). In Brazil, a twenty years survey of *Acanthamoeba* keratitis showed that amoebic corneal infection can be considered as a well-established and increasing ophthalmological disease (Carvalho et al., 2009). Moreover, *Acanthamoeba* serves as a carrier for different microorganisms to humans, acting as a vehicle for circulation of pathogens between human and environment (Krusnell and Linder, 2001; Huws et al., 2008).

Various *Acanthamoeba* have been reported to be able to cause keratitis and other human infections, among which the most prevalent are *A. castellani*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes* and *A. hatchetti* (Walochnik et al., 2000a, Kahn, 2006). Although easily recognized at the genus level by their polygonal cysts, the accurate *Acanthamoeba* species determination and pathogenic potential involves molecular analysis (PCR, RFLP-PCR or DNA sequencing) and several behavioral tests

(osmotolerance, temperature tolerance and cytotoxicity assays) which require axenic and clonal amoeba cultures (Walochnik et al., 2000b).

Ágar culture is the mainstay for laboratory detection of *Acanthamoeba* from clinical and environmental samples. Amoeba isolation and culture procedures involves sampling, plating on non-nutrient Ágar medium covered by a *Escherichia coli*, incubation for 14 days at 30-37°C with periodical examination, amoeba harvesting at a noncontaminated site of the plate, and transfer to a fresh plate in order to eliminate ciliates, flagellates, bacteria and fungi. The overall isolation of *Acanthamoeba* is time consuming (7 to 60 days) and several samples, particularly environmental samples, are loose due fungal or bacterial contamination.

In order to solve these problems, we developed a rapid and reliable protocol for the clonal isolation of *Acanthamoeba* from environmental samples. Briefly, this protocol involves sampling, pre-culture, cyst induction, direct micromanipulation of cysts, and culture and sub-culture of monocystic amoeba clones.

MATERIAL AND METHODS

***Acanthamoeba* strains and sampling**

An *Acanthamoeba polyphaga* strain isolated from a non-hospital environment at Santos, SP, Brazil (Teixeira et al., 2009) was used in initial experiments to optimize culture and encystment conditions.

Ten samples were collected at the community areas of a public hospital at Caxias do Sul, RS, Brazil. Fresh water samples (200 ml) were transported in sterile flasks, and dust samples were collected with sterile swabs transported in sterile tubes. All samples were processed within 2h.

***Acanthamoeba* isolation and culture**

Three culture media were evaluated for *Acanthamoeba* culture: (1) NN-EI, non-nutritive medium (Page saline solution- 2.5 mM NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 0.5 mM Na₂HPO₄, 40 mM CaCl₂, and 20mM MgSO₄) seeded with 0.1 ml of a thermal inactivated 48-h culture of *E. coli* ATCC 11775, (2) NN-E, non-nutritive medium seeded with 0.1 ml of an active 48-h culture of *E. coli*, and (3) PYG medium [proteose peptone 0.75% (w/v), yeast extract, 0.75% (w/v) and glucose 1.5% (w/v)]. When necessary the above media were solidified with 1.0% Ágar (NNA-EI, NNA-E, and PYGA). Otherwise specified, *Acanthamoeba* were culture at 30-32°C, and encystment was induced by incubation at low temperature (4°C).

Cyst isolation was performed using a TDM Microscope E 50i (Schuett-biotec, Germany) specially designed for the dissection of yeast zygotes and tetrads.

In order to compare the efficiency of the proposed method, the samples were also processed by the conventional plating method adopted by several authors (Caumo et al., 2009; Teixeira et al., 2009; Costa et al., 2010), and preconized by the UK National Health Service (www.hpa-standardmethods.org.uk).

Morphological and molecular characterization

Amoeba cysts were directly observed under microscope at a 400X magnification, and identified as belonging to one of the cyst morphological groups (*Acanthamoeba* sp. I to III) as established by Pussard and Pons (1977). Molecular characterization of *Acanthamoeba* cultures was performed by RFLP-PCR of ssu rDNA according to Kong and Chung (1996).

RESULTS AND DISCUSSION

Initial experiment to determine enrichment conditions and cyst induction were performed with an environmental isolate of *A. polyphaga*. These experiments showed that NN-EI broth seeded with 10^8 cels/ml *E. coli* support better growth of trophozoites than NN-E medium. Static culture of *A. polyphaga* trophozoites for 24, 48 and 72 h in NN-EI broth allowed 2x, 5x and 6x enrichment of *A. polyphaga*, respectively. The transfer of active enrichment cultures to low temperature (4°C) for a period of 48 h induced up to 80% encystment. This percentage was not significantly increased by longer incubation (48h).

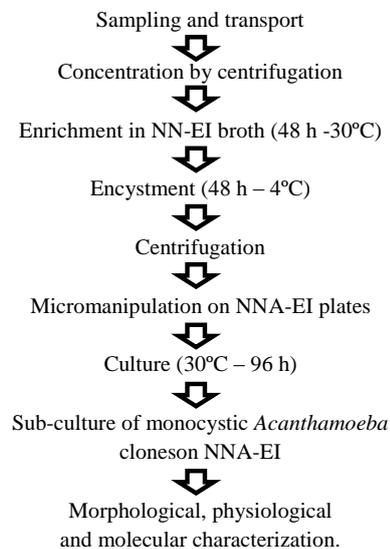


Figure 1 - Flowchart of the optimized process for the isolation of monocystic *Acanthamoeba* clones.

For micromanipulation, three solidified media were evaluated: NNA-EI, NNA-E, and PYGA. The presence of active *E. coli* on NNA-E posse several problem for the separation of cysts, particularly, a drastic modification on surface tension that difficult cyst attachment to the needle, and PYG did not support a good growth of *Acanthamoeba* increasing from 96 h to more than 168 h the growing period necessary for the first sub-culture of the clones.

Established the above basic conditions, ten samples (five fresh water and five dust samples) processed the conventional plating method and the proposed method summarized in Figure 1. Fresh

water samples (50 ml) were centrifuged in Falcon tubes (1000xg, 5 min) and the pellet suspended in 1ml NN-EI broth, and dust samples were directly suspended in 1ml NN-EI broth. For the conventional method, these samples were immediately plated on pre-seeded NNA-EI, sealed with plastic film, and incubated at 30°C. For the proposed method, samples were enriched by incubation for 48 h at 30°C, transferred to 4°C for 24 h to induce cyst formation, and microscopically monitored. Encysted samples were centrifuged (1000 xg, 5 min) and suspended in 50-100 µl of Page's saline. For micromanipulation, a loop (approx. 5 µl) of the suspension was spread in a straight line along the edge of a well dried NNA-EI plate. Under the microscope individual cyst were picked up with the micromanipulator needle and transferred to new positions on the plate. After manipulation, plates were sealed with plastic film and incubated at 30°C. Plates were daily examined with an inverted microscope, and actively growing amoebas from individual clones were transferred to fresh NNA-EI medium. Up to ten individual clones of positive samples were isolated and evaluated.

Table 1- Samples and isolates.

Sample	Origin	N ^o clones	Clone Name	Cyst type ¹	Molecular classification ²
W1	Water	5	W1.1	II	<i>A. castellanii</i>
W2	Water	0	-	-	-
W3	Water	4	W3.1	II	<i>A. castellanii</i>
		2	W3.2		<i>A. polyphaga</i>
W4	Water	0	-	-	-
W5	Water	0	-	-	-
D1	Dust	2	D1.1	II	<i>A. castellanii</i>
		6	D1.2	II	<i>A. polyphaga</i>
D2	Dust	10	D2.1	II	<i>A. castellanii</i>
D3	Dust	0	-	-	-
D4	Dust	0	-	-	-
D5	Dust	7	D5.1	II	<i>A. castellanii</i>
		1	D5.2	III	<i>A. lenticulata</i>

¹ Based on cyst morphology according to Pussard and Pons (1977).

² Based on the restriction patterns (MboI, HaeIII and TaqI) of the ssr rRNA amplicon (Kong and Chung, 1996).

Five of the ten environmental samples examined using the proposed method (Fig. 1) were positives for *Acanthamoeba* (Table 1). Overall cyst viability was 82% (37 growing clones from 45 isolated cysts). Two samples (W1 and D2) exhibited just one *Acanthamoeba* species, while in three samples (W3, D1 and D5) two species were identified. The most prevalent species was *A. castellanii* identified in four out of five positive samples. This species was the only *Acanthamoeba* isolated from samples W1 and D1, or was found associated with *A. polyphaga* (samples W3 and D1) and *A. lenticulata* (sample D5). *A. castellanii* was characterized by small cysts with stellate endocysts (Group II) and a typical RFLP-PCR pattern (Fig. 2). *A. polyphaga* was identified in three samples: W3 and D1 associated with *A. castellanii*, and D2, in which it was the only *Acanthamoeba* species identified

(Table 1). *A. lenticulata* was present in sample D5 associated with *A. castellanii*.

These results show that 50% of the samples (fresh water and dust) collected from a hospital environment in Southern Brazil harbor potentially pathogenic species of *Acanthamoeba* (*A. castellanii* and *A. polyphaga*), representing a risk for patients and visitors, and that 60% of the positive samples are co-contaminated by two *Acanthamoeba* species.

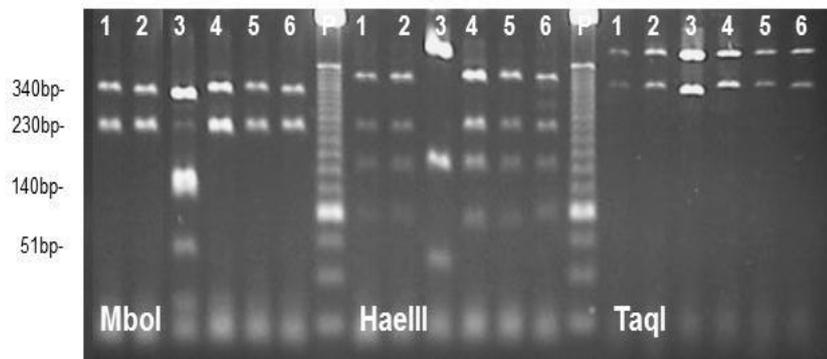


Figure 2 - ssu rDNA RFLP-PCR profiles of *Acanthamoeba* clones- *A. castellanii* (1- W1.1, 2- W3.1, 4- D1.1, 5- D2.1, 6- D5.1) and *A. polyphaga* (3- W3.2). P- Molecular marker 100bp ladder.

Using the plating method, sample W1 contaminated with fungi preventing *Acanthamoeba* isolation, only *A. castellanii* was isolated from sample D5, and at least three subcultures were necessary to decontaminate the positive samples. A comparison of the results obtained by the two methods indicates that the proposed protocol is more efficient and rapid than the conventional plating method. Moreover, this proposed optimized method allows the study of the structure of mixed populations by the isolation of monocystic clones.

RESUMO

Acanthamoeba são comuns em diversos ambientes, sendo algumas espécies responsáveis por infecções cutâneas, ceratite e encefalite granulosa amebiana (EGA). Os sistemas convencionais de detecção e isolamento de amebas de amostras clínicas e ambientais envolvem a amostragem e cultivo em meio não-nutritivo. Apesar de eficiente, este sistema requer diversos repiques para eliminação de contaminantes e não é apropriado para o isolamento de amebas individuais a partir de amostras contendo uma comunidade de amebas. No presente estudo apresentamos um método alternativo para o isolamento de clones de *Acanthamoeba* a partir de cistos isolados. O método proposto envolve amostragem, enriquecimento, indução de encistamento, e micromanipulação de cistos e cultivo em meio sólido.

REFERENCES

Carvalho, F.R.S.; Foronda, A.S.; Mannis, M.J.; Höfling-Lima, A.L.; Belfort, R. Jr.; Freitas, D. (2009).

- Twenty years of *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea**. 28: 516-519.
- Caumo, K.; Frasson, A.P.; Pens, C.J.; Panatieri, L.F.; Frazzon, A.P.; Rott, M.B. (2009). Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in southern Brazilian city of Porto Alegre. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 103: 477-485.
- Costa, A.O.; Castro, E.A.; Ferreira, G.A.; Furst, C.; Crozeta, M.A.; Thomaz-Soccol, V. (2010). Characterization of *Acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. 57: 70–75.
- Huws, S.A.; Morley, R.J.; Jones, M.V.; Brown, M.R.W.; Smith, A.W. (2008). Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*. **FEMS Microbiology Letters**. 282: 258-265.
- Khan, N.A. (2003). Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. **Microbial Pathogenesis**. 34: 277-328.
- Khan, N.A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiol Reviews**. 30: 564–595.
- Kong, H.E. & Chung, D.I. (1996). PCR and RFLP variation of conserved region of small subunit ribosomal DNA among *Acanthamoeba* isolates assigned to either *A. castellanii* or *A. polyphaga*. **Korean Journal of Parasitology**. 34: 127-134.
- Krusnell, J. & Linder, E. (2001). Bacterial infections of free-living amoebae. **Research in Microbiology**. 152: 613-619.
- Pussard, M. & Pons, R. (1977). Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**. 8: 557-598.
- Schuster, F.L. & Visvesvara, G.S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal of Parasitology**. 34: 1001-1027.
- Teixeira, L.H.; Rocha, S.; Pinto, R.M.F.; Caseiro, M.M.; COSTA, S.O.P. (2009). Prevalence of potentially pathogenic free-living amoebae from *Acanthamoeba* and *Naegleria* genera in non-hospital, public, internal environments from the city of Santos, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 13: 395-397.
- Visvesvara, G.S.; Moura, H.; Schuster, F.L. (2007). Pathogenic and opportunistic free living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 50: 1–26.
- Walochnik, J.; Haller-Shober, E.M.; Kölli, H.; Picher, O; Obwaller, A.; Aspöck, H. (2000a). Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens-wearing keratitis patients in Austria. **Journal of Clinical Microbiology**. 38: 3932-3936.
- Walochnik, J.; Obwaller, A.; Aspöck, H. (2000b). Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Applied and Environmental Microbiology**. 66: 4408-4413.

CAPÍTULO 2

Caracterização laboratorial de amebas de vida livre isoladas de ambientes acadêmicos

(Artigo aceito para publicação em Revista Brasileira de Análises Clínicas)

Caracterização laboratorial de amebas de vida livre isoladas de ambientes acadêmicos

Janice Pavan Zanella¹, Juliana Raquel Damer², Alice Zanella³, Ana Paula Delamare⁴, Sérgio Echeverrigaray⁵

RESUMO - No Brasil os restritos relatos de isolamento de amebas de vida livre (AVL) em ambientes internos referem-se a hospitais. As amebas de vida livre (AVL) são protozoários aeróbios, potencialmente patogênicos que estão amplamente distribuídos no meio ambiente e apresentam-se resistentes a vários produtos desinfetantes e às condições extremas do ambiente. Neste estudo, pesquisou-se a ocorrência destas amebas em diferentes ambientes acadêmicos e realizou-se a identificação morfológica segundo critérios de Page. Para tanto foram coletadas 200 amostras de diversos ambientes de uma universidade do sul do país e semeadas em ágar Page (não nutriente) acrescido de *Escherichia coli* inativada. Incubou-se a 30°C por 15 dias e após pesquisou-se a presença de cistos e trofozoítos sobre o ágar. A identificação dos gêneros foi executada através de exames a fresco e coloração de Gram e Panótipo Rápido. Obteve-se resultados positivos em 15/200 das amostras, sendo que os corredores foram os locais mais contaminados (13/15). Através das análises realizadas, observou-se que os trofozoítos e cistos de todas as amostras positivas apresentavam características sugestivas do gênero *Acanthamoeba*, com média de 4 a 6 braços do endocisto, trofozoítos com acantopódios e movimentação lenta, que confirma que esta AVL está presente em frequências importantes nos ambientes secos e fechados. Não foram encontradas AVL pertencentes ao gênero *Naegleria*, o que pode ter ocorrido pelo fato desta ser mais prevalente em lugares úmidos ou aquáticos.

Palavras chave: amebas de vida livre, poeira ambiental, biofilme, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, ambiente acadêmico

SUMMARY- In Brazil, the limited reports of isolation of free-living amoebae (FLA) in indoor environments refer to hospitals. The free-living amoebae potentially pathogenic (FLA) are aerobic protozoa are widely distributed in the environment. Are highly resistant to many disinfectants and extreme product of the environment. In this study, researched the occurrence of amoebae in different environments and was held on morphological identification by comparison with standard strain, according to Page. Samples were collected in a university and not sown on nutrient Ágar. Was incubated at 30 ° C for 15 days and further research is the presence of cysts on the Ágar. There was the identification of genera by examinations of the fresh and Gram staining and Panótipo. Results obtained up to 7.5% of the samples, with the runners the most contaminated sites. Through analysis, it appears that the trophozoites and cysts of all samples had characteristics suggestive of the genus *Acanthamoeba*, which confirms that the FLA is present in dry environments in large quantity. There were no FLA belonging to the genus *Naegleria*, which may have occurred because this is more

prevalent in aquatic places.

Keywords: free-living, environmental dust, biofilms, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, the academic environment

¹-Janice Pavan Zanella – Depto. de Citopatologia e Microbiologia – Faculdade de Biomedicina - Universidade de Cruz Alta, Rs. Discente do PPG-Doutorado, Instituto de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada -Universidade de Caxias do Sul

²-Juliana Raquel Damer –Farmacêutica, URI

³Alice Zanella – acadêmica de Medicina –UNISC- Santa Cruz do Sul

⁴-Ana Paula Delamare –Docente do PPG Doutorado- Instituto de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada - Universidade de Caxias do Sul

⁵-Sérgio Echeverrigaray – Docente do PPG-Doutorado, Instituto de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada -Universidade de Caxias do Sul

INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários aeróbios amplamente distribuídos no meio ambiente permitindo múltiplas oportunidades de exposição e de contatos com seres humanos e animais, como evidenciado por anticorpos pesquisados em populações humanas²⁴. Porém, somente as espécies dos gêneros *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* e *Hartmannella* têm sido encontrados em pacientes humanos⁴. As AVL se alimentam de microrganismos com os quais possam manter uma relação endossimbiótica e persistindo por anos na forma de cistos o que os permite sobreviver em ambientes desfavoráveis²⁵.

Embora o número de infecções determinadas por estas amebas seja considerado baixo em comparação com outras parasitoses causadas por protozoários (tripanossomíase, toxoplasmose, malária, entre outros), a dificuldade de diagnosticá-las e o desafio de encontrar antimicrobianos efetivos no tratamento, com redução da morbidade e mortalidade relativamente elevados, é motivo de preocupação para os profissionais de laboratório e clínicos.

As amebas *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba spp.*, *Mandrillaris balamuthia* e *Sappinia sp.* são patogênicas. *N. fowleri* ocasiona Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP) doença fatal que evolui rapidamente pelo Sistema Nervoso Central, enquanto *Acanthamoeba spp.* e *B. mandrillaris* causam Encefalite Granulomatosa Crônica. A *Acanthamoeba spp.*, também pode causar lesões cutâneas e ceratite amebiana, uma infecção que atinge a córnea e que está associada ao uso de lentes de contato ou trauma ocular⁴.

As AVL foram conhecidas como bioagentes causadores de infecção em humanos somente a

partir do ano de 1965, quando Fowler descreveu o primeiro caso de MAP causada por *Naegleria fowleri*. Hoje, sabe-se que muitas espécies de amebas possuem um alto potencial patogênico podendo assim, causar graves infecções¹⁹.

No Brasil, os primeiros casos em humanos foram relatados por Campos no ano de 1977 e por Salles-Gomes no ano 1978 sendo as pesquisas aprofundadas por Foronda e Affonso MHT, em São Paulo, e por Salazar e Moura no Rio de Janeiro¹⁷.

Levando-se em consideração as graves conseqüências para a saúde decorrentes da infecção por AVL, o diagnóstico rápido é fundamental para um tratamento precoce. O exame microscópico corado e a cultura de espécimes biológicos (líquor, raspado de córnea) têm sido realizados em laboratório clínico para auxiliar no diagnóstico diferencial especialmente da ceratite amebiana. Estes testes apresentam a vantagem de serem procedimentos simples, de fácil execução, rápidos e de custos reduzidos. Atualmente, estão disponíveis ensaios mais sensíveis e específicos, utilizando técnicas moleculares como PCR convencional, em tempo real e PCR multiplex para identificação desses patógenos nos tecidos da biópsia, líquido e amostras de córnea.

As principais características citomorfológicas que são base para a classificação do gênero deste grupo de AVL são:

a) *Naegleria fowleri*: apresenta três formas evolutivas. *Trofozoítica*: mede cerca de 10 a 30µm, de forma cilíndrica, possui movimentação rápida por pseudópode único, um a seis vacúolos pulsáteis periféricamente, e vacúolos digestivos que são responsáveis por realizar a fagocitose; *Cística*: mede de 7 a 12µm, é circular ou poligonal, possui paredes lisas, poros, é uninucleada; *Flagelar*: mede de 12 a 18µm, possui dois flagelos que se movimentam na água, provavelmente sendo os responsáveis pela dispersão deste microrganismo^{7,10,13,19}.

b) *Acanthamoeba spp*: possui duas formas de ciclo de vida. *Trofozoítica*: mede de 15 a 40 µm, citoplasma granuloso, movimenta-se lentamente por pseudópodes com projeções filiformes chamadas acantopódios (semelhantes a espinhos), é uni ou multinucleado, possui vacúolos pulsáteis que auxiliam na regulação osmótica e desaparecem e reaparecem em intervalos irregulares. A *Cística*: é a forma resistente da ameba e é observada quando há condições desfavoráveis à sua alimentação e reprodução, é uninucleada, mede de 15 a 20µm, possui paredes duplas, provida de poros (ostíolos), a interna é rugosa, também chamada de endocisto, o que lhe confere aspecto estrelado, esférico ou poligonal, e a externa, também chamada de ectocisto, é irregular ou ondulada, possui o opérculo, local por onde a ameba sai ao desencistar^{1, 8, 10, 19}.

Apesar das AVL serem apresentarem distribuição continental, não há informação sobre a ocorrência dessas amebas patogênicas na região deste estudo, porém devemos considerar as dificuldades de se estabelecer um diagnóstico através de análises citológicas e à disponibilidade limitada de recursos técnicos e de profissionais habilitados, muito embora, às vezes, as dificuldades ocorrem também em centros com maior disponibilidades de recursos.

No Brasil os poucos relatos de isolamento de AVL em ambientes internos referem-se aos

hospitais. Teixeira et al.²⁵, da Universidade de Santos, SP, são um dos primeiros a relatar a presença destes microorganismos em ambientes internos não-hospitalar.

Diante deste cenário, e devido as AVLs serem causas de infecções importantes realizou-se estudo com o objetivo de verificar a ocorrência destas no ambiente interno de uma universidade do sul do país, que apresenta diariamente grande fluxo de pessoas jovens e saudáveis, oriundas de diversos locais e comunidades, avaliando-se a poeira de diversos locais como banheiros, salas de aula, laboratórios e corredores, além dos biofilmes de pias e torneiras de banheiro, e bebedouros e, classificar o gênero *Acanthamoeba* spp. e a *Naegleria fowleri* através de características citomorfológicas, segundo critérios de Page²⁰.

METODOLOGIA

Foram coletadas 200 amostras, aleatoriamente, de diversos ambientes acadêmicos de uma Universidade do sul do país. A prevalência de AVL foi determinada a partir da coleta de poeira em ambientes fechados de banheiros, salas de aula, laboratórios e corredores com auxílio de swabs esterilizados e secos, no período de janeiro a abril de 2009. Nesta instituição de ensino circulam diariamente cerca de 3.000 pessoas entre alunos, professores e funcionários. As áreas estudadas foram submetidas a limpeza e higienização com água e diferentes produtos químicos contendo cloro, duas vezes ao dia, durante os inter-turnos, uma vez que funcionam cursos diurnos e noturnos.

Foram utilizados 200 swabs para a coleta, que foram passados sobre as áreas escolhidas, sendo que cada swab foi colocado em tubo de ensaio, contendo 2mL de água destilada esterilizada. Após ocorrer a homogeneização em vortex, os mesmos foram descartados. As amostras foram centrifugadas e o sedimento foi utilizado como inóculo. Deste, 100µL foram adicionados ao centro da placa contendo o meio não nutritivo a 1,5% (Page) recoberto com suspensão bacteriana de *E. coli* (ATCC 11775) inativada pelo calor, seladas com Parafilm® e incubadas a 30°C por 15 dias. Os procedimentos foram realizados em triplicata. Observações em microscópio óptico (objetivas de 10x e 40x), em torno da área de semeadura, com placa invertida, foram realizadas em dias alternados para a pesquisa de cistos e trofozoítos

As áreas que possuíam cistos e trofozoítos foram demarcadas e retirou-se cerca de 1cm² de Ágar, o qual foi transferido com a face voltada para baixo, ao centro da outra placa previamente preparada e identificada igualmente ao processo inicial. Assim, estas foram seladas com Parafilm® e incubadas em estufa a 30°C. A observação ocorreu em dias alternados. Repetindo-se este procedimento de repique a cada sete dias, durante três semanas.

Após um período de cinco a sete dias de incubação e obtendo-se um bom crescimento dos trofozoítos, a placa foi colocada sobre bolsas de gelo durante 15 minutos, para o descolamento destes. Em seguida, adicionou-se 1mL de água destilada esterilizada e raspou-se suavemente o meio com alça de Drigalski. O líquido foi recolhido com auxílio de micropipeta e mantido em *Eppendorf* para as

análises. Em seguida, colocou-se sobre duas lâminas 20µL do líquido obtido e, após secas a temperatura ambiente, foram submetidas à coloração de Panótipo rápido e de Gram e observadas em microscópio óptico (objetivas de 40X e 100X). Os cistos e trofozoítos ainda foram observados por exame direto a fresco e corados com lugol (objetivas de 10X e 40X).

Para o teste de exflagelação, os trofozoítos foram removidos da superfície das placas de ágar não-nutriente, com adição de 10mL de água destilada estéril e raspada cuidadosamente com alça de platina. O líquido foi colocado em placas de Petri estéreis e foram incubadas a 37°C. As placas foram examinadas ao microscópio para verificar a emissão de flagelos a cada 30 minutos durante 4 horas. As amostras negativas foram observadas por até 24 horas e, então, descartadas²³.

A identificação das amebas baseou-se no tipo de movimento e nos critérios morfológicos dos cistos e trofozoítos, segundo Page & Pusard²⁰.

RESULTADOS

Nas 200 amostras analisadas provenientes de diversos ambientes acadêmicos, foram encontradas 15 (7,5%) amostras positivas para AVL. Na Tabela 01 encontram-se detalhadamente os resultados em cada local de coleta.

Tabela 01 - Isolamento de AVL potencialmente patogênicas em amostras de poeiras e biofilmes, segundo os respectivos locais de coleta.

Local de Coleta	Número de Amostras	Amostras Positivas	% (Por Local)	% (Total)
(L)*	40	1	2,5	0,5
(S)**	40	0	0,0	0,0
(B)***	40	1	2,5	0,5
(C)****	80	13	16,25	6,5
Total	200	15	-	7,5

* Laboratórios

** Salas de aula

*** Biofilme de pias e torneiras de banheiro e bebedouros

**** Corredores

Após a identificação microscópica, (colorações de Gram, Panótipo Rápido, Lugol e exame a fresco) as 15 amostras positivas apresentaram cistos e trofozoítos sugestivos de *Acanthamoeba* spp., como pode ser observado na Figura 01. O teste da exflagelação foi negativo para todas as amostras testadas.

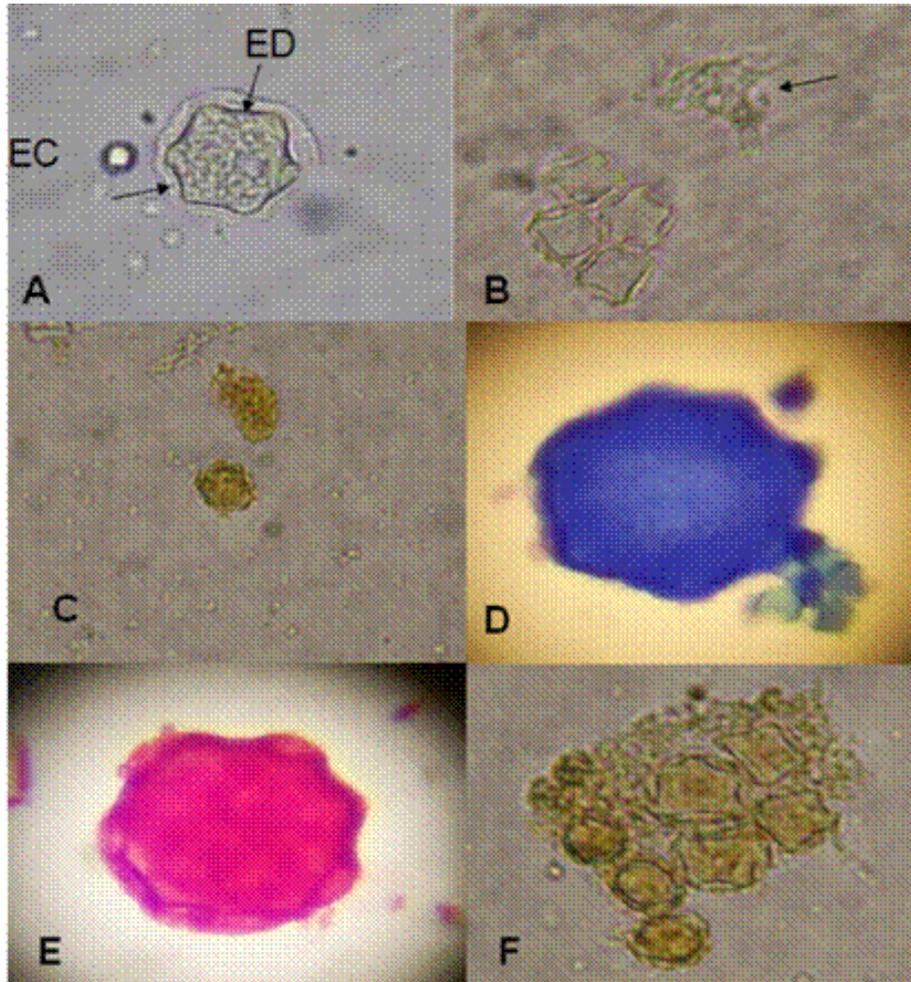


FIGURA 01: Morfologia de trofozoítos e cistos com distintas colorações. **A-** Cisto sugestivo de *Acanthamoeba spp.*, endocisto (ED) e o ectocisto (EC), coloração à fresco (400X). **B-** Cistos e trofozoítos sugestivos de *Acanthamoeba spp.*, forma estrelada e quadrada. Seta indica o pseudópode de trofozoíto; coloração à fresco (400X). **C-** Cisto e trofozoíto sugestivo de *Acanthamoeba spp.*; corado à fresco com lugol (400X). **D-** Cisto sugestivo de *Acanthamoeba spp.*, forma poligonal; coloração de panótípo rápido (1000X). **E-** Cisto sugestivo de *Acanthamoeba spp.*. Apresenta forma estrelada, coloração de Gram (1000X). **F-** Cistos de *Acanthamoeba spp.*, coloração de lugol (400X).

Neste trabalho utilizamos as colorações de Gram e Panótípo Rápido que coram estruturas celulares importantes permitindo a análise citológica dos cistos, conforme descrita na Tabela 02.

TABELA 02- Características morfológicas de cistos sugestivos de *Acanthamoeba* spp., encontrados nas amostras.

AMOSTRA	NÚMERO DE BRAÇOS DO ENDOCISTO*	MORFOLOGIA DOS CISTOS*
C 69	3-6	Estrelado, triangular
C 70	4-7	Estrelado e quadrado
C 52	3-6	Estrelado, triangular
C 18	4-7	Estrelado e quadrado
C 58	3-6	Estrelado, triangular e quadrado
C 17	4-7	Estrelado e quadrado
L 8	4-7	Estrelado e quadrado
B 20	6-7	Estrelado
C 53	0-6	Quadrado, estrelado, oval
C 62	0-7	Estrelado, oval
C 16	0-6	Estrelado, oval
C 72	0-7	Estrelado, quadrado, oval
C 9	0-7	Estrelado, triangular, oval
C 26	4-7	Estrelado e quadrado
C 30	3-6	Estrelado, triangular e quadrado

*Baseado na média de 10 cistos contados

Os trofozoítos também foram analisados em microscópio óptico em exame a fresco com salina de Page e apresentavam acantopódios (Figura 02), pseudópode hialino (Figura 03) e movimentavam-se lentamente, o que os difere de trofozoítos de *Naegleria fowleri*, pois esta AVL movimenta-se rapidamente quando é acrescentado água ao meio. Apresentavam também vacúolos contráteis que contraíam em tempos variados.



FIGURA 02- - Trofozoíto *Acanthamoeba* spp. Presença de acantopódios a fresco com salina de Page (Seta). 400X

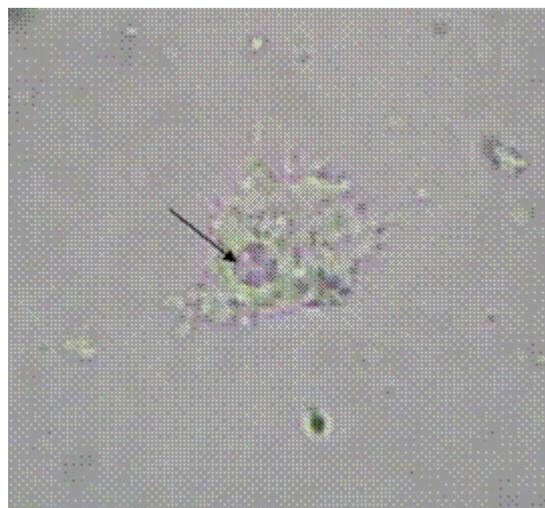


FIGURA 03 – Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp, onde se observa o vacúolo contrátil (seta) a fresco com salina de page. (400X)

DISCUSSÃO

As AVL são ubiqüitárias no ambiente²³. Porém, relatos de isolamentos de amebas de vida livre em ambientes fechados ou em poeira ambiental, são poucos e referem-se mais ao ambiente hospitalar.

Um dos objetivos deste estudo, além de determinar a presença de AVL em ambientes acadêmicos fechados, foi utilizar os critérios citomorfológicos para identificar este grupo de protozoários reunindo maior número de informações morfológicas como base para caracterizar o gênero *Acanthamoeba* e *Naegleria*.

Entre as amostras consideradas positivas para a presença de AVL, a maioria (16,25%) foram provenientes dos corredores da Universidade em estudo (Tab 01), correspondendo à área que apresenta maiores aglomerados e trânsito de pessoas durante os intervalos. De certa forma, pessoas oriundas de diferentes locais e cidades, carregam, através dos calçados, estes microrganismos para estas áreas.

Nestas amostras, a avaliação citomorfológica predominante foi de cistos com 4 a 6 braços no endocisto e forma estrelada/quadrada. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura não mencionam a avaliação do número de braços do endocisto, apenas a caracterização geral como a presença de duas paredes, sendo que o endocisto lhe confere aspecto estrelado, esférico ou poligonal e o ectocisto aspecto irregular e ondulado e o tipo de movimento apresentado pelas AVL^{2, 6, 7, 22}.

Em todas as 15 amostras positivas foram encontrados cistos e trofozoítos sugestivos de *Acanthamoeba* spp., e nenhuma foi positiva para *Naegleria fowleri*, talvez, pelo fato da *Naegleria fowleri* estar mais presente em ambientes úmidos e ser mais sensível à ação de agentes químicos utilizados na limpeza destas áreas. Para

Bastista e col.⁵, o gênero *Acanthamoeba* é o mais amplamente encontrado, tanto em ambientes secos quanto em águas. Dados obtidos por Santos²² são concordantes quanto à prevalência de *Acanthamoebas* em ambiente fechado

Recentemente Teixeira e col.²⁵ publicaram trabalho relatando uma presença de 39% de positividade de AVL em ambiente fechado de uma Universidade na cidade de Santos (SP), analisando a morfologia de cistos e trofozoítos e o tipo de movimentação apresentada.

Embora, segundo as pesquisas de Mello & cols.¹⁶, as AVL são intensamente encontradas em biofilmes, pois representam uma fonte de nutrientes para elas e possuem a capacidade de crescer em diferentes superfícies, inclusive na superfície da água, alimentos, dentes, lentes oculares e em vários implantes biomédicos, o que pode levar a diversas infecções, obteve-se positividade em apenas uma amostra de biofilme de pias, torneiras e bebedouros.

Carlesso⁶ isolou AVL encontradas em amostras de poeira e biofilmes coletados de 15 ambientes de um hospital, obtendo resultados positivos em 35%. Apenas no CTI (Centro de

Tratamento Intensivo) não foram encontradas amostras positivas. Porém, em todos os outros locais houve positividade para AVL. Difere com o ocorrido na pesquisa de Silva & Rosa²³, com AVL isoladas de poeira de dois hospitais de uma cidade paulista, pois na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) e na área cirúrgica foram encontrados estes microrganismos (29% e 33% respectivamente). Ainda, neste estudo de Silva & Rosa, 45,5% das amostras foram positivas e, destas, 45,5% pertenciam ao gênero *Acanthamoeba* e apenas 3,8% ao gênero *Naegleria*. Também, Crozzeta¹⁰ realizou a pesquisa de AVL, do gênero *Acanthamoeba* spp. no Hospital de Clínicas da UFPR, em Curitiba-PR. Em seu trabalho encontrou positividade nas 30 amostras coletadas em diferentes pontos do hospital, o que fornece um percentual de positividade em 100% das amostras.

Já Rohr & cols.²¹ pesquisaram a presença de AVL em seis hospitais da Alemanha e encontraram-nas em cerca de 56% das amostras de água quente e 47 % em sanitários, sendo que as AVL mais frequentes foram dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*.

Os trabalhos de Kilvington & cols.¹⁴, avaliaram 84 amostras provenientes de águas termais na Inglaterra em busca de *Naegleria fowleri*. Destas, 10 amostras foram positivas, o que indica que estas amebas, embora com elevado grau patogênico, ocorrem em ambientes que são frequentados constantemente por pessoas, expondo-as ao risco de contaminação.

De acordo com Falchi & cols.¹², que analisaram mensalmente amostras de água de 12 pontos da Laguna dos Patos, em Rio Grande-RS, onde havia maior concentração populacional e eram derramados esgotos pluviais ou domésticos, 91,7% tinha protozoários, além de outros microrganismos patogênicos, como bactérias e fungos, o que sugere uma maior atenção para ações de planejamento sanitário e medidas educativas e preventivas com o intuito de evitar contaminações humanas.

Estudos de Alves² revelaram a presença de AVL em piscinas e no solo, no Distrito Federal, em 39,33% e 93,9% respectivamente e, após realizar a identificação morfológica, concluiu que os gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Vannella* estavam presentes nas amostras.

Assef³, pesquisando a presença de AVL do gênero *Acanthamoeba* em amostras de nove marcas de água mineral na cidade de Foz do Iguaçu-PR, obteve resultados positivos para 55,5% das amostras coletadas, em exames a fresco e culturas em caldo.

Em estudo realizado por Costa e col.⁹, onde também pesquisou a presença de microrganismos patogênicos nas águas que margeiam a cidade do Rio Grande, das 48 amostras coletadas 25% continham AVL do gênero *Acanthamoeba* e 6,3% do gênero *Naegleria*. Para os autores a presença de grande número de bactérias, inclusive coliformes fecais e fungos em 100% das amostras e o derrame de dejetos na água, são alguns dos principais fatores para a presença destas amebas nestes locais.

CONCLUSÃO

Com este estudo, consideramos que as amebas de vida livre estão dispersas em vários ambientes e locais da área de estudo. A maioria das amostras positivas para AVL foi coletada de

poeira dos corredores da Universidade, o que demonstra que as AVL do gênero *Acanthamoeba* são mais prevalentes em ambiente seco. A identificação citomorfológica correspondeu aos critérios descritos por Page. A ausência de *N. fowleri* pode estar relacionada à sua sensibilidade à ação de agentes químicos utilizados na limpeza

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Alvarenga, L.; Freitas, D.; Lima, A. (2000). Ceratite por *Acanthamoeba*. **Arq. Bras. Oftalmol.** 63(2):155-159.
- 2- Alves, D. (2006). Isolamento e caracterização morfológica de amebas de vida livre em amostras de solo e água de piscina no Distrito Federal. **Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde**. Universidade de Brasília.
- 3-Assef, L S. (2008). Pesquisa de *Acanthamoeba* sp. em água mineral. **Monografia de Pós-Graduação em Análise Ambiental**. Faculdade Anglo Americano. Foz do Iguaçu, PR.
- 4-Azevedo, B.R.; Tanowitz, H.B; Cabral, F.M.(2009). Diagnóstico de infecções causadas por amebas de vida livre patogênicas. **Interdiscip Perspect Infect Dis.** 25:1406.
- 5-Batista, R.; Gomes, A.; Oddó, D.; Viana, L.; Pinto, R.; Braga, B.; Rôças, G.; Geller, M.; Antonio, V. (2007). Neuro-infecção por *Naegleria fowleri*: aspectos clínico-terapêuticos, epidemiológicos e ecológicos. **Rev. de Neurociência.** 15(4): 310-316.
- 6-Carlesso, A. (2006). Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS. **Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.
- 7-Carlesso, A.; Simonetti, A.; Artuso, G.; Rott, M. (2007). Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. **Rev. da Soc.de Bras. de Med.Trop.** 40 (3): 316-320.
- 8-Cimerman, B. (2002). **Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais**. 2.ed São Paulo. Atheneu.
- 9-Costa, C. & Mendonza-Sassi, R. (2007). Identificação de patógenos humanos nas águas que margeiam a cidade do Rio Grande/RS. **Rev. Baiana de Saúde Pública.** 2 (31): 203-213.
- 10-Crozetta, M. (2007). Identificação morfológica e molecular de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* isoladas em poeira de ambiente hospitalar. **Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR.
- 11-De Carli, A.G. (2001). **Parasitologia Clínica**. Ed. São Paulo. Atheneu.
- 12-Falchi, R. (2006). Contaminação por protozoários potencialmente patogênicos ao homem na água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS. **Dissertação de mestrado em Ciências (Parasitologia)**. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS.
- 13-Jain, R.; Prabhakar, S.; Modi, M.; Bhalia, R.; Sehgal, R. (2002). *Naegleria* meningoenzephalitis: a

- rare survival. **Neurol Índia**. 50(4): 470-472.
- 14-Kilvington, S. & Beeching, J. (1995). Identification and Epidemiological Typing of *Naegleria fowleri* with DNA Probes. **Applied and Environmental Microbiology**. 61(6): 2071–2078.
- 15-Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. **Clin. Microbiol. Rev.** 16 (2): 273-307.
- 16-Melo, L.F.; Bott, T.R.; Fletcher, M.; Capceville, B (1992). Biofilms – Science and technology. **Nato Asi Series**. 223.
- 17-Neves, D. (2003). **Parasitologia Humana**. 10.ed. São Paulo. Atheneu.
- 18-Oddó, D. (2006). Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. **Rev Chil Infectol**. 23(3): 200-214.
- 19-Pacheco, L. & Martins, A. (2008). A importância do estudo das amebas de vida livre. **Saúde & Ambiente em Revista**. 3(1): 57-65.
- 20-Page, F.C. (1967). Re-Definition of the Genus *Acanthamoeba* with Descriptions of Three Species. **J. Protozool**. 14 (4):709-724.
- 21-Rohr, U.; Weber, S.; Michel, R.; Selenka, F.; Wilhelm, M. (1998). Comparison of Free-Living Amoebae in Hot Water Systems of Hospitals with Isolates from Moist Sanitary Areas by Identifying Genera and Determining Temperature Tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**. 64 (5): 1822–1824.
- 22-Salazar, H.; Moura, H.; Ramos, R. (1982). Isolamento de amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. **Rev. de Saúde Pública**. 16: 261-267.
- 23-Silva, M. & Rosa, J. (2003). Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira hospitalar. **Rev. de Saúde Pública**. 37 (2): 242-246.
- 24-Schuster, F.L. & Visvesvara, G. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **Intern. Journ for Parasitol**. 34(9):1001-1027.
- 25-Teixeira, L.H; Rocha, S; Pinto, R.M.F ; Caseiro, M.M; Costa, S.O.P. (2009). Prevalence of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae from *Acanthamoeba* and *Naegleria* Genera in Non-Hospital, Public, Internal Environments from the City of Santos, Brazil. **The Brazil Journ of Infect Diseas**.13(6): 395-397.

CAPÍTULO 3

Isolamento e estudo citomorfológico de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* em diferentes ambientes umidos na Universidade de Cruz Alta, RS, Brasil

(Artigo enviado para publicação em Revista de Patologia Tropical)

Isolamento e estudo citomorfológico de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* em diferentes ambientes úmidos na Universidade de Cruz Alta, RS, Brasil

Janice Pavan Zanella^{1,2}, Daniele Ceolin Zuffo¹, Andréia Saggin Nagel¹, Rita Leal Sperotto^{1,3}, Sergio Echeverrigaray²

¹ Universidade de Cruz Alta, Cruz Alta, RS; ² Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS; ³ Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

RESUMO

Acanthamoebas são amebas de vida livre (AVL), amplamente distribuídas no ambiente e responsáveis por casos de ceratite amebiana e encefalite amebiana granulomatosa. Objetivou-se determinar a ocorrência de AVL do gênero *Acanthamoeba* em amostras de biofilmes e de águas no campus da Universidade de Cruz Alta através do isolamento e caracterização citomorfológica dos cistos. Para isto, um total de 66 amostras foram coletadas e cultivadas em Ágar Page recoberto com uma suspensão de *Escherichia coli* inativada onde se pesquisou a presença de cistos e trofozoítos. A identificação do gênero foi executada através da microscopia dos esfregaços à fresco e corados. Obteve-se resultado positivo para a presença de AVL em 28,78% das amostras, sendo que as pias e torneiras foram os locais mais contaminados (19,69%). Através das análises realizadas, observou-se que todos os trofozoítos e cistos das amostras positivas apresentavam características sugestivas ao gênero *Acanthamoeba*, com predomínio de cistos nas formas poligonal e estrelar, trofozoítos com acantopódios e movimentação lenta. Esse achado de *Acanthamoeba* spp. confirma mais uma vez que as AVL estão presentes em locais de fácil acesso ao público e nos permite reforçar a necessidade de se ampliar os estudos epidemiológicos destes agentes reconhecidos por apresentarem características patogênicas importantes ao homem.

DESCRITORES: *Acanthamoeba*. Ceratite. Biofilme.

INTRODUÇÃO

Denominam-se amebas de vida livre (AVL) um grupo de protozoários unicelulares presentes em variados ambientes e locais com água como rios, lagos, piscinas, esgotos, águas de efluentes industriais, além de solos e fluídos ou tecidos oriundos da orofaringe humana (7) entre outros. Estes microrganismos são reconhecidos por serem amplamente encontrados em todos os continentes e serem capazes de sobreviver e de se multiplicar sem a presença de um hospedeiro (29). De acordo com os mesmos autores, os cistos dessas amebas persistem por muitos anos no ambiente, sendo resistentes às mudanças de temperatura, ao pH e a vários detergentes e desinfetantes. As AVL, pertencentes aos variados gêneros, alimentam-se de bactérias, fungos, partículas e são muito adaptáveis ao meio ambiente. Entretanto, algumas espécies dos gêneros *Acanthamoeba*, *Ballamuthia* e *Naegleria* são considerados potencialmente patogênicos, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (27), podendo ser adquiridas via inalação, aspiração ou simples contato com águas contaminadas. Segundo

Cermeño e colaboradores (8) tem havido, nas últimas décadas, um incremento de casos de meningoencefalite amebiana primária, causada pela *N. fowleri*, que causa infecção supurativa cerebral com mau prognóstico, principalmente em crianças e adolescentes. O gênero *Acanthamoeba* tem sido implicado como veículo de várias bactérias patogênicas, como por exemplo, a *Legionella* spp., que também é responsável por lesões do Sistema Nervoso Central (SNC), casos de ceratite, a qual tem se mostrado um problema crescente em oftalmologia, além de ulcerações cutâneas (14). O fato de estas espécies parasitárias estarem disseminadas no meio ambiente e coexistirem tanto em indivíduos sadios como em imunocomprometidos, podem ser utilizadas como indicador de qualidade do meio ambiente e da saúde pública. Assim como ainda há poucos estudos no país sobre a prevalência e a descoberta de possíveis fontes de contaminação de AVL, este estudo tem sido considerado pioneiro na avaliação da frequência de *Acanthamoebas* em biofilmes e águas de comunidades acadêmicas no Rio Grande do Sul. Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar as amebas de vida livre, do gênero *Acanthamoeba*, encontradas em diferentes locais úmidos do campus da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), a fim de alertar sobre a presença de focos deste protozoário potencialmente patogênico e realizar um levantamento real quanto aos riscos de exposição, visando orientar condutas para eliminação dos mesmos e a inserção de métodos profiláticos nesses ambientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 66 amostras, aleatoriamente, de diferentes ambientes úmidos do campus da Universidade de Cruz Alta-RS. As amostras de biofilmes foram coletadas em bebedouros, torneiras, pias e amostras de água obtidas em rede de abastecimento, chafariz e açude entre os meses de maio a dezembro de 2010.

As amostras dos biofilmes foram coletadas com swabs estéreis de forma aleatória, os quais após as coletas foram colocados em tubos de ensaio contendo 2mL de água destilada. Os tubos foram centrifugados a 250 *xg* durante 5 minutos. Uma alíquota de 100µL do sedimento foi cultivada em placas de ágar não nutriente (Ágar Page), com suspensão de *Escherichia coli* inativada pelo calor (56°C / 2 horas).

Já as amostras de água foram coletadas em um volume de 500mL, com auxílio de béqueres, os quais foram vedados com papel filme e deixados em repouso por 1-2 dias para sedimentação espontânea. Um volume de 50mL do sedimento foi colhido e submetido à centrifugação (250 *xg* durante 5 minutos). Deste mesmo sedimento, 100µL foram igualmente cultivados conforme a descrição anterior, em placas de Ágar Page, contendo *Escherichia coli* inativada pelo calor (56°C / 2 horas), sendo todas as amostras processadas em duplicata. Após a semeadura, as placas foram seladas com Parafilm® e incubadas a 30°C por até 15 dias (10). A verificação do crescimento amebiano foi realizada durante o período de incubação, em dias alternados, em microscópio óptico. As áreas da placa de cultivo, identificadas com crescimento amebiano, tiveram o Ágar extraído e inoculado com a face voltada para baixo no centro de uma nova placa de Ágar Page (1,5%) contendo Anfotericina B e

E.coli inativada. Essas placas foram seladas novamente e incubadas a 35°C por até sete dias. Além disso, foram realizados repiques semanais no processo de cultivo monoxênico, o que nos permitiu reduzir a presença de contaminantes e assim obteve-se um crescimento suficiente para a realização das provas de identificação.

A observação morfológica de cistos e trofozoítos em esfregaços corados foi realizada a partir dos isolados de cultivos monoxênicos, fixados e corados, segundo as técnicas do Panóptico Rápido, Gram e de Papanicolaou modificada, de acordo com os protocolos dos Laboratórios de Microbiologia e Citopatologia da UNICRUZ. Os dados obtidos foram avaliados descritivamente através do cálculo do percentual de frequência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 66 amostras de água e materiais dos biofilmes coletados dos ambientes selecionados, 19 (29%) mostraram-se positivas para a presença dos protozoários, tendo sido obtidas AVL em todos os ambientes estudados. Na Tabela 1 encontram-se os resultados em cada local de coleta.

Tabela 1 - Distribuição de amebas de vida livre (AVL) em amostras coletadas de acordo com os ambientes estudados.

LOCAIS	PRESEÇA DE AVL n(%)	AUSENCIA DE AVL n(%)	TOTAL n(%)
Biofilme dos bebedouros	5 (31%)	11(69%)	16 (100%)
Água do Chafariz	1 (50%)	1(50%)	2 (100%)
Água da torneira em frente ao prédio 1	1 (50%)	1(50%)	2 (100%)
Água da torneira ao lado do prédio 1	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)
Águas das torneiras dos laboratórios	2 (22%)	7 (78%)	9 (100%)
Águas das torneiras dos banheiros	1 (17%)	5 (83%)	6 (100%)
Biofilme de pias e torneiras dos banheiros	6 (24%)	19 (76%)	25 (100%)
Biofilme de pias e torneiras – Lab. de Anat. Animal	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)
Biofilme da torneira em frente ao prédio 1	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)
TOTAL	19 (29%)	47 (71%)	66 (100%)

Durante a fase inicial dos cultivos monoxênicos, em todas as amostras, observou-se a presença de vários microorganismos contaminantes como bactérias, fungos filamentosos e larvas de helmintos. A contaminação microbiana também foi observada por Pens (20), ao analisarem a presença de AVL em biofilmes de estojos de lentes de contato. Ainda, foi possível a constatação de que, após uma semana, as formas císticas tornaram-se mais abundantes nas amostras isoladas. No entanto, também pode ser constatada uma maior proliferação de contaminantes, principalmente fungos. Há vários estudos relatando as dificuldades de axenização de AVL, principalmente em amostras provenientes do meio ambiente (30).

Como pode ser observado na Tabela 1, foram encontradas AVL na maioria das amostras estudadas. Apenas as amostras de biofilme da torneira em frente ao prédio 1 não apresentaram crescimento deste protozoário. No entanto, o achado de maior número de amostras positivas (6/19) foi proveniente de biofilme das pias e torneiras dos banheiros da Universidade. Tal fato pode ser atribuído por tratar-se de um ambiente úmido, onde há grande fluxo de pessoas e às técnicas de descontaminação e limpeza do local. A positividade em biofilme para AVL é quase sempre 100% segundo trabalhos citados na literatura. A explicação para esse fato é que amebas de vida livre se aderem aos biofilmes para se alimentar das bactérias que os colonizam (18).

Nesse sentido, cabe salientar que as amostras provenientes do laboratório de anatomia animal, que apresentaram 100% de positividade nos biofilmes de pias e torneiras, servem de alerta para o procedimento de higienização utilizado, considerando o grande número de alunos que utilizam a água desses locais. Em estudos de Barbeau e Buhler (4), analisando amostras de biofilme de 35 equipos dentários e de 18 torneiras, apontaram o isolamento de AVL nos 53 ambientes coletados e também observaram uma concentração três vezes maior de AVL isoladas de biofilme de tais equipamentos quando comparados as amostras de torneiras. De acordo com Silva e Rosa (25), o encontro de amebas patogênicas no meio ambiente constitui somente um indicador da possibilidade de aquisição desse tipo de parasitose.

Distinto do nosso resultado, quanto ao percentual de ocorrência (29%), foram os estudos de Rohr e colaboradores (23), em hospitais na Alemanha, que obtiveram 52% de positividade para AVL em amostras de água coletadas de sistemas de água quente e 47% nas amostras coletadas das áreas úmidas de sanitários. Nas pesquisas de Silva e Rosa (25), os autores avaliaram a presença de AVL somente na poeira de diversos ambientes de dois hospitais da cidade paulista de Presidente Prudente e verificaram uma positividade de 45,5% com destaque para a presença de AVL na cozinha e berçário. Neste último justificado pelo maior número de pessoas circulando no ambiente. Próximo à nossa frequência foram os estudos de Teixeira et al. (29), avaliando a presença de AVL em ambientes acadêmicos fechados em dois campus da Universidade Católica de Santos onde obteve 39% de AVL nas amostras provenientes do campus Dom Idílio José Soares e 17 % nas provenientes do campus Vila Nova, por onde também circula um grande número de pessoas, aparentemente saudáveis.

Já Salazar et al. (24), haviam encontrado AVL em amostras de água mineral engarrafada na cidade de Rio de Janeiro-RJ, onde apenas uma das amostras não apresentou contaminação. As amebas encontradas pertenciam a vários gêneros dentre eles *Acanthamoeba*.

Esses resultados podem ser explicados de acordo com Alvarenga et al. (4), onde os membros do gênero *Acanthamoeba* são os mais comumente encontrados em água doce e solo. Cistos desidratados podem sobreviver por vários anos numa variedade de habitats, incluindo o solo, poeiras domésticas, esgoto, água fresca, água de torneira, lagos naturais e artificiais e piscinas cloradas ou não, onde as amebas podem se alimentar de bactérias contaminantes e proliferar, mesmo em água mineral engarrafada, lentes de contato entre outros.

Na pesquisa realizada por Alves (3), estudando a ocorrência de AVL em piscinas e no solo de jardins que as rodeava, foram encontradas 13 (39,33%) amostras positivas isoladas de piscinas, destas 83,3% pertencentes ao gênero *Naegleria*, 16,6% ao gênero *Acanthamoeba* e 16,6% para o gênero *Vannella*. Já no solo, foram encontradas AVL em 93,3% das amostras coletadas, sendo que das 7 amostras selecionadas para a identificação, 100% pertenciam ao gênero *Acanthamoeba*, o que demonstra que realmente em ambientes secos, este é o gênero que predomina. Giazzi (13) também determinou a prevalência de AVL em diversos locais no município de Araraquara-SP, obtendo positividade de 86,9% para o gênero *Acanthamoeba*.

Carlesso (6) isolou AVL em amostras de poeira e biofilme de diferentes ambientes de um hospital de Porto Alegre-RS sendo que 35% pertenciam ao gênero *Acanthamoeba*. O mesmo ocorreu na pesquisa realizada por Crozzeta (9), em poeira de ambiente hospitalar do Hospital de Clínicas da UFPR, em Curitiba-PR, onde foram encontradas amebas de vida livre em 100% das amostras analisadas e cistos de *Acanthamoeba* spp. nas 30 amostras coletadas em diferentes pontos do hospital, demonstrando ser este um resultado extremamente significativo e de grande relevância. Os trabalhos citados são unânimes em concordar que a presença de AVL nestes locais necessita de atenção especial, visto que estas amebas alimentam-se e servem de reservatório para bactérias patogênicas. Além disso, em muitos deles encontram-se pessoas debilitadas, imunocomprometidas, o que é um fator de risco para a sua contaminação.

Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes àqueles encontrados pela maioria dos estudos com AVL nos mais variados ambientes, sendo o gênero *Acanthamoeba* o mais isolado mundialmente, principalmente devido à resistência de seus cistos às variações ambientais. A presença de AVL em águas à temperatura ambiente pode ser uma condição favorável à sua sobrevivência, mas não prediz sua patogenicidade, como foi verificado por Wink, Caumo e Rott (32) que no seu estudo isolaram 13 amostras de *Acanthamoeba* e todas cresceram a 37°C fato este que facilitaria o contágio humano e de outras espécies de mamíferos.

É preocupante a ocorrência dessas amebas nos ambientes estudados, já que muitos profissionais e mesmo acadêmicos utilizam bebedouros, torneiras ou têm contato direto com as pias. Os consumidores de tais águas se estiverem imunocomprometidos, seja naturalmente, ou devido às

doenças, poderão ter complicações à saúde. A presença de *Acanthamoeba* em águas de abastecimento merece atenção especial com relação à sua qualidade. Mesmo que o contágio da *Acanthamoeba* seja por contato direto e não pela ingestão, é preciso alertar para o perigo da exposição (1,7). Estudos realizados por Pens e colaboradores (20), avaliando a presença ou ausência de AVL em estojos de lentes de contato de dois grupos distintos de usuários, estes sendo acadêmicos voluntários da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, caracterizados como aparentemente saudáveis, encontraram positividade em sete estojos. Para Rezaeian e colaboradores (22), o alto percentual de AVL em diferentes fontes ambientais representa um risco sanitário à saúde pública, especialmente aos usuários de lentes e imunodeprimidos.

A identificação das amostras foram realizadas por meio da observação de acantopódios e vacúolos contráteis em microscópio óptico. Na Tabela 2 apresentamos as características morfológicas – número de braços, forma do endocisto e textura do ectocisto, bem como o provável grupo, de acordo com critérios propostos por Pussard e Pons (21). Para esta descrição foram analisadas a forma e o número de braços em 10 cistos de cada amostra.

De acordo com relato de Khan (16), durante o estágio de trofozoíto, a *Acanthamoeba* alimenta-se ativamente de bactérias, algas, fungos, pequenas partículas orgânicas e células humanas e se reproduz por divisão binária. Sob duras condições (ou seja, falta de alimentos, a hiper-osmolaridade ou hipo-osmolaridade, extremos de temperatura e pH e altas densidades celulares), os trofozoítas se diferenciam em cistos de 5-20µm de diâmetro, sendo que o tamanho varia entre isolados pertencentes a diferentes genótipos.

A classificação proposta por Pussard e Pons (21), tem sido reconhecida por ser prática, no entanto, as considerações citomorfológicas utilizadas na classificação, demonstram uma certa dificuldade para caracterizar *Acanthamoeba* taxonomicamente (11, 26, 31). A identificação de espécies somente por avaliação da morfologia dificilmente é possível, devido à variabilidade de morfologia dos cistos e pelas condições de cultura (31). Considera-se, portanto, a necessidade de avaliação morfológica e molecular das amostras de *Acanthamoeba* para a determinação e identificação do gênero e espécie.

Pussard e Pons (21), classificaram o gênero *Acanthamoeba* em três grupos morfológicos com base na forma e tamanho do cisto. Os grupos abrangem desde cistos relativamente grandes, com ectocisto esférico e liso e endocisto estrelado até cistos menores (diâmetro inferior a 18mm). Algumas espécies têm endocistos poligonais a estrelados com ectocistos irregulares. Considerando que alguns cistos têm endocistos arredondados ou ligeiramente angulares com ectocistos mais finos e lisos ou ligeiramente enrugados.

Dessa maneira, aplicando-se os critérios morfológicos, propostos por Pussard e Pons (21), encontrados na Tabela 2, nos 14 isolados analisados, definiu-se que 11 amostras de *Acanthamoeba* pertencem ao Grupo II, apenas as amostras A2, B2 e C2 pertencem ao Grupo I por apresentarem a forma estrelar, ectocisto esférico e especialmente o tamanho maior que os demais. As amostras deste

grupo não são consideradas patogênicas, porém já foi detectado um caso de infecção granulomatosa cerebral por *Acanthamoeba astronyxis* (25). Cabe ressaltar que nenhum isolado foi enquadrado no grupo III, pois neste grupo incluem-se cistos de tamanho médio, endocisto de forma oval ou globosa, porém nunca estrelar (9). Também, notaram-se as diferenças quanto ao tamanho e formas dos cistos avaliados, concordando com as afirmações de Khan (16). Semelhantes às nossas observações foram as de Pens e colaboradores (20), aplicando os mesmos critérios propostos por Pussard e Pons (21), onde obteve predomínio das formas poligonal e estrelar e a maioria dos isolados enquadrados no Grupo II.

Tabela 2 – Caracterização morfológica dos cistos de *Acanthamoeba* spp isolados de ambientes úmidos de uma comunidade acadêmica do Rio Grande do Sul.

ISOLADO	MORFOLOGIA	DOS CISTOS		PROVÁVEL GRUPO (PUSARD E PONS, 1977)
	Nº BRAÇOS	FORMAS do ENDOCISTO	ECTOCISTO	
A1	4-5	Estrelar/ poligonal	Ondulado	II
A2	5-5	Estrelar, grande	Suave	I
B1	4-5	Poligonal	Ondulado	II
B2	5-5	Estrelar	Suave	I
C2	4-5	Estrelar, poligonal grandes	Suave	I
G1	5-5	Estrelar	Ondulado	II
R2	5-5	Estrelar	Ondulado	II
S1	5-5	Estrelar	Ondulado	II
S2	5-5	Estrelar	Ondulado	II
T1	4-5	Estrelar, poligonal	Ondulado	II
O2	5-5	Estrelar	Ondulado	II
O4	5-5	Estrelar	Ondulado	II
O9	5-5	Estrelar	Ondulado	II
O10	5-5	Estrelar	Ondulado	II

Nº de braços: Amplitude do nº de braços em 10 cistos contados

Assim, na maioria dos isolados ambientais, a identificação pode ser realizada, mas a identificação da espécie e grau de patogenicidade são considerados extremamente difíceis. Isso porque os métodos atualmente disponíveis não preenchem completamente os requisitos de especificidade, sensibilidade e confiabilidade, além dos critérios morfológicos serem insuficientes. Dessa forma, novas tecnologias dentro da biologia molecular têm sido utilizadas na tentativa de caracterização e identificação das *Acanthamoebas* e do grupo genético dos isolados. Tal fato deve-se às novas técnicas que são consideradas mais simples, específicas e confiáveis no diagnóstico e identificação (28).

Através dos isolados feitos em fontes de água e biofilmes, concluiu-se com o presente estudo, que o gênero *Acanthamoeba* spp. está amplamente distribuído no ambiente. Estudos posteriores e mais

específicos poderiam ser feitos a fim de identificar a espécie o que possibilitaria o conhecimento da sua capacidade patogênica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preocupação com as AVL leva em conta o aumento do número de pessoas imunocomprometidas, aumento do uso excessivo de esteróides, o crescente número de indivíduos submetidos à terapia imunossupressora e o aquecimento global. Todos estes fatores podem aumentar a onipresença desses patógenos e, portanto, viabilizar uma possibilidade de aumento da exposição dos hospedeiros suscetíveis a estes microorganismos (16).

Dessa forma, a presença de cistos e trofozoítas de *Acanthamoeba* spp, em nosso estudo, confirmam mais uma vez que as AVL estão presentes em variados locais de fácil acesso ao público e reitera a necessidade se ampliar os estudos epidemiológicos destes agentes reconhecidos por apresentarem características patogênicas importantes ao homem.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), à Universidade de Caxias do Sul (UCS) e ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), Brasil.

ABSTRACT

Isolation and citomorphologic study of free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba* in different wet environments at Cruz Alta University, RS, Brazil.

Acanthamoeba are free-living amoebae (FLA) widely distributed in the environment and responsible for cases of amoebic keratitis granulomatous amoebic encephalitis. The objective was to determine the occurrence of the genus *Acanthamoeba* in samples of biofilms and water on the University Cruz Alta's campus through the isolation and characterization of cysts cytomorphological. For this a total of 66 samples were collected and cultured in Page coated with an Ágar suspension of inactivated *Escherichia coli* where they researched the presence of cysts and trophozoites. The genus identification was performed by microscopy of the fresh and stained smears. Positive result was obtained for the presence of FLA in 28.78% of the samples, and the sinks and faucets were the most contaminated sites 19.69%. Through the analysis performed it was observed that all the trophozoites and cysts of the positive samples had characteristics suggestive of the genus *Acanthamoeba* cysts with predominance of the polygon and star shapes, with trophozoites acantopodes and slow moving. This finding of *Acanthamoeba* spp. once again confirms that the FLA are presented in locations easily accessible to the public allows us to reinforce the need to extend the epidemiological studies of these agents because they have recognized the important human pathogenic characteristics.

KEYWORDS: *Acanthamoeba*. Keratitis. Biofilm.

REFERÊNCIAS

1. Assef LS. Pesquisa de *Acanthamoeba* spp. em água mineral. Foz do Iguaçu [Monografia Pós Graduação em Análise Ambiental – Faculdade Anglo Americano], 2008.
2. Alvarenga L, Freitas D, Lima A. Ceratite por *Acanthamoeba*. *ArqBras Oftalm* 63 (2): 155-159, 2004.
3. Alves D. Isolamento e caracterização morfológica de amebas de vida livre em amostras de solo e água de piscina no Distrito Federal. Brasília [Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde – Universidade de Brasília], 2006.
4. Barbeau J, Buhler T. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res Microbiol* 152: 753-760, 2001.
5. Batista R, Gomes A, Oddó D, Viana L, Pinto R, Braga B, Rôças G, Geller M, Antonio V. Neuroinfecção por *Naegleria fowleri*: aspectos clínico-terapêuticos, epidemiológicos e ecológicos. *Rev Neur* 15 (4): 310-316, 2007.
6. Carlesso A. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS. Porto Alegre [Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul], 2006.
7. Carlesso A, Simonetti A, Artuso G, Rott M. 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* 40 (3): 316-320, 2007.
8. Cermeño JR, Hernández I, Yasin HE, Tinedo R, Sánchez R, Pérez G, Gravano R, Ruiz A. Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*. Epidemiological study in Anzoategui State, Venezuela. *Rev Soc Bras Med Trop* 39 (3): 264-268, 2006.
9. Crozetta M. Identificação morfológica e molecular de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* isoladas em poeira de ambiente hospitalar. Curitiba [Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná], 2007.
10. De Carli GA. *Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas*. Atheneu. São Paulo, 2001.
11. De Jonckheere JF. Isoenzyme and total protein analysis by Ágarose isoelectric focusing and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. *J. Protozool* 30: 701-706, 1983.
12. Chung DI, Kong HH, Yu HS, Oh YM, Yee ST, Lim YJ. Biochemical and molecular characterization of a strain KA/S2 of *Acanthamoeba castellanii* isolated from Korean soil. *Korean J Parasitol* 34: 79-85, 1996.
13. Giazzi JF. Contribuição para o estudo do isolamento, cultivo e manutenção das amebas de vida livre. Araraquara [Tese de livre-docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP], 1996.

14. Hsu BM, Huang CC, Chen JS, Chen NH, Huang JT. Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by *Legionella* spp. in substrate associated biofilms and floating biofilms from spring environments. *Water res* 45 (16): 5171-5183, 2011.
15. Kingston D, Warhurst DC. Isolation of amoebae from the air. *J Med Microbiol* 2: 27-36, 1969.
16. Khan NA. *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. *J Med Microbiol* 57: 1051-1057, 2008.
17. Kong HH, Park JH, Chung DI. Interstrain polymorphisms of isoenzyme profiles and mitochondrial DNA fingerprints among seven strains assigned to *Acanthamoeba polyphaga*. *Korean J Parasitol* 33: 331-340, 1995.
18. Lau, HI, Ashbolt, NJ. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *J App Microbiol* 107:368-378, 2009.
19. Page FC. An illustrated key to fresh water and soil amoebae. Cambridge: *Freshwater Biological Association* 34, 1976.
20. Pens CJ, Costa M, Fandanelli C, Caumo K, Rott MB. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. *Parasitol Res* 103:1241–1245, 2008.
21. Pussard M, Pons R. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* 13: 557-610, 1977.
22. Rezaeian M, Niyiyati M, Farnia F, Haghi AM. Isolation of *Acanthamoeba* Spp. from Different Environmental Sources. *Iranian J Parasitol* 3(1): 44-47, 2008.
23. Rohr U, Weber S, Michel R, Selenka F, Wilhelm M. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *App Env Microbiol* 64: 1822-1824, 1998.
24. Salazar H, Moura H, Ramos R. Isolamento de amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. *Rev Saúde Públ* 16: 261-267, 1982.
25. Silva MA, Rosa JA. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênica em poeira de hospitais. *Rev Saúde Públ* 37: 242-246, 2003.
26. Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot* 45 (1): 45-54, 1998.
27. Stockman LJ, Wright CJ, Visvesvara GS, Fields BS, Beach MJ. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA-1990-1992. *Parasitol Res* 108 (3): 621-627, 2011.
28. Szenasi Z, Endo T, Yagita K, Nagy E. Isolation, identification and increasing importance of 'free-living' amoebae causing human disease. *J Med Microbiol* 47: 5-16, 1998.

29. Teixeira LH, Rocha S, Pinto RMF, Caseiro MM, Costa SOP. Prevalence of potentially pathogenic free-living amoebae from *Acanthamoeba* and *Naegleria* genera in non-hospital, Public, internal environments from city of Santos, Brazil. *Braz J Inf Dis* 13 (6): 395-397, 2009.
30. Tsvetkova N, Schild M, Panaiotv S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, Aspöck H, Lucas MS, Müller N. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res* 92:405–413, 2004
31. Visvesvara GS. Classification of *Acanthamoeba*. *Rev Inf Dis* 13(5): 369-372, 1991.
32. Winck MAT, Caumo K, Rott MB. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in Rio Grande do Sul, Brazil. *Cur Microbiol in press*, 2011.

CAPÍTULO 4

***Acanthamoeba spp.* potencialmente patogênicas isoladas de ambientes internos hospitalares e acadêmicos de duas regiões do Rio Grande do Sul, Brasil.**

(Artigo em preparação a ser submetido à Revista Internacional de Contaminación Ambiental)

***Acanthamoeba* spp. potencialmente patogênicas isoladas de ambientes internos hospitalares e acadêmicos de duas regiões do Rio Grande do Sul, Brasil.**

JANICE PAVAN ZANELLA^{1,2}, JUCIMAR ZACARIA¹, BIBIANA BARUSUOL¹, CAMILA ALVES¹, RONIZE ROHR DOS SANTOS¹, MANUELA PELETTI-FIGUERÓ¹, ANA PAULA LONGARAY DELAMARE¹, SERGIO OLAVO PINTO DA COSTA³, SERGIO ECHEVERRIGARAY¹.

¹Universidade de Caxias do Sul - Instituto de Biotecnologia, Rua Francisco Getúlio Vargas 1130. Bairro Petropolis. CEP 95.070.560 Caxias do Sul, RS, Brazil. *Autor responsável: janice.zanella@yahoo.com.br

² Universidade de Cruz Alta - Campus Universitário Dr. Ulysses Guimarães-Rodovia Estadual Jacob Delamea CEP 98.020.290 Cruz Alta, RS.

³Universidade Católica de Santos - Av. Conselheiro Nébias, 595. Bairro Boqueirão. CEP 11.045.003-Santos, SP.

Palavras-chaves: *Acanthamoeba*, ambientes internos, temperatura, pH.

RESUMO

Acanthamoeba são organismos que fazem parte de um grupo denominado amebas de vida livre (AVL). São protozoários aeróbicos encontrados com ampla dispersão ambiental. Resistem a extremas condições de temperatura e pH, ao cloro, e a outros produtos de desinfecção. Estas características conferem à *Acanthamoeba* um elevado potencial patogênico. Tem-se observado, através da literatura, um aumento no número de casos de infecções causados por este organismo: encefalite granulomatosa fatal, ulcerações da pele, pneumonites e ceratites. Assim, o presente estudo teve como objetivo isolar, caracterizar morfológicamente e avaliar o potencial patogênico de *Acanthamoeba* em distintos ambientes internos hospitalares e acadêmicos de duas regiões do Rio Grande do Sul, Brasil. A frequência detectada de *Acanthamoeba* foi de 13,77%, destes, 21,5% pertenciam ao ambiente hospitalar. O grupo II teve uma maior prevalência com 77,4% dos isolados, onde estão incluídas as mais patogênicas. Todos os isolados apresentaram capacidade de crescer em pH 4, 7 e 12. Além disso, constatou-se crescimento às temperaturas 4°C, 33°C e 37°C de todas as *Acanthamoebas*, com destaque para as amostras C52 e HG20 que foram resistentes a 45°C. Na análise da atividade dos desinfetantes, os dados obtidos mostraram que nenhum dos produtos avaliados (desinfetante Ramalet®, Fácil31® e Hipoclorito Ramalet®) apresentou elevada eficiência no controle de cistos de *Acanthamoeba*, mas todos foram capazes de reduzir parcialmente a viabilidade. O menos eficiente foi o hipoclorito, capaz de matar mais de 20% dos cistos após 60 minutos em apenas um dos isolados (C52). Torna-se essencial a implementação de medidas de higiene e desinfecção ambientais mais eficientes tendo em vista os riscos para a saúde pública.

Keywords: *Acanthamoeba*, internal environment, temperature, pH.

ABSTRACT

The *Acanthamoeba* are organisms part of a group called free-living amoebae (AVL). Aerobic protozoa are found with wide dispersion environment. They can resist that an extreme conditions of temperature and pH, chlorine and other disinfectants. Due to these characteristics, *Acanthamoeba* have a high pathogenic potential. In this way, have been described an increase in the number of cases of infections caused by this organism. The diseases are fatal granulomatous encephalitis, skin ulcers, pneumonitis and keratitis. Thus, the present study was to isolate, characterize morphologically and evaluate the pathogenic potential of *Acanthamoeba* in environments internal academics and hospitals in two regions of the state. Thus, the frequency of *Acanthamoeba* was 13.77%, whereas 21.5% belonged to the hospital. Group II had a higher prevalence with 77.4% of the isolates, which include the most pathogenic. All isolates had the ability to grow at pH 4, 7 and 12. In addition, all *Acanthamoeba* was growth temperatures 4°C, 33°C and 37°C. Highlighting the samples C52 and HG20 that were resistant to 45°C. Hypochlorite no showed action disinfectant in cysts of *Acanthamoeba*, an important finding, since sanitization of hospital environments and academics generally use this chemical. It is essential to the implementation of hygiene and disinfection more effective in view of the risks to public health.

INTRODUÇÃO

As *Acanthamoebas* pertencem às amebas de vida livre (AVL) que constituem um grupo de protozoários aeróbicos de ampla dispersão ambiental, isoladas em todos os continentes, nos mais diversos habitats. Estão presentes no ar, lagos e lagoas, solo, poeira doméstica e de logradouros públicos e hospitalares, em rios, esgotos, águas de torneiras, mares, oceanos e unidades de tratamento odontológico, unidades de hemodiálise, estojos e lentes de contato (De Jonckheere 1985; Szenasi et al. 1998; Barbeau & Buhler 2001; Schuster & Visvesvara 2004; Crozetta 2007; Lorenzo-Morales et al. 2007; Dendana et al. 2008; Pens et al. 2008; Gianinazzi et al. 2009).

As principais doenças relatadas em descrições clínicas caracterizadas por *Acanthamoebas* são: encefalite granulomatosa fatal, ulcerações da pele, ceratites em usuários de lentes de contato e pneumonite (Martinez & Visvesvara 1997; Marciano-Cabral & Cabral 2003).

O número de casos de infecções humanas vem crescendo mundialmente devido ao aumento de indivíduos imunocomprometidos, a população de usuários de lentes de contato e a resistência desses organismos aos produtos de desinfecção. Além disso, a demora no diagnóstico e os medicamentos são fatores que tem contribuído para o agravamento das doenças por *Acanthamoebas* (Szenasi et al. 1998; Alves 2001; Marciano-Cabral & Cabral 2003; Khan 2006).

O gênero *Acanthamoeba* é facilmente diferenciado de outras amebas pela forma

característica de seus cistos pelo qual Pussard & Pons (1977) classificaram em três grupos de acordo com os diferentes tamanhos e morfologia. Além de ser o gênero mais isolado de AVL, (estima-se que seja o mais comum no meio ambiente), possuem como principais características, a resistência a extremas condições de temperatura e pH, ao cloro e a outros produtos de desinfecção, fatores que determinam seu potencial patogênico (Khan 2006; Crozetta 2007; Coulon 2010).

No Brasil, apesar de já terem sido descritos casos de doença humana, poucos são os relatos da presença de amebas de vida livre no ambiente (Silva & Rosa 2003). Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar morfologicamente e avaliar potencial patogênico de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* em distintos ambientes hospitalares e acadêmicos de duas regiões do Rio Grande do Sul, Brasil .

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Os isolados estudados foram obtidos de três locais distintos: Hospital Divina Providência (HDP) de Frederico Westphalen; Hospital Geral (HG) de Caxias do Sul e Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - *campus* de Frederico Westphalen (URI-FW), no Rio Grande do Sul (RS), totalizando 363 amostras (**Tabela I**). Além destas, foram analisadas 20 amostras de AVL cedidas pelo Laboratório Experimental da UniSantos, coletadas na Universidade Católica de Santos (UniSantos) - *campus* Dom Idílio José Soares (CDI) *campus* Vila Nova (CVN), na cidade de Santos-SP de maio a setembro de 2007. Os referidos locais foram categorizados como ambientes internos.

TABELA I. NÚMERO TOTAL DE COLETAS REALIZADAS DE ACORDO COMO LOCAL DE PROCEDÊNCIA.

Local de procedência	Período de Coletas	Número de coletas
HDP-FW	Abril e Maio / 2008	77
HG-CAXIAS	Julho/2008	86
URI-FW	Janeiro a Abril /2009	200
Total		363

Todas as amostras de poeira e biofilmes foram coletadas aleatoriamente, por meio de *swabs* em pisos e mobiliários numa área de aproximadamente 25cm². Os *swabs* foram colocados em tubos contendo 2mL de água destilada esterilizada. Posteriormente, foram homogeneizados em vortex, centrifugados a 5000 *xg* por 5 minutos, e ressuspensos em 200µL de água destilada e cultivadas em meio monoxênico e, posteriormente, em meio axênico para realização das análises.

Isolamento de Amebas de Vida Livre do gênero *Acanthamoeba* - Cultivo Monoxênico

Para o isolamento inicial 100µL da suspensão foram plaqueados, numa área central, em meio

Ágar Page (2.5mM NaCl, 1mM KH₂PO₄, 0.5mM Na₂HPO₄, 40mM CaCl₂.6H₂O, 20mM MgSO₄.7H₂O e 1,5% Ágar; pH 6,9), recoberto com uma suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 11775) inativada pelo calor. As placas foram seladas e incubadas a 30°C por até 15 dias. A *E. coli* utilizada na cultura foi previamente cultivada em meio LB (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 1% Ágar, pH 7,0), por 18 horas a 35°C. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

As placas foram observadas em microscópio óptico invertido Meiji®, em dias alternados para a pesquisa de cistos e trofozoítos. Placas com ausência de crescimento foram descartadas após 15 dias (Khan et al. 2001; Khan & Paget 2002).

Os locais da cultura identificados com crescimento amebiano foram recortados e inoculados com a face voltada para baixo no centro de uma nova placa de ágar Page (1,5%) contendo Anfotericina B e *E. coli* inativada. As placas foram seladas e incubadas a 35°C por até sete dias, quando se obteve um crescimento suficiente para a realização das provas de identificação.

Sub-cultivo axênico

A axenização foi utilizada para a obtenção de amebas puras para a análise molecular. Dessa forma, os isolados de AVL foram axenizados por meio de cultivo PYG (0,75% de Peptona, 0,075% de Extrato de levedura e 1,5% de Glicose) segundo Raubothan (1983).

Após a verificação do crescimento em microscópio invertido, as culturas foram colocadas sobre placas de gelo-gel por 15 minutos, afim de favorecer o desprendimento dos trofozoítos. Em seguida, foi adicionado 1mL de PYG e a superfície do Ágar raspada suavemente.

A fase líquida contendo os trofozoítos foi recolhida e colocada em tubos esterilizados contendo 5mL de meio PYG com Ampicilina/Estreptomicina (100mg/L e 400mg/L) e incubados a 30°C. Repiques para novos tubos de PYG foram realizados durante 2 a 3 semanas, com intervalos de 5 dias, com finalidade de eliminar a associação com bactérias.

Identificação Morfológica de AVL

A identificação das amebas foi realizada por critérios morfológicos, com base na movimentação e aspecto dos trofozoítos (Schuster & Visvesvara 2004) e morfologia dos cistos em esfregaços corados de acordo com os critérios de Pussard & Pons (1977).

Para o ensaio da exflagelação, após o crescimento dos trofozoítos na superfície do Ágar Page, adicionaram-se 10mL de água destilada estéril com raspagem delicada. A fase líquida foi aspirada e colocada em novas placas, sendo então, incubadas a 35°C. Estas placas foram examinadas ao microscópio invertido com a finalidade de encontrar formas flageladas ativamente móveis, a cada 30 minutos durante 4 horas. Para confirmação das amostras negativas, as mesmas tiveram avaliações por 24 horas (De Carli 2001; Silva & Rosa 2003).

O reconhecimento do tipo de movimentação (rápido ou lento) foi realizado observando-se os

trofozoítos por 5 minutos sob microscópio óptico invertido (40x). Determinou-se também o tempo do ciclo de contração do vacúolo pulsátil, observando-se dez trofozoítos em cada amostra e anotando-se o tempo de fechamento/abertura/fechamento do vacúolo pulsátil, em duplicata.

Todas as amostras foram submetidas aos testes de coloração citológica de Panótico Rápido, Papanicolaou e Gram, ambas segundo Konemann et al. (2008) e observados em microscópio óptico. Os cistos e trofozoítos também foram observados por exame direto a fresco e corados com lugol.

Nos esfregaços corados pelo método proposto por Papanicolaou foram digitalizados dez cistos de cada amostra para determinação do tamanho e contagem do número de braços do endocisto. Para tanto foi utilizado microscópio Nikon E2000 com câmara digital acoplada e as ferramentas do Accus-Scope Micrometrics SE Premium.

Avaliação de fatores indiretos de patogenicidade

As amostras inoculadas em meio Ágar Page com *E.coli* inativada foram submetidas a diferentes temperaturas de crescimento: 4°C, 33°C, 37°C e 45°C. Os testes foram realizados em duplicata e avaliados quanto à presença ou ausência de cistos/trofozoítos na área da frente, cerca de 30mm da área demarcada, no 8^a, 12^o e 30^o dia.

Testes de tolerância ao pH foram executados em duplicata, inoculando-se as amostras em meio Ágar Page com *E. coli* inativada ajustado a pH 4,0; 7,0 e 12,0. As placas foram incubadas a 30°C durante uma semana e avaliadas quanto ao crescimento amebiano pela observação microscópica de cistos/trofozoítos na área da frente da inoculação.

Para os ensaios de viabilidade dos cistos aos diferentes desinfetantes, os isolados de *Acanthamoebas* foram cultivados em meio de Ágar Page com *E.coli* inativada, incubados a 33°C durante 15 dias. As amebas foram recuperadas da placa por lavagem com 2mL de salina de Page (2.5 mM NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 0.5 mM Na₂HPO₄, 40 mM CaCl₂ e 20mM MgSO₄), centrifugadas a 2500 xg durante 5 minutos, lavados três vezes e transferidas para tubos tipo *Eppendorff* contendo 1mL do meio salino de Page. Devido a presença de trofozoítos na recuperação, foi necessária a indução de encistamento através do meio salino de Page, contendo Sulfato de Magnésio, para a obtenção de maior concentração de cistos na amostra (Connel 2001).

Foram testados três desinfetantes utilizados em estabelecimentos de saúde: Fácil 31® (Álcool Etilico, Lauril Éter Sulfato de Sódio e 2-Butoxi Etil), Desinfetante Ramalet® (cloreto de alquil dimetil amônio 1,2% em solução aquosa) e Água Sanitária Ramalet® (12% de Hipoclorito de Sódio). Assim, 200µL da suspensão em salina de Page foram adicionados a 1mL de cada um dos produtos na diluição de 10². As amostras foram incubadas por 60 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 2500 xg durante 5 minutos e lavado três vezes com salina de Page. Em seguida, foram adicionados 200µL de eosina (0,125% v/v) com posterior homogeneização. Uma alíquota de 10µL foi utilizada para a contagem dos cistos em microscópio óptico. A avaliação da viabilidade foi realizada pelo método da eosina por contagem de cerca de 100 formas ao microscópio (Dias et al.

2007).

Após estas avaliações foram verificadas a viabilidade dos cistos em placa contendo meio de Ágar Page, com *E. coli* inativada e incubada a 33°C por 5 dias.

RESULTADOS

Isolamento de AVL em ambiente interno (hospitalar e acadêmico)

Das 363 amostras de poeira e biofilmes coletadas dos diferentes ambientes internos hospitalares e acadêmicos (HDP, HG e URI-FW), durante o período compreendido entre 2008 e 2009 foi constatada positividade para *Acanthamoeba* em 50 amostras (13,77%). Estas amostras apresentaram trofozoítos com acantopódios, vacúolos pulsáteis evidentes e cistos de parede dupla (**Fig. 1**). A ausência de amebas do gênero *Naegleria* foi confirmada por teste de exflagelação (Visvesvara, 1999) e a presença de amebas do gênero *Balamuthia* foi descartada com base na resistência a Anfotericina B e elevada velocidade de crescimento (2 a 5 dias) das AVL das amostras. Conforme pode ser constatado na **Tabela II**, foi evidenciada uma prevalência maior de *Acanthamoeba* em amostras de origem hospitalar (21,5%), do que em amostras de ambiente acadêmico (7,5%).

TABELA II. DISTRIBUIÇÃO DE ACANTHAMOEBAS EM RELAÇÃO AO LOCAL E AO NÚMERO DE COLETA.

Local	Número de coletas	<i>Acanthamoeba</i>	%
HDP-FW	77	21	27,0
HG-CAXIAS	86	14	16,2
URI-FW	200	15	7,5
Total	363	50	13,77

Identificação Morfológica dos isolados de *Acanthamoeba*

A identificação citomorfológica foi realizada em 31 isolados de *Acanthamoebas*, sendo 20 do Rio Grande do Sul e 11 de São Paulo, cedidas pela UniSantos. Colorações de Panótico rápido, Papanicolaou e Gram foram utilizadas para a análise das características morfológicas (Karayianis et al., 1988; Barros et al., 2001, 2007; Konemann et al., 2008).

Esta caracterização envolveu a análise do diâmetro dos cistos, assim como a forma e número de braços dos endocistos (**Fig. 1 e Fig. 2**), conforme critérios propostos por Pussard & Ponds (1977) para a classificação de *Acanthamoeba*.

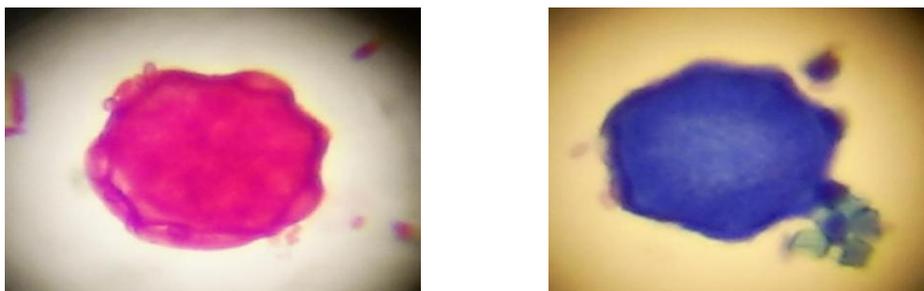


Fig. 1. A) Cisto de *Acanthamoeba spp.* (Coloração de Gram). Apresenta forma estrelada (1000X). B) Cisto de *Acanthamoeba spp.* (Coloração de Panótipo rápido). Forma poligonal (1000X).

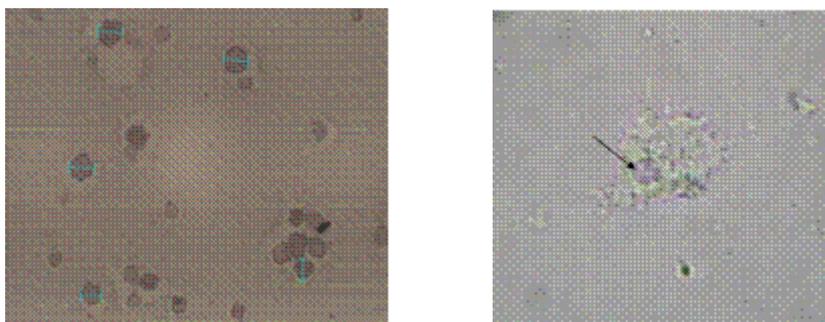


Fig. 2. A) Medida dos cistos de *Acanthamoeba spp.* (Coloração de Papanicolaou). B) Trofozoíto com observação de vacúolo contrátil e acantopódios (à fresco com salina de PAGE). Imagens visualizadas em 400X.

De acordo com Pussard & Pons (1977), **Tabela III**, os isolados do grupo I apresentaram forma estrelar do endocisto e diâmetro médio de 20,32 μ m, contra uma média de 13,36 μ m e 12,98 μ m, dos representantes dos grupos II e III, respectivamente. No grupo III o formato do endocisto variou entre redondo, oval e quadrangular. Os diâmetros dos cistos de isolados classificados como do grupo II foram semelhantes aos obtidos por Schuster & Visvesvara (2004), 10 μ m e 15 μ m, e conforme Pens et al. (2008) apresentaram predomínio das formas poligonal e estrelar.

Considerando as 31 amostras analisadas (**Tabela III**) o grupo II foi o mais prevalente (77,4%), seguido dos grupos III com 12,9% e o grupo I com 9,7%. Quando separadas pela sua origem (hospitalar e acadêmico), observaram-se diferenças importantes. No caso de ambientes hospitalares, 100% dos isolados foram classificados dentro do grupo II, enquanto em ambientes acadêmicos o grupo II representou 69,6% dos isolados, e os grupos III e I contribuíram com 17,4% e 13,0%, respectivamente.

TABELA III. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA SEGUNDO PUSSARD & PONS (1977) DOS CISTOS DE *ACANTHAMOEBA* SPP

Isolados	Ambiente e Origem	Média do Diâmetro	Número de braços	Formas predominantes do endocisto	Grupo
30CDI	Acadêmico SP	13,22	4-6	poligonal	II
35CDI	Acadêmico SP	13,22	4-6	quadrangular/poligonal	II
40CDI	Acadêmico SP	16,65	5-7	poligonal	II
78CDI	Acadêmico SP	14,73	5-7	poligonal/estrelar	II
92CDI	Acadêmico SP	17,01	4-6	redondo	III
99CDI	Acadêmico SP	20,85	5-7	estrelar	I
4CVN	Acadêmico SP	14,16	5-7	estrelar	II
38CVN	Acadêmico SP	15,32	5-6	estrelar	II
47CVN	Acadêmico SP	21,49	3-6	estrelar	I
58CVN	Acadêmico SP	15,31	5-7	poligonal/estrelar	II
95CVN	Acadêmico SP	16,95	4-6	redondo	III
HP8	Hospitalar RS	11,77	4-5	poligonal/estrelar	II
HP16	Hospitalar RS	11,77	4-5	poligonal/estrelar	II
HG20	Hospitalar RS	11,75	4-6	poligonal/estrelar	II
HG26	Hospitalar RS	11,90	3-5	triangular /estrelar	II
HG29	Hospitalar RS	11,90	4-5	quadrangular/estrelar	II
HG44	Hospitalar RS	13,31	4-5	quadrangular/estrelar	II
HG60	Hospitalar RS	13,16	4-5	quadrangular/estrelar	II
HG80	Hospitalar RS	11,21	3-5	triangular /estrelar	II
C9	Acadêmico RS	14,55	5-7	poligonal/estrelar	II
C18	Acadêmico RS	12,25	5-7	poligonal/estrelar	II
C26	Acadêmico RS	12,14	4-6	quadrangular/poligonal	III
C27	Acadêmico RS	14,14	4-5	quadrangular/estrelar	II
C30	Acadêmico RS	14,76	5-7	poligonal/estrelar	II
C31	Acadêmico RS	12,94	4-7	quadrangular/poligonal	II
C52	Acadêmico RS	18,62	5-7	estrelar	I
C53	Acadêmico RS	14,47	4-6	quadrangular/poligonal	II
C58	Acadêmico RS	11,71	3-7	poligonal	II
C62	Acadêmico RS	12,98	3-5	redondo/oval	III
C69	Acadêmico RS	14,14	3-6	triangular /estrelar	II
L8	Acadêmico RS	13,53	4-6	quadrangular	II

X : média da medida do diâmetro (μm) de 10 cistos

Número de braços: Amplitude do número de braços nos 10 cistos contados

Fatores indiretos de patogenicidade

Nos ensaios de temperatura e pH foram avaliados 16 isolados de *Acanthamoeba*, os demais foram excluídos devido à contaminação. Assim, observou-se que os isolados apresentaram um bom crescimento nas temperaturas de 4°C, 33°C e 37°C, no entanto cabe ressaltar que apenas os isolados C52 e HG20 se desenvolveram quando submetidos à temperatura de 45°C, com destaque para HG20 proveniente de ambiente hospitalar devido ao maior risco às pessoas imunocomprometidas.

TABELA IV. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DE *ACANTHAMOEBAS SPP.* EM DIFERENTES TEMPERATURAS E pHs.

ISOLADOS	TEMPERATURA				pH		
	4 °C	33°C	37°C	45°C	4.0	7.0	12.0
95CDI	+	+	+	-	+	+	+
38CVN	+	+	+	-	+	+	+
47CVN	+	+	+	-	+	+	+
58CVN	+	+	+	-	+	+	+
95CVN	+	+	+	-	+	+	+
C9	+	+	+	-	+	+	+
C52	+	+	+	+	+	+	+
C53	+	+	+	-	+	+	+
C58	+	+	+	-	+	+	+
C69	+	+	+	-	+	+	+
HG20	+	+	+	+	+ *	+ *	+
HG26	+	+	+	-	+ *	+	+
HG29	+	+	+	-	+ *	+	+
HG80	+	+	+	-	+	+	+
HP8	+	+	+	-	+	+	+
HP16	+	+	+	-	+	+	+

(+) presença de cistos/trofozoítos na área da frente

(+*) presença de mais de 100 cistos trofozoítos na área da frente

(-) ausência de cistos/ trofozoítos na área da frente

Nos isolados submetidos à temperatura de 37°C, detectou-se um crescimento mais rápido, sendo possível a identificação de trofozoítos na área da frente apenas 24 horas após inoculação.

Conforme pode ser visto na **Tabela IV**, todos os isolados apresentaram crescimento em meios com pH 4.0, 7.0 e 12.0. Sendo que em pH 4.0 e 7.0 os isolados HG20, HG26 e HG29 pertencentes ao grupo II apresentaram um número elevado de cistos/trofozoítos na área da frente, quando comparado aos demais, o que concorda com ensaios de Khan (2006) em que afirma que *Acanthamoeba* patogênicas podem crescer em pH variando de 4,0 a 12,0 e isto lhes confere potencial capacidade de colonizar vários ambientes.

Com base nos resultados, todos os isolados avaliados apresentam potencial patogênico, pois cresceram em temperatura corporal (37°C). Além disso, os isolados C52 e HG20 possuem a capacidade de crescer a 45°C e na faixa de pH de 4.0 e 7.0, o que indica elevada capacidade de colonizar um maior número de locais.

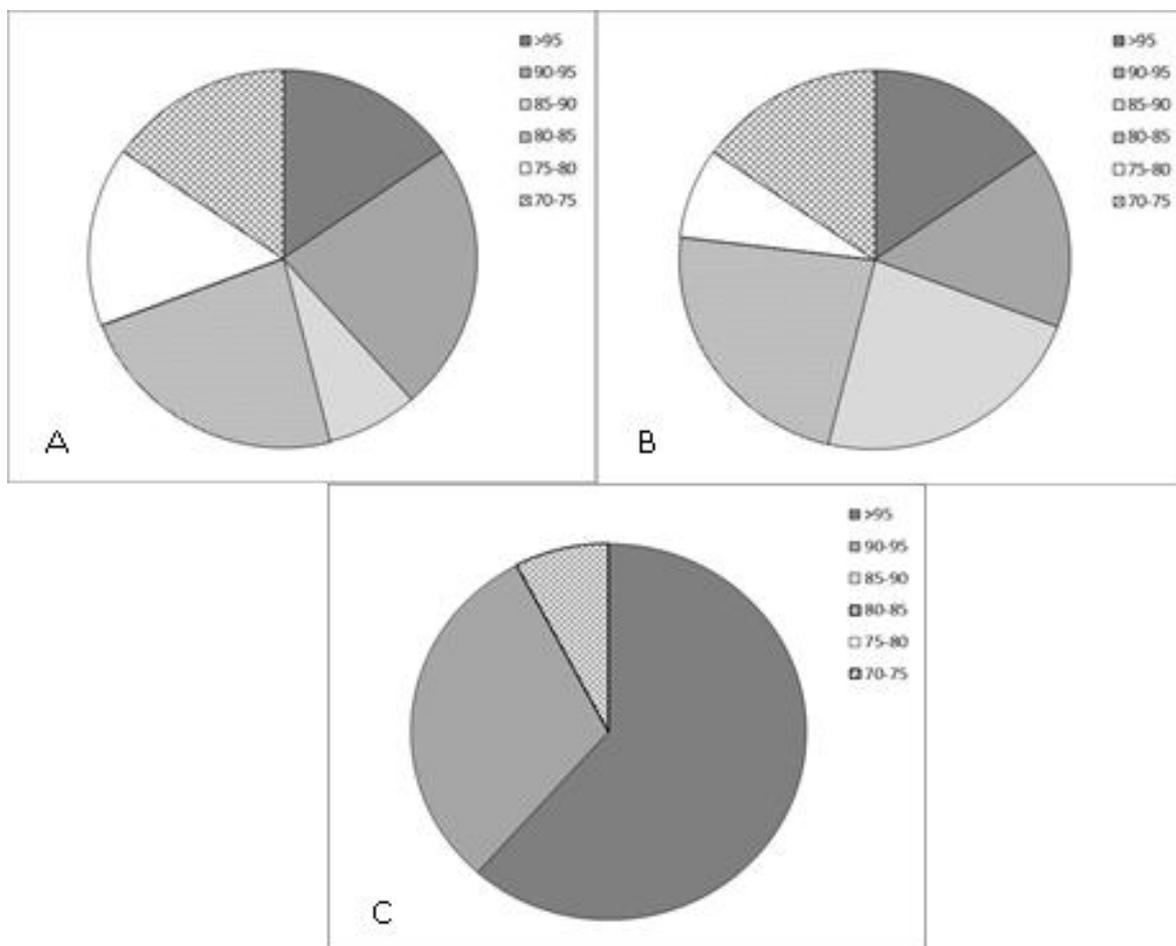


Fig. 3. Viabilidade de cistos após 60 minutos na presença de (A) desinfetante Ramalet[®], (B) Fácil 31[®], (C) água sanitária Ramalet[®].

Nos ensaios de viabilidade, treze isolados de *Acanthamoeba* foram avaliados quanto à resistência dos cistos a desinfetantes comumente utilizados na limpeza de ambientes hospitalares. Os dados obtidos mostraram que nenhum dos produtos avaliados (desinfetante Ramalet[®], Fácil31[®] e Hipoclorito Ramalet[®]) apresentou elevada eficiência no controle de cistos de *Acanthamoeba*, porém todos foram capazes de reduzir parcialmente a viabilidade de pelo menos um isolado (**Fig. 3**). Destes produtos, o menos eficiente foi o hipoclorito, capaz de matar mais de 20% dos cistos após 60 minutos em apenas um dos isolados (C52). Já o produto detergente Fácil 31[®] exibiu efeito de redução variado da viabilidade de cistos, sendo capaz de inviabilizar mais de 20% dos cistos dos isolados HP16, C52 e C58. O desinfetante a base de amônio quaternário Ramalet[®] foi o mais eficiente dos produtos

avaliados levando a uma redução da viabilidade superior a 20% nos isolados C52, C69, 38CVN e C9. De um modo geral os resultados mostram elevada variação entre isolados, com isolados sensíveis a diversos produtos como C52, e outros que são inibidos apenas por produtos específicos.

Conforme mostrado na **Fig. 4**, o efeito dos três produtos testados aumenta com o tempo de exposição.

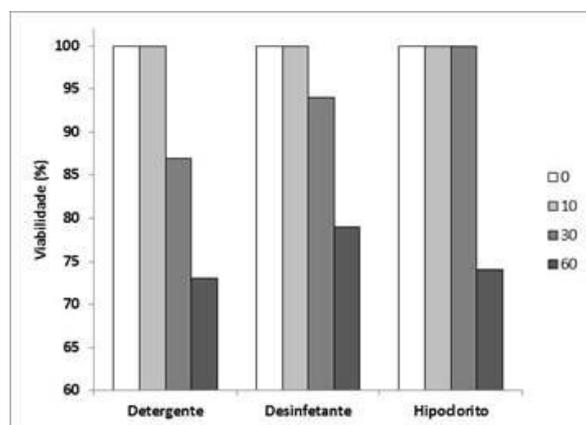


Fig. 4. Redução de viabilidade do isolado C52 em função do tempo de exposição.

DISCUSSÃO

Comparada com outros levantamentos realizados no Brasil, a prevalência de *Acanthamoeba* em ambiente hospitalar observada no presente trabalho (13,77%) foi maior do que a relatada por Carlesso et al. (2010), em amostras de poeira de um hospital de Porto Alegre-RS (11,85%) e menor do que a constatada por Silva e Rosa (2003) em hospitais de Presidente Prudente-SP (45,5%). Já a presença de *Acanthamoeba* em ambiente acadêmico foi consideravelmente menor (7,5%) do que a obtida por Teixeira et al. (2009) em amostras de poeira de ambientes acadêmicos fechados em dois campus da Universidade Católica de Santos (19% e 11%). Estas diferenças podem ser atribuídas a condições climáticas locais, e principalmente, a diferenças nos sistemas e produtos utilizados na limpeza dos ambientes (Teixeira et al. 2009).

A menor prevalência de *Acanthamoebas* foi constatada nas amostras oriundas da URI-FW (7,5%), coletadas no período de verão, e a maior frequência observada nas amostras do HDP-FW (27%), coletadas durante o outono. Apesar de serem amostras de locais distintos, cabe ressaltar que os dados diferem daqueles descritos por Tsvetkova (2004), em estudo realizado na Bulgária, que constatou a maior prevalência do gênero *Acanthamoeba* em ambientes mais quentes ou durante os meses de verão. Ainda cabe ressaltar, que o período de coleta na URI-FW coincidiu com as férias acadêmicas, quando existe um menor número de estudantes e funcionários no campus e atividades de limpeza mais intensas.

O interesse por *Acanthamoeba* vem crescendo no meio da comunidade científica e médica,

em parte devido ao fato de que o número de infecções por *Acanthamoeba* está aumentando, e de que estes organismos podem servir como um hospedeiro ou reservatório para patógenos microbianos, incluindo vírus, bactérias e fungos (Khan 2009). Por razões ainda desconhecidas, *Acanthamoeba*, mais do que outras amebas do solo, é capaz de albergar diversos microrganismos (Schuster 2002). Reforçam estes relatos os estudos realizados por Alizadeh et al. (2005) e Lorenzo-Morales et al. (2007), afirmando que *Acanthamoebas* servem como um transportador para diferentes patógenos como *Legionella*, *Pseudomonas* e *Helicobacter*. Para Newsome et al. (1998), *Acanthamoeba* é o potencial hospedeiro para *Legionella spp.*, agente causal da doença do legionário e recentemente isolada de cultivos de *Acanthamoeba* provenientes de amostras de solo.

Das 50 amostras positivas foi possível obter apenas 20 isolados através de repicagens sucessivas em meio Ágar Page com *E.coli*, como única fonte de nutrientes. Esta baixa eficiência de isolamento (40%) é comum em trabalhos envolvendo amostras ambientais (Gautom 1994; Khan et al. 2001; Tsvetkova et al. 2004; Khan 2009; Carlesso et al. 2010) e deve-se, principalmente, à elevada frequência de contaminantes bacterianos e fúngicos, especialmente nas primeiras fases do processo. As dificuldades de isolamento agravam-se pelo fato das formas císticas tornarem-se mais abundante concomitantemente com o aumento do crescimento fúngico. Dificuldades de isolamento após uma semana, devidas à contaminação microbiana são referidas em diversos trabalhos, mesmo em amostras não ambientais como em estojos de lentes de contato (Pens et al. 2008).

Para Schuster (2002), ao contrário das amostras clínicas, as ambientais contém muitos contaminantes, sendo difícil estimular o crescimento das AVL e inibir ao mesmo tempo o crescimento dos outros organismos presentes. Além disso, segundo Khan (2006) e Zeybek et al. (2010) a presença de bactérias contaminantes pode ser uma grande limitação em estudos bioquímicos e moleculares para a diferenciação das AVL devido à interferência por parte destes microrganismos. Além da contaminação, outros fatores dificultaram o isolamento, principalmente, a baixa capacidade de proliferação e de encistamento de algumas amostras, e redução do crescimento amebiano na presença de antibióticos e fungicidas incorporados ao meio na tentativa de obtenção de isolados nas amostras com elevada contaminação.

Identificação Morfológica dos isolados de *Acanthamoeba*

Pussard & Pons (1977) separaram as *Acanthamoebas* em três grupos, sendo: 1) Grupo I- espécies que apresentam diâmetro do cisto > 18µm e endocisto forma estrelar (*A. astronyxis*, *A. commandoni*, *A. echinulata*, *A. pearcei* e *A. tubiashi*); 2) Grupo II- espécies com diâmetro de 10-16µm e endocisto oval, triangular, quadrangular ou poligonal (*A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes*, *A. stevensoni* e *A. triangularis*); e 3) Grupo III- espécies com diâmetro de 11-18µm e com endocisto oval, porém nunca estrelado (*A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. jacobsi*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. postulosa* e *A. royreba*). A prevalência dos grupos, separadas pela sua origem (hospitalar e acadêmico), apresenta

diferenças importantes: em ambientes hospitalares, 100% dos isolados foram classificados dentro do grupo II, enquanto em ambientes acadêmicos o grupo II representou 69,6% dos isolados e, os grupos I e III contribuíram com 13% e 17,4%, respectivamente. Estes resultados diferem daqueles obtidos por Carlesso et al. (2010) que evidenciaram prevalência de isolados do grupo III (48,4%) e II (35,5%) em ambientes hospitalares de Porto Alegre-RS. Não foram constatadas diferenças importantes nas frequências dos distintos grupos entre amostras acadêmicas do Rio Grande do Sul e de São Paulo.

As *Acanthamoeba* são patógenos oportunistas que podem causar encefalite multifocal denominada Encefalite Granulomatosa Amebiana (EAG) em hospedeiros imunocomprometidos, assim como outras doenças, entre as quais ceratite e pneumonite (Bottone 1993; Anderlini et al. 1994; Marshall et al. 1997). Entre as espécies de *Acanthamoeba*, *A. castellani*, *A. culbertsoni* e *A. polyphaga* são as mais frequentemente associadas a patologias humanas, seja EAG ou ceratite (Visser 1993; Marciano-Cabral 2003; Puumala 2010), mas outras espécies como *A. hatchetti*, *A. rhysodes*, *A. griffini*, *A. quina* e *A. lugdunensis* também tem sido relatadas em alguns casos (Armstrong 2000; Marciano-Cabral & Cabral 2003; Alisson et al. 2005). Neste sentido, cabe ressaltar que a maior parte (95%) das amostras positivas do presente trabalho foi caracterizada como pertencentes aos grupos II e III, nos quais se encontram todas as espécies patogênicas. Apesar das diferenças em termos de potencial patogênico de isolados dentro destas espécies, este resultado aponta no sentido da importância e riscos para a saúde pública de amebas de vida livre presentes em ambientes acadêmicos e hospitalares.

A classificação de *Acanthamoeba* com base na morfologia característica ainda está em uso, apesar do desenvolvimento de novas abordagens microscópicas (imunofluorescência) e de base molecular. Zeybek et al. (2010) sugerem que técnicas morfológicas, bioquímicas e moleculares devem ser usadas para correta identificação de *Acanthamoeba*. Neste sentido, uma das etapas mais importantes é a obtenção de culturas axênicas que segundo o próprio autor é difícil e requer considerável habilidade e experiência por parte do investigador.

Fatores indiretos de patogenicidade

Além das dificuldades no isolamento inicial de amostras ambientais, destacamos também a dificuldade de caracterizar os fatores de patogenicidade das cepas. Por isso, testes mais rápidos, simples, específicos e confiáveis ainda são altamente desejáveis (Szenasi et al. 1998). Estudo realizado por Khan (2000) mostrou que cepas patogênicas e não patogênicas de *Acanthamoeba* podem ser diferenciados com base em atividade de protease extracelular através de um ensaio colorimétrico.

Diversos estudos realizados por Khan (2001, 2006, 2009) indicam que a patogenicidade de *Acanthamoeba* é multifatorial, envolvendo, além de sua capacidade de invasão, colonização e produção de enzimas no hospedeiro, a capacidade de sobreviver fora do hospedeiro por períodos de tempo eventualmente longos e sob diversas condições ambientais (temperaturas variáveis, osmolaridade elevada, privação de alimento, presença de compostos tóxicos, entre outros). A

capacidade de *Acanthamoeba* de superar tais condições pode ser considerada como fatores indiretos de virulência, pois aumenta a possibilidade de infecção. De acordo com Schuster (2002), a capacidade que alguns isolados ambientais apresentam de crescer em temperatura de 37°C já é indicativo de potencial patogênico, devido sua capacidade de sobreviver à temperatura corpórea dos mamíferos.

Em 2002, Schuster em ensaios com amostras clínicas para isolamento de AVL potencialmente patogênicas, também observou um crescimento rápido de 1 a 2 dias a 37°C, confirmando que a esta temperatura *Acanthamoebas* crescem rapidamente. Dessa forma, a tolerância à temperatura é amplamente aceita como pré-requisito para a patogenicidade em *Acanthamoeba* (Griffin 1972; Gianinazzi et al. 2009).

Todos os isolados apresentaram bom crescimento em meios com pH 4.0, 7.0 e 12.0. Sendo que em pH 4.0 e 7.0 os isolados HG20, HG26 e HG29 pertencentes ao grupo II apresentaram um número elevado de cistos/trofozoítos na área da frente, quando comparado aos demais, o que concorda com ensaios de Khan (2006) em que afirma que *Acanthamoebas* patogênicas podem crescer em pH variando de 4,0 a 12,0 e isto lhes confere potencial capacidade de colonizar vários ambientes.

Com base nos resultados, todos os isolados avaliados apresentam potencial patogênico, pois cresceram em temperatura corporal (37°C). Além disso, os isolados C52 e HG20 possuem a capacidade de crescer a 45°C e na faixa de pH de 4.0 e 7.0, o que indica elevada capacidade de colonizar um maior número de locais. O crescimento em alta temperatura e alta osmolaridade são características de *Acanthamoeba* patogênicas (De Jonckheere 1983; Walochnik et al. 2000; Khan et al. 2001, 2002).

Assim, a alta prevalência de cepas de *Acanthamoeba* com potencial patogênico em ambientes públicos com elevada circulação de pessoas, hospitais e centros universitários, representa risco à comunidade.

Apesar das preocupações de saúde aumentar com relação às AVL, ainda há uma escassez de informações sobre a sua resistência a vários biocidas e desinfetantes. Em geral, os desinfetantes químicos utilizados para o controle de microrganismos infecciosos e parasitários são divididos segundo o princípio ativo em: fenólicos, iodados, alcoóis, amônias quaternárias, clorados e aldeídos (Ferreira 2009; Neto 2009).

Considerando as baixas concentrações (0,12%) e tempos de exposição (<60 min) utilizados a ineficiência do hipoclorito corrobora os resultados obtidos por Coulon et al. (2010) que avaliando a resistência de cistos de *Acanthamoeba* aos tratamentos de desinfecção usados em serviços de saúde constataram que o hipoclorito de sódio foi eficiente em elevadas concentrações, exigindo tempos de exposição maior quando em concentrações menores e sendo ineficaz quando nas concentrações comumente utilizadas no tratamento de água potável. Dados semelhantes foram obtidos por Derremaux et al. (1974).

Assim como no presente trabalho, diferenças de sensibilidade ao hipoclorito foram constatadas por De Jonckheere & Van de Voorde (1976) e Coulon et al. (2010). Neste sentido, estes

últimos autores consideram que as diferenças observadas na resistência podem ser, parcialmente, devido à estrutura do ectocisto, uma vez que pode ser mais espessa na cepa mais resistente do que em cepas sensíveis (Turner 2000).

Em relação a desinfetantes contendo amônios quaternários, assim como constatado neste ensaio, diversos relatos mostram variação de resistência entre isolados de *Acanthamoeba* (Anderson & Jamieson 1972; De Jonckheere & Van de Voorde 1976; Thomas 2010), não havendo consenso a respeito da eficiência destes compostos no controle deste e outros protozoários.

Não existe um protocolo oficial padronizado disponível para testar as atividades de desinfetante contra AVL (Coulon et al. 2010). As cepas de amebas, o meio usado para crescimento e encistamento de trofozoítos, condições de exposição e neutralização, bem como métodos para avaliar a viabilidade residual após os tratamentos, variam de um estudo para outro e pode, portanto, ser responsável pelas discrepâncias observadas (Tamminga et al. 1978; Buck et al. 2000; Anger & Lally, 2008). Porém, os resultados de cada um dos trabalhos, respeitando-se a metodologia, o material, a época e a região devem ser considerados e não podem ser invalidados (Gelli, 1979).

Considerações

Levando-se em conta que na América do Sul, especialmente no Brasil, ainda há poucos estudos avaliando a presença de AVL em ambientes internos, nossos resultados se tornam relevantes. Isso porque a determinação da presença de *Acanthamoeba* indica o alto potencial patogênico desses ambientes, tanto do meio hospitalar, em que grande número de pacientes, familiares e profissionais frequentam, como também no ambiente acadêmico por onde circulam diariamente grande número de pessoas jovens aparentemente saudáveis. É essencial que as comissões de controle de infecção hospitalar intensifiquem esforços para implementar medidas de higiene e desinfecção mais eficientes. Além disso existe a necessidade de mais estudos sobre a *Acanthamoeba* e conscientização sobre os riscos para a saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alisson, Z.W; Lorenzo-Morales, J.; Calder, C.; Radlen, K.; Ortega-Rivas, A.; Lindo, J.F. (2005). *Acanthamoeba* infection as a cause of severe keratitis in a soft contact lens wearer in Jamaica. **Am J Trop Med Hyg.** 73(1): 92-94.
- Alizadeh, H.; Neelam, S.; Hurt, M.; Niederkorn, J.Y. (2005). Role of contact lens wear, bacterial flora, mannose-induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. **Infec & Immun.** 73:1061-1068.
- Alves, J. (2001). Caracterização e filogenia moleculares de *Acanthamoeba*. **Tese de Doutorado.** Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Parasitologia. São Paulo.
- Anderlini, P.; Przepiorcka, D.; Luna, M.; Langford, L.; Andreef, M.; Claxton, D.; Deiseroth, A.B.

- (1994). *Acanthamoeba* meningoencephalitis after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant.** 14: 459-461.
- Anderson, K. & Jamieson, J. (1972). Primary amebic meningo-encephalitis. **Lancet.** i:902-903.
- Anger, C. & Lally, J.M.. (2008). *Acanthamoeba*: a review of its potential to cause keratitis, current lens care solution disinfection standards and methodologies, and strategies to reduce patient risk. **Eye Contact Lens.** 34:247–253.
- Armstrong, M. (2000). The pathogenesis of human *Acanthameba* infection. **Infec Dis Rev.** 2:65-73.
- Barbeau, J. & Buhler, T. (2001). Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. **Research in Microbiology.** 152:753-760.
- Barros, J.N.; Mascaro, V.L.D.; Gomes, J.A.P.; Freitas, D.; Hofling-Lima, A.L. (2001). Citologia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e de coloração. **Arq Bras Oftalmol.** 64:127-31.
- Barros, J.N.; Mascaro, V.L.D.; Lowen, M.; Martins, M.C.; Foronda, F. (2007). Citologia de impressão no diagnóstico de infecção corneana por *Acanthamoeba*: relato de caso. **Arq Bras Oftalmol.** 70(2):343-346.
- Buck, S.L.; Rosenthal, R.A.; Schlech, B.A. (2000). Methods used to evaluate the effectiveness of contact lens care solutions and other compounds against *Acanthamoeba*: a review of the literature. **CLAO J.** 26:72–84.
- Connel, C.; Rutter, A.; Hill, B.; Suller, M. Lloyd, D. (2001). Encystation of *Acanthamoeba castellanii*: dye uptake for assessment by flow cytometry and confocal laser scanning microscopy. **Journal of Applied Microbiology.** 90(5):706-712.
- Coulon, C.; Collignon, A.; McDonnell, G., Thomas, V. (2010). Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. **J. Clin. Microbiol.** 48:2689-2697.
- Crozetta, M.A.S.; Costa, A.O.; Castro, E.A. (2007). Identificação morfológica e molecular de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* isoladas em poeira de ambiente hospitalar. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná.
- De Carli, G.A. (2001). **Parasitologia Clínica Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para Diagnóstico das Parasitoses Humanas.** São Paulo. Atheneu. 418–426.
- De Jonckheere, J.F. (1983). Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp, **Appl Environ Microbiol.** 39:681–685.
- De Jonckheere, J. & Van de Voorde, H. (1976). Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. **Appl. Environ. Microbiol.** 31:294-297.
- Dendana, F.; Sellami, H.; Jarraya, F.; Sellami, A.; Makni, F.; Cheikhrouhou, F.; Hachicha, J.; Ayadi, A. (2008). Free-living amoebae (FLA): detection, morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* genus in the hydraulic system of an haemodialysis unit in

- Tunisia. **Parasite**.15: 137-142.
- Derreumaux, A.L.; Jadin, J.B.; Willaert, E.; Moret, R. (1974). Action du chlore sur les amibes de l'eau. **Ann. Soc. Belge Med. Trop.** 54:415-428.
- Dias, M.L.G.G.; Pupulin, A.R.T.; Ramos, C.C.O.; Ueda, P.M.; Kohiyama, C.Y.; Nishi, L. (2007). Isolamento, viabilidade em baixas temperaturas e cultivo axênico de cistos de *Giardia duodenalis* em pacientes da região noroeste do Paraná. *Cienc Cuid Saude*. 6(2):454-459.
- Ferreira, C.A. (2009). Avaliação do efeito antibacteriano sobre desinfetantes utilizados para limpeza do bloco da saúde “S” da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) Criciúma – SC. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Curso de Farmácia, Universidade do Extremo Sul Catarinense.
- Gautom, R.K.; Lory, S.; Seyedirashti, S.; Bergeron, D.L.; Fritsche, T.R. (1994). Mitochondrial DNA fingerprinter of *Acanthamoeba* spp, isolated from clinical and environmental sources. **J Clin Microbiol**. 32:1070–1073.
- Gelli, D.S.; Tachibana, T.; Oliveira, I.R.; Zamboni, C.Q.; Pacheco, J.A.; Spiteri, N. (1979). Condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, SP, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo. **39**: 37-43.
- Gianinazzi, C.; Schild, M.; Wuthrich, F.; Muller, N.; Schurch, N.; Gottstein, B. (2009). Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. **Exp Parasitol**. 121:180–186.
- Griffin, J.L. (1972). Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. **Science**. 178:869–870.
- Karayianis, S.L.; Genack, L.J.; Lundergan, M.K.; Schumann, G.B. (1988). Cytologic diagnosis of acanthamoebic keratitis. **Acta Cytol**. 32(4):491-494.
- Khan, N.A.; Jarrol, E.L.; Panjwani, N.; Cao, Z.; Paget, T. (2000). Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. **Journal of Clinical Microbiology**. 38(8):2858-2861.
- Khan, N.A. (2001). Pathogenicity, morphology and differentiation of *Acanthamoeba*, **Curr Microbiol**. 43: 391–395.
- Khan, N.A.; Jarroll, E.L.; Paget, T.A. (2001). *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Curr Microbiol**. 43:204–208.
- Khan, N.A.; Jarroll, E.L.; Paget, T.A. (2002). Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. **Curr Microbiol**. 45:197–202.
- Khan, N.A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiol Rev**. 30:564–595.
- Khan, N.A. (2009). ***Acanthamoeba: Biology and Pathogenesis***. Caister Academic Press.
- Koneman, E.W.; Schreckenberger, P.C.; Winn, W.C.; Janda, W.M.; Stephen, A.D. (2008). **Diagnóstico Microbiológico**: Texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan.

- Lorenzo-Morales, J.; Lopez-Darias, M.; Martinez-Carretero, E.; Valladares, B. (2007). Isolation of potentially pathogenic strains of *Acanthamoeba* in wild squirrels from Canary Islands and Morocco. **Experimental Parasitol.** 117:74-79.
- Marciano-Cabral, F & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp, as Agents of Disease in Humans. **Clinical Microbiology Rev.** 16:273–307.
- Marshall, M.M.; Naumovitz, D.; Ortega, Y.; Sterling, C.R. (1997). Waterborne protozoan pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.** 10:67-85.
- Martinez, A.J. & Visvesvara, G.S. (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathol.** 7:583-598.
- Neto, A.F.A. (2009). Avaliação da viabilidade de oocistos esporulados de *Neospora caninum* a diferentes condições de temperatura e ação de desinfetantes. **Dissertação de Mestrado.** Universidade de São Paulo. Programa de Pós Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
- Newsome, A.L.; Scott, T.M.; Benson, R.F.; Fields, B.S. (1998). Isolation of an amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* species. **Appl. Environ. Microbiol.** 64:1688–1693.
- Papanicolaou, G.N. & Traut, H.F. (1941). The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. **Am J Obstet Gynecol.** 42:193-206.
- Pens, C.J.; Costa, M.; Fandanelli, C.; Caumo, K.; Rott, M.B. (2008). *Acanthamoeba* spp, and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. **Parasitol Res.** 103:1241–1245.
- Pumidonming, W.; Koehsler, M.; Walochnik, J. (2010). *Acanthamoeba* strains show reduced temperature tolerance after long-term axenic culture. **Parasitol Res.** 106:553–559.
- Pussard, M. & Pons, R. (1977). Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica.** 13: 557-610.
- Rowbotham, T.J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. **J. Clin. Pathol.** 33:1179-1183.
- Schuster, F.L. (2002). Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. **Clinical Microbiology Reviews.** 15(3):342-354.
- Schuster, F.L. & Visvesvara, G.S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **J Parasitol.** 34:1001–1027.
- Silva, M.A. & Rosa, J.A. (2003). Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira hospitalar. **Revista de Saúde Pública.** 37(2):241-246.
- Szenasi, Z.; Endo, T.; Yagita, K; Nagy, E. (1998). Isolation, identification and increasing importance of ‘freeliving’ amebae causing human disease. **J. Med. Microbiol.** 47: 5-16.
- Tamminga, S.K.; Beumer, R.R.; Kampelmacher, E.H. (1978). The hygienic quality of vegetables in or imported into the Netherlands: a tentative survey. **J. Hyg.** 80:143-54.
- Teixeira, L.H.; Rocha, S.; Pinto, R.M.F.; Caseiro, M.M.; Costa, S.O.P. (2009). Prevalence of

CAPÍTULO 5

Protease diversity among environmental isolates of *Acanthamoeba* spp.

(Artigo em fase de preparação)

PROTEASE DIVERSITY AMONG ENVIRONMENTAL ISOLATES OF *Acanthamoeba* spp.

Zanella, J.^{1,2}; Zacaria, J.¹; Costa, S.O.P.³; Echeverrigaray, S.¹

¹ Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, RS, Brazil

² Universidade de Cruz Alta, RS, Brazil

³ Catholic University of Santos, SP, Brazil.

ABSTRACT

Acanthamoeba secrete a proteolytic complex formed by several proteases which may play a key role in *Acanthamoeba* feeding, differentiation and pathogenicity. In this study, we evaluated the proteolytic activity and the zymographic patterns of several environmental isolates of *Acanthamoeba* on different substrates. Colorimetric assays, using azocasein as substrate, showed significant variation on the overall and specific protease activity in *Acanthamoeba*-conditioned media, independently of the pathogenic or nonpathogenic status of the species. The zymographic assays on gelatin co-polymerized gels showed three banding patterns for *A. castellanii* isolates, and specific profiles for the other species evaluated. All the proteases secreted by *A. castellanii*, *A. pearcei*, and *A. healyi* were characterized as serine proteases, but only cysteine and metalloproteases were identified in *A. astronyxis*. Some extracellular proteases exhibited important activity on gelatin, fibrinogen and γ -globulin, and may be implicated in *Acanthamoeba* pathogenicity.

Keywords: *Acanthamoeba*, extracellular proteases, zymogram profiles, substrate specificity.

* **Correspondence:** S. Echeverrigaray, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, R. Francisco G. Vargas 1130, Caxias do Sul, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil. selaguna@ucs.br

INTRODUCTION

Acanthamoeba are opportunistic microorganisms that are widely distributed in the environment, and within the last few years these protozoa have gained increasing clinical relevance as causative agents of multifocal encephalitis called Granulomatous Amebic Encephalitis (GAE), a chronic central nervous system disease of immune-compromised hosts, and various other system disease states including *Acanthamoeba* keratitis (AK) and pneumonitis (Alsam et al., 2003; Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Schuster and Visversvara, 2004). *Acanthamoeba* have been found as members of the normal flora and have been cultured from the upper airways of apparently healthy people, suggesting that infection may be common and self-limited in a competent host (Marciano-Cabral et al., 2000; Alsam et al., 2003; Schuster and Visversvara, 2004).

The mechanisms involved with the pathogenesis of *Acanthamoeba* granulomatous encephalitis (AGE) and keratitis remain incompletely understood, but in both cases they include a pro-inflammatory response, invasion and cell damage leading to the brain dysfunction and epithelial lesions, respectively (Walochnik et al., 2000; Schuster and Visversvara, 2004).

Acanthamoeba pathogenesis is related to several direct and indirect factors. Studies to date have confirmed that binding of *Acanthamoeba* to a host cell is mediated by mannose-binding proteins (Garate et al., 2005) that lead to secondary events, such as phagocytosis, apoptosis and secretion of proteases.

Extracellular proteases are essential to *Acanthamoeba* survival, multiplication and cellular differentiation in the environment (Dudley et al., 2008), but can also play an important role in microbial pathogenesis including host cell and tissue invasion, migration, catabolism of host proteins, cytoadherence, and both stimulation and evasion of host response (Klemba and Goldberg, 2002).

Acanthamoeba trophozoites secrete a protease complex that can be formed by two or more proteases that varied among species and isolates (Mitro et al., 1994; Cao et al., 1998; Alfieri et al., 2000; Khan et al., 2000). Among the extracellular protease complex of *Acanthamoeba*, several serine, cysteine and metallo proteases have been implicated in the degradation of host tissues (Alsam et al., 2003; Khan, 2003; Khan, 2006; Sissons et al., 2006), and considering their importance as virulence factors, the characterization of specific extracellular proteases by zymogram analysis has been suggested as important markers for the differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* (Khan et al., 2000).

In this context, we evaluate the variability and substrate specificity of extracellular proteases secreted by *Acanthamoeba* isolates obtained from environmental samples in community areas of hospitals and universities of Southern Brazil.

MATERIAL AND METHODS

***Acanthamoeba* cultures.** Ten isolates obtained from environmental samples were evaluated in this work (Table 1). All species and isolates of *Acanthamoeba* were grown aseptically in PYG medium

(Proteose Peptone, 0.75% (wt/vol), yeast extract, 0.75% (wt/vol), glucose, 1.5% (wt/vol) at 30°C without shaking.

Table 1- *Acanthamoeba* isolates used in this study.

Species ¹	Isolate	Group ²	Origin
<i>A. castellanii</i>	HP08	II	Hospital, Frederico Westphalen, RS
<i>A. castellanii</i>	HP16	II	Hospital, Frederico Westphalen, RS
<i>A. castellanii</i>	HG20	II	Hospital, Caxias do Sul, RS
<i>A. castellanii</i>	HG29	II	Hospital, Caxias do Sul, RS
<i>A. castellanii</i>	HG80	II	Hospital, Caxias do Sul, RS
<i>A. castellanii</i>	CVN38	II	Academic, Santos, SP
<i>A. castellanii</i>	C58	II	Academic, Frederico Westphalen, RS
<i>A. pearcei</i>	CVN47	I	Academic, Santos, SP
<i>A. healyi</i>	C33	III	Academic, Frederico Westphalen, RS
<i>A. astronyxis</i>	C52	I	Academic, Frederico Westphalen, RS

¹ Based on RFLP-PCR patterns and sequencing of ssu rDNA; ² Group based on cist size and morphology (Pussard & Ponds (1977).

For the assay of extracellular proteases, 5×10^5 trophozoites were inoculated in PYG medium and incubated for 24h at 30°C without shaking. Trophozoites were removed by centrifugation (100 x g, 5 min), and the *Acanthamoeba*-conditionated medium (crude extract) was conserved at -80°C.

Protease assays. Protease activity in *Acanthamoeba*-conditionated medium was determined by the azocasein colorimetric method. Briefly, 12 µl of crude extract were mixed with 38 µl of 1% azocasein in 25 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0 supplemented with 5 mmol l⁻¹ MgCl₂, and incubated at 37°C for 60 min. The reaction was stopped with 60 µl of 10% trichloroacetic acid, and after 15 min at 0°C, the precipitate was removed by centrifugation at 14 000 g for 5 min. The supernatant fluid (80 µl) was transferred to microplates and mixed with 20 µl of NaCl 1.8 mol l⁻¹, and absorbance (420 nm) was determined in a Expert Plus (ASYS Hitech, Eugendorf, Austria) microplate reader. One unit of caseinolytic activity is defined as the amount of crude extract causing an increase in A₄₂₀ of 0.1 for 1 h of incubation at 37°C. The protein concentration on the crude extracts was determined with Coomassie Brilliant Blue G-250 by the method proposed by Bradford (1976).

Zymography. Zymography assays were performed to visualize and characterized the *Acanthamoeba* extracellular protease complex as previously described by Zacaria et al. (2010). Briefly, 10% SDS-polyacrylamide gels (Laemmli 1970) were co-polymerized with 0.1% substrate -gelatin, casein, γ-globulin, fibrinogen, bovine serum albumin Fraction V, or egg albumin (Sigma, St Louis, MO). The *Acanthamoeba*-conditionated media (10 µl) were mixed with 15 µl water, and 25 µl of sample buffer (62.4 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS and 0.001% bromophenol blue), and 25 µl were loaded into the wells. Electrophoresis was performed at 4°C and 150 V until the bromophenol dye reached the bottom of the gel. To remove SDS, the gels were washed in Triton X- 100 (2.5%) for 2 h at room

temperature with constant shaking. After this period, the gels were washed with distilled water, and incubated in a zymogram reaction buffer (50 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0 with 5 mmol l⁻¹ CaCl₂) at 37°C for 2 h. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.1%) for 12 h, and then destained in 30% ethanol and 7% acetic acid solution. Protease activity was visible as clear bands on a blue background. For quantification, the zymograms were digitalized and bands density determined using CPATLAS 2.0 (<http://lazarsoftware.com>).

Apparent molecular weights (AMW) were calculated by comparing protease mobility with those of BenchMark Protein ladder (Gibco BRL, Rockville, MD). Protease inhibition by phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) and EDTA was determined as described by Bertolini and Rohovec (1992).

Statistical analysis. Protease activity data were analyzed by ANOVA and means were compared by the Duncan method. Multivariate analyses included Jaccard's distance calculation and clustering by the single linkage method. All statistical analyses were performed using the SPSS software (ver. 10.1, SPSS Inc., www.spss.com).

RESULTS AND DISCUSSION

The overall caseinolytic activity in *Acanthamoeba*-conditioned media varied from 5.789 ± 0.272 U ml⁻¹ (C52) to 2.499 ± 0.206 U ml⁻¹ (CVN38). The highest specific activity (Figure 1) was detected on CVN47 (41.695 ± 5.410 U mg⁻¹) and C52 (36.972 ± 1.021 U mg⁻¹). These isolates classified as *A. pearcei* and *A. astronyxis*, respectively, make part of group I, and are considered non-pathogenics. Among *A. castellanii* isolates, a potential pathogenic species, HP08 exhibited the highest specific activity (30.042 ± 2.540 U mg⁻¹). Moreover, as expected, high correlation was observed between the overall caseinolytic activity and the densitometric analysis of the casein co-polymerized SDS-PAGE profiles (r²= 0.876, P>0.001).

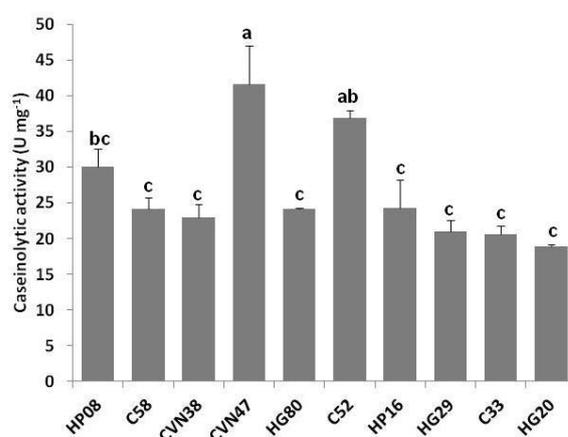


Figure 1- Extracellular specific protease activity of environmental isolates of *Acanthamoeba*. Bars with the same letter are not significantly different according to the Duncan's test P>0.05.

These results corroborate those of Khan et al. (2000), Sissons et al. (2006), and Dudley et al. (2008)

which also detected high variation of extracellular proteolytic activity among species and isolates of *Acanthamoeba*. However, the present data differ from those of Khan et al. (2000) that reported higher protease activity on pathogenic than on nonpathogenic species of *Acanthamoeba*, and obtained low specific activities among all the isolates evaluated (0.01 to 0.12 U mg⁻¹).

Zymograms obtained on gelatin co-polymerized SDS-PAGE allowed identifying different well defined banding patterns among *Acanthamoeba* isolates (Figure 2). Four clusters were formed by the multivariate analysis of gelatinolytic patterns (Figure 3). The first cluster included four isolates. HP08, HG80, and HP16 exhibited five bands with AMW of 135, 90, 80, 65, and 56 kDa, and CVN38 showed a similar pattern except for the absence of the 80 kDa band. The second cluster was formed by three isolates, C58 with four bands of 135, 85, 70, and 62 kDa, and HG20 and HG29 with three bands (135, 85 and 62kDa). These two clusters included all the isolates classified as *A. castellanii*. A third cluster was formed by CVN47 (*A. pearcei*) that exhibited two strong bands of ~200 and 76 kDa, and C33 (*A. healyi*) with a band of ~200 and a weak band of 45 kDa. The isolate C52 (*A. astronyxis*) showed a particular pattern formed by two strong bands of 95 and 52 kDa.

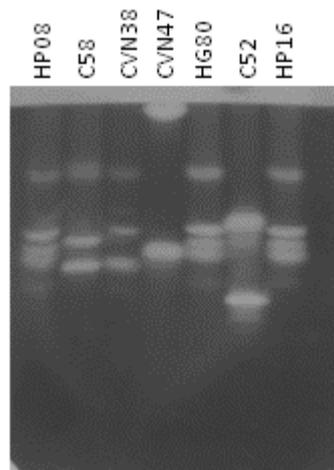


Figure 2- Extracellular protease profiles of environmental isolates of *Acanthamoeba* on gelatin co-polymerized SDS-PAGE gel.

Protease inhibition by PMSF and EDTA showed that all the gelatinolytic proteases of *A. castellanii*, *A. pearcei*, and *A. haelyi* are serine proteases, where the two gelatinases secreted by *A. astronyxis* are cysteine proteases. Serine proteases are the most abundant enzymes of the extracellular proteolytic complex of *Acanthamoeba*, and have been detected in several species and isolates of these protozoa (Mitro et al., 1994; Cao et al., 1998; Alfieri et al., 2000; Khan et al., 2000; Khan, 2006; Sissons et al., 2006; Dudley et al., 2008). However, cysteine (Hadas and Mazu, 1993; Alfieri et al., 2000), and metalloproteases (Cao et al., 1998; Alsam et al., 2005; Sissons et al., 2006) have been also detected in some isolates.

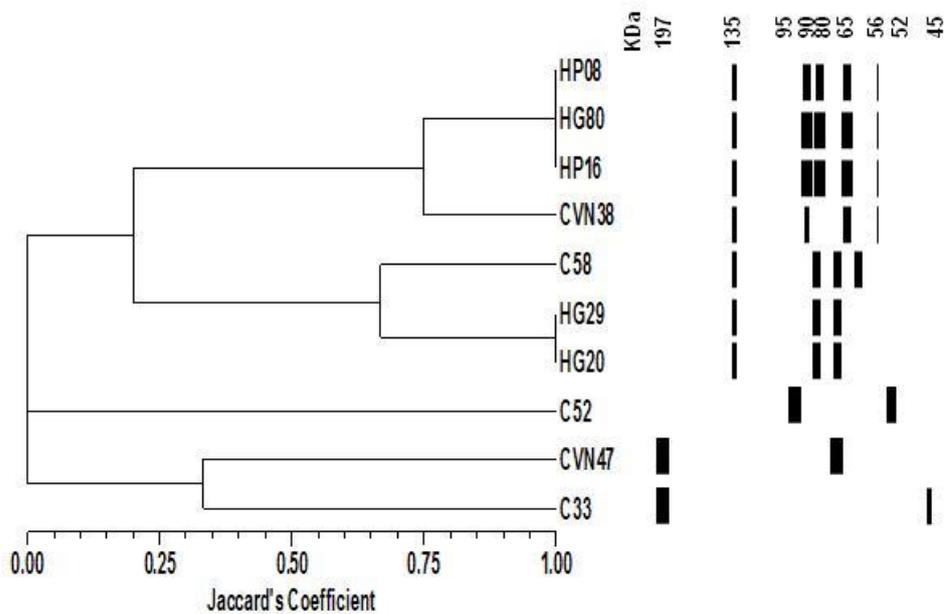
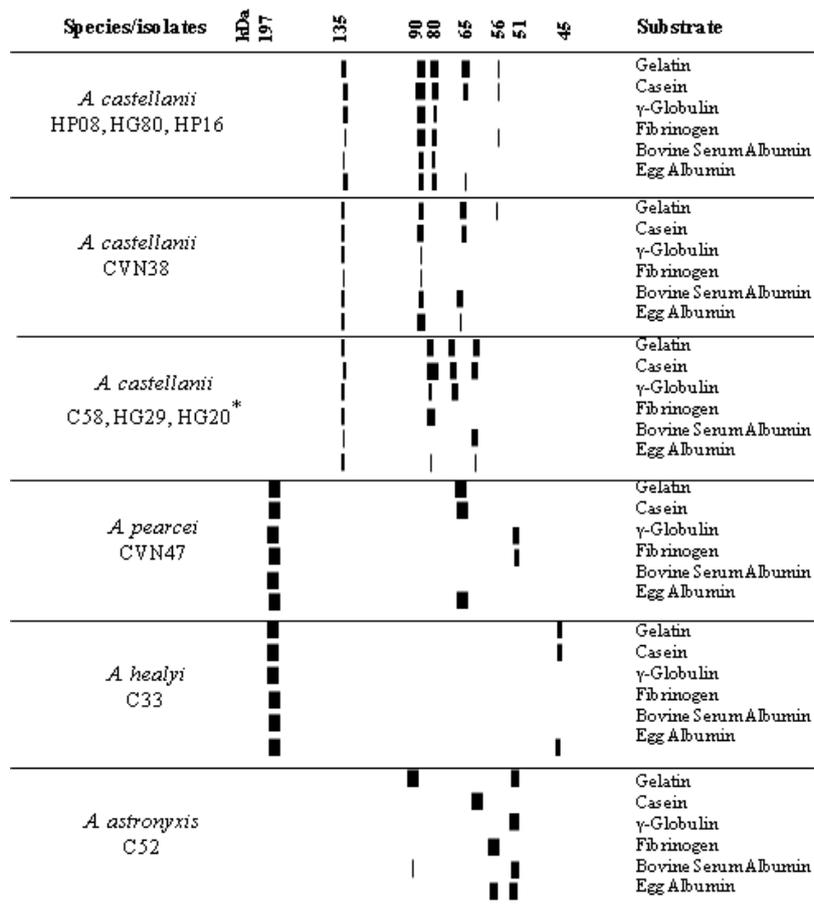


Figure 3- Hierarchical cluster analysis (Single Linkage Method) based on the extracellular protease profiles of ten *Acanthamoeba* isolates on gelatin co-polymerized SDS-PAGE gels.

A large number of *Acanthamoeba* proteases have been identified to date, most of them by zymogram analysis of gelatin co-polymerized SDS-PAGE gels. Serine proteases of AMW similar to those of the present work were reported by some authors: Cao et al. (1998) also reported a 90 kDa serine protease in *A. castellanii* isolated from a keratitis infection; Alfieri et al. (2000) detected a 75 kDa protease in *A. polyphaga*; Khan et al. (2000) reported a 107 kDa protease on pathogenic *Acanthamoeba*; and 66 kDa and 49 kDa proteases were identified by Mitro et al. (1994) in *A. polyphaga*.

To evaluate the substrate specificity of extracellular proteases, six different substrates were incorporated on SDS-PAGE gels. As can be observed in diagram of Figure 4, some proteases (197, 135, 90, and 80 kDa) of different species of *Acanthamoeba* were able to degrade all the substrates.

Conversely, other enzymes were more specific, like the 65 and 45 kDa serine proteases of *A. castellanii* and *A. pearcei*, that showed activity on gelatin, casein, and egg albumin, the 70 kDa protease detected on some isolates of *A. castellanii* that efficiently degraded gelatin, casein and γ -globulin, or the 62 kDa protease of *A. pearcei* detected only on γ -globulin and fibrinogen co-polymerized gels. The more specific enzymes were the 67 kDa serine protease and the 62 kDa metalloprotease of *A. astronyxis* which efficiently degrade casein and fibrinogen/egg albumin, respectively.



* HG29 and HG20 did not exhibit the 62.kDa band.

Figure 4- Extracellular protease profiles of *Acanthamoeba* isolates on SDS-PAGE gels copolymerized with different substrates

Although studies concerning the substrate range of *Acanthamoeba* proteases are limited, serine proteases of 42 kDa (Cho et al., 2000) and 12 kDa (Na et al., 2002) that degrade immunoglobulins, proteases inhibitors and interleukin-1 were identified in the culture supernatant of *Acanthamoeba* sp., and a 33 kDa protease from *A. healyi* was able to degrade type I and IV collagen, as well as fibronectin, fibrinogen, immunoglobulins, albumin and haemoglobin.

The ability to degrade different substrates contribute to *Acanthamoeba* survival in different environments, and some activities, particularly on collagen, fibrinogen and immunoglobulins, may facilitate invasion and lead to secondary reactions such as oedema, necrosis and inflammatory responses (Khan, 2006).

REFERENCES

Alfieri, S.C.; Correia, C.E.B.; Motegi, S.A.; Pral, E.M.F. Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. J.Parasitol. 2000, 86, 220-227.

- Alsam S, Kim KS, Stins M, Rivas AO, Sissons J, Khan NA: *Acanthamoeba* interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* 2003, 35, 235-241.
- Bertolini, J.M.; Rohovec, J.S. Electrophoretic detection of proteases from diferente *Flexibacter columnaris* strains and assessment of their variability. *Dis Aquat Organ*, 1992, **12**, 121-128.
- Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, **72**: 248–254
- Cao, Z.; Jefferson, D. M.; Panjwani, N. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*, *J.Biol.Chem.* 1998, 273, 15838-15845.
- Dudley, R.; Alsam, S.; Khan, N. A. The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008, 286: 9-15.
- Garate, M.; Cubillos, I.; Marchant, J.; Panjwani, N. Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein. *Infect. Immun.* 2005, 73: 5775-5781.
- Khan, N.A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb Pathog* 2003, 34, 277-285.
- Khan, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 2006, 30: 564–595.
- Khan, N.A.; Jarroll, E.L.; Panjwani, N.; Cao, Z.; Paget, T.A. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38: 2858-2861.
- Marciano-Cabral, F., Puffenbauer, R., Cabral, G.A. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J Euk Microbiol* 2000, 47, 29-36.
- Marciano-Cabral, F.; Cabral, G. *Acanthamoeba spp.* as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003, 16: 273-307.
- Mitro, K.; Bhagavathiammai, A.; Zhou, O.-M.; Bobbett, G.; McKerrow, J. H.; Chokshi, R.; Chokshi, B.; James, E. R. Partial characterization of the proteolytic secretions of *Acanthamoeba polyphaga*, *Exp.Parasitol.* 1994, 78, 377-385.
- Sissons, J.; Alsam, S.; Goldsworthy, G.; Lightfoot, M.; Jarroll, E.L.; Khan, N.A. Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis. *BMC Microbiol.* 2006, 6: 42.
- Schuster, F.L.; Visversvara, G.S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int. J. Parasitol.* 2004, 34: 277-285.
- Walochnik, J.; Haller-Schober, E.M.; Kolli, H.; Picher, O.; Obwaller, A.; Aspöck, H. Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens-wearing keratitis patients in Austria. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38: 3932-3936.
- Zacaria, J.; Delamare, A.P.L.; Costa, S.O.P.; Echeverrigaray, S. Diversity of extracellular proteases of *Aeromonas* determined by zymogram analysis. *J. Appl. Microbiol.* 2010,

5. CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados experimentais obtidos é possível tecer as seguintes conclusões:

- 1- A aplicação de método alternativo para isolamento de *Acanthamoeba* envolvendo a amostragem, enriquecimento, indução de encistamento e a micromanipulação de cistos diretamente em placas mediante a utilização de micromanipulador de ascos de leveduras, mostrou-se mais eficiente e rápida do que os métodos convencionais de plaqueamento e repicagens sucessivas para purificação de clones.
- 2- Protozoários do gênero *Acanthamoeba* apresentam elevada prevalência amostras de poeira, águas e biofilmes, oriundas de ambientes acadêmicos da região norte e noroeste do Rio Grande do Sul.
- 3- A maior parte das *Acanthamoebas* isoladas de ambientes acadêmicos e hospitalares foram classificadas dentro do grupo II, o qual inclui a maior parte das espécies patogênicas, e exibiram características fisiológicas que lhes conferem capacidade de permanência e proliferação em diversos ambientes, e conseqüentemente, potencial infeccioso.
- 4- A resistência de *Acanthamoeba* aos produtos comumente utilizados nos processos de limpeza e desinfecção de ambientes fechados (acadêmicos e hospitalares) indica a necessidade de desenvolvimento de produtos mais eficientes para o controle destes microrganismos.
- 5- Análise do complexo proteolítico extracelular de isolados ambientais de *Acanthamoeba*, mostrou importantes variações quali e quantitativas. Diversas proteases com atividade sobre gelatina, caseína, fibrinogênio, γ -globulina e albuminas foram detectadas nos diversos isolados e espécies avaliadas, indicando o potencial patogênico dos mesmos, já que estas proteases, isoladamente ou em conjunto, podem auxiliar o protozoário no processo de invasão e drible do sistema imune, assim como propiciar reações inflamatórias.

Em conjunto, os resultados obtidos nos vários levantamentos realizados indicam o risco potencial à saúde coletiva pela exposição aos protozoários de vida livre potencialmente patogênicos. Desta maneira, apontam no sentido da necessidade de ações combinadas envolvendo informação à comunidade e profissionais da saúde, desenvolvimento de medidas profiláticas e sistemas mais eficientes para o controle destes microrganismos nos ambientes de acadêmicos e hospitalares.