

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

Denise Leal dos Santos

**AMEBAS AMBIENTAIS E A ABORDAGEM DA SAÚDE ÚNICA NO CONTROLE E  
PREVENÇÃO DE DOENÇAS CAUSADAS POR *Acanthamoeba* spp. E *Naegleria  
fowleri* EM HUMANOS E ANIMAIS.**

Porto Alegre

2022

### CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Denise Leal dos  
AMEBAS AMBIENTAIS E A ABORDAGEM DA SAÚDE ÚNICA NO  
CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS CAUSADAS POR  
Acanthamoeba spp. E Naegleria fowleri EM HUMANOS E  
ANIMAIS. / Denise Leal dos Santos. -- 2022.  
91 f.  
Orientadora: Marilise Brittes Rott.

Coorientador: Henri Stephan Schrekker.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e  
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Saúde Única. 2. Acanthamoeba. 3. Naegleria. 4.  
Amebas ambientais. I. Rott, Marilise Brittes, orient.  
II. Schrekker, Henri Stephan, coorient. III. Título.

Denise Leal dos Santos

**AMEBAS AMBIENTAIS E A ABORDAGEM DA SAÚDE ÚNICA NO CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS CAUSADAS POR *Acanthamoeba* spp. E *Naegleria fowleri* EM HUMANOS E ANIMAIS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilise Brittes Rott  
Coorientador: Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker

Porto Alegre

2022

“Se as abelhas desaparecerem da face da terra, a humanidade terá apenas mais quatro anos de existência. Sem abelhas não há polinização, não há reprodução da flora, **sem flora não há animais, sem animais não haverá raça humana.**”

Albert Einstein

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela direção e proteção em todos os momentos da minha vida.

A minha família, pelo apoio e paciência nos momentos difíceis.

A Mauro Novo Riggo pelo amor, carinho e incentivo para alcançar vãos maiores.

A Professora Marilise Brittes Rott não só pela excelente competência como orientadora, mas também pela amizade e aconselhamento. Muito obrigada!

Ao Professor Henri Stephan Schrekker, pela orientação e cordialidade com que sempre me recebeu.

A todos os colegas do Laboratório de Protozoologia. Um agradecimento todo especial a Veridiana Gomes Virginio, Beni Jequicene Mussengue Chaúque, Francisco Kercher Berté e Karina Rodrigues Lorenzatto pela amizade e parceria de sucesso em nossos trabalhos no laboratório.

Aos Drs Diane Ruschel Marinho e Sergio Kwitko, bem como à equipe do serviço de oftalmologia do HCPA pelo auxílio e por permitirem a realização do meu estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da UFRGS, bem como a todos os professores que fazem parte do corpo docente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, indispensável para que eu pudesse me dedicar ao meu projeto.

# AMEBAS AMBIENTAIS E A ABORDAGEM DA SAÚDE ÚNICA NO CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS CAUSADAS POR *Acanthamoeba* spp. E *Naegleria fowleri* EM HUMANOS E ANIMAIS.<sup>1</sup>

Autor: Denise Leal dos Santos

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilise Brittes Rott

Co-orientador: Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker

## RESUMO

No mundo globalizado em que vivemos, com questões ambientais urgentes, como aquecimento global, invasão do ambiente silvestre e transmissão de patógenos emergentes, este trabalho apresenta a relação das amebas ambientais sob a perspectiva da Saúde Única. As Amebas de Vida Livre (AVL) são protozoários ubíquos e anfizoicos dentre as quais destacam-se: *Acanthamoeba* spp. causadora da Ceratite Amebiana e Encefalite Amebiana Granulomatosa; e *Naegleria fowleri* causadora da Meningoencefalite Amebiana Primária. Esses protozoários são considerados patógenos oportunistas podendo carrear outros microrganismos em seu interior. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atuação de *Acanthamoeba* spp. e *N. fowleri* como dispersoras de doenças infecciosas negligenciadas e emergentes em humanos e animais e sua relação com o meio ambiente, dentro da abordagem da Saúde Única. Foi realizado o isolamento e caracterização morfológica e molecular de três amostras suspeitas de ceratite amebiana, cujo resultado foi positivo para *Acanthamoeba* spp., de genótipo T4, e presença de endossimbionte. Dessas três amostras, duas foram utilizadas num experimento onde a concentração inibitória mínima do sal C<sub>16</sub>MImCl foi testada sobre seus trofozoítos e cistos que sofreram inativação frente ao sal imidazólico. O sal imidazólico inativou 100% dos cistos (altamente resistentes a desinfetantes) em uma concentração menor que a clorexidina (medicamento utilizado no tratamento da ceratite amebiana). Foi realizada uma revisão sistemática e meta-análise sobre prevalência de AVL em águas recreativas e também o relato dos exames diagnósticos realizados com amostras suspeitas de doenças causadas por AVL. Outros resultados obtidos mostraram que *N. fowleri* foi detectada através de PCR em amostra de cérebro bovino, além do levantamento de dados para a escrita de um artigo de revisão da influência das mudanças climáticas sobre a ocorrência desse protozoário dentro do contexto de One Health approach. Também foi criado um protocolo de método de recuperação e conservação de culturas de AVL em laboratório. *Acanthamoeba* spp. e *N. fowleri* estão presentes no ambiente e podem acometer seres humanos e animais, por isso é tão importante a sua inserção dentro da abordagem da Saúde Única.

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (91 p.) Setembro, 2022.

ENVIRONMENTAL AMEBAS AND THE ONE HEALTH APPROACH IN THE  
CONTROL AND PREVENTION OF DISEASES CAUSED BY *Acanthamoeba* spp.  
AND *Naegleria fowleri* IN HUMAN AND ANIMALS.<sup>1</sup>

Author: Denise Leal dos Santos

Advisor: Prof. Dr. Marilise Brittes Rott

Co-Advisor: Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker

**ABSTRACT**

In the globalized world we live in, with urgent environmental issues such as global warming, invasion of the wild environment and transmission of emerging pathogens, this work presents the relationship of environmental amoebas from the perspective of One Health. Free-Living Amoebas (FLA) are ubiquitous and amphizoic protozoa, among which the following stand out: *Acanthamoeba* spp. causing Amoebic Keratitis and Granulomatous Amoebic Encephalitis; and *Naegleria fowleri* causing Primary Amebic Meningoencephalitis. These protozoa are considered opportunistic pathogens and can carry other microorganisms inside them. The objective of this work was to evaluate the performance of *Acanthamoeba* spp. and *N. fowleri* as dispersers of neglected and emerging infectious diseases in humans and animals and their relationship with the environment, within the One Health approach. The isolation and morphological and molecular characterization of three samples suspected of amoebic keratitis, whose result was positive for *Acanthamoeba* spp., genotype T4, and the presence of an endosymbiont, was performed. Of these three samples, two were used in an experiment where the minimum inhibitory concentration of C<sub>16</sub>MImCl salt was tested on their trophozoites and cysts that were inactivated against the imidazolium salt. The C<sub>16</sub>MImCl inactivated 100% of the cysts (highly resistant to disinfectants) at a lower concentration than chlorhexidine (a drug used in the treatment of amoebic keratitis). A systematic review and meta-analysis on the prevalence of FLA in recreational waters was performed, as well as the report of diagnostic tests performed with samples suspected of diseases caused by FLA. Other results obtained showed that *N. fowleri* was detected through PCR in a bovine brain sample, in addition to collecting data for writing a review article on the influence of climate change on the occurrence of this protozoan within the context of the One Health approach. A protocol for the recovery and conservation of FLA cultures in the laboratory was also created. *Acanthamoeba* spp. and *N. fowleri* are present in the environment and can affect humans and animals, which is why their inclusion within the One Health approach is so important.

<sup>1</sup>Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (91 p.) September, 2022.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1 Objetivo Geral .....	4
2.2 Objetivos Específicos .....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	5
3.1 Saúde Única (One Health approach) .....	5
3.2 Doenças emergentes, negligenciadas e zoonóticas .....	8
3.3 Amebas de Vida Livre (AVL) .....	8
3.3.1 AVL como dispersoras de microrganismos e vetores de doenças .....	9
3.4 Características gerais e etiologia de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	10
3.4.1 Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp. em humanos .....	12
3.4.2 Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp. em animais .....	13
3.4.3 EAG em humanos e animais.....	15
3.5 Características gerais e etiologia de <i>Naegleria fowleri</i> .....	16
3.5.1 MAP em humanos .....	17
3.5.2 MAP em animais .....	18
3.6 Mudanças climáticas e AVL .....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Local de desenvolvimento do trabalho .....	22
4.2 Exames de diagnóstico de doenças causadas por AVL.....	22
4.3 Amostras utilizadas .....	22
4.5 Extração de DNA, PCR e sequenciamento.....	23
4.6 Sal imidazólico .....	24



4.7 Avaliação da atividade amebicida .....	24
4.8 Manutenção e coleção de amebas em laboratório.....	25
5. ARTIGOS.....	26
5.1 Capítulo I.....	26
5.2 Capítulo II.....	26
5.3. Capítulo III.....	26
5.4. Capítulo IV .....	26
5.5 Capítulo V .....	26
5.6. Capítulo VI .....	27
5.7. Capítulo VII.....	48
6. DISCUSSÃO GERAL.....	61
7. CONCLUSÃO .....	63
8. REFERÊNCIAS .....	64
<b>9. APÊNDICES .....</b>	<b>74</b>
10. ANEXOS .....	78

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Características de casos de MAP em animais.....	19
---	----

### Capítulo VII

Table 1: Plates dehydrated of monoxenic cultivation, its origin and year in which the cultivation was carried out.....	53
--	----

### APÊNDICES

Table S1: Results of monoxenic plates cultivate (triplicate).....	77
---	----

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1: One Health umbrela.....	7
Figura 2: Termos usados na abordagem em Saúde Única.....	7
Figura 3: Classificação taxonômica de AVL.....	9
Figura 4: Formas de vida de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	10
Figura 5: Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	11
Figura 6: Vascularização da córnea e presença de infiltrado em anel em paciente com ceratite amebiana.....	13
Figura 7: Ciclo de infecção por <i>Naegleria fowleri</i> .....	16
Figura 8: Mapa de casos de MAP nos EUA.....	17

### APÊNDICES

#### Capítulo VI

Graphical abstract.....	29
Figure 1: Chemical structure of 1- <i>n</i> -hexadecyl-3-methylimidazoliumchloride (C <sub>16</sub> MImCl).....	32
Figure 2: Trophozoite inactivation profile of HCPA 2 (A) and HCPA 4 (B) isolates exposed to C <sub>16</sub> MImCl for 24h and 48h.....	37
Figure 3: Cyst inactivation profile of HCPA 2 (A) and HCPA 4 (B) isolates exposed to C <sub>16</sub> MImCl for 24h and 48h.....	38
Figure 4: Cysts of <i>Acanthamoeba</i> spp.....	39

#### APÊNDICES

Figure S1: H NMR spectrum of C <sub>16</sub> MImCl (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	75
Figure S2: Comparison of the susceptibility of cysts and trophozoites of the HCPA 2 and HCPA 4 isolate exposed to C <sub>16</sub> MImCl for 24 h.....	75

## Capítulo VII

Figure 1: Plates rehydration method .....	53
Figure 2: AmoebaeCollection.....	55
Figure 3: Trophozoites and cysts of <i>Acanthamoeba</i> spp recovered from plates of monoxenic cultures.....	55
Figure 4: Passage of trophozoites in monoxenic cultivation.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVL	Amebas de Vida Livre
CA	Ceratite por <i>Acanthamoeba</i>
EAG	Encefalite Amebiana Granulomatosa
MAP	Meningoencefalite Amebiana Primária
LC	Lentes de contato
MRA	Microrganismo resistente a Ameba
SNC	Sistema Nervoso Central
OMS	Organização Mundial da Saúde
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
COHERE	Checklist for One Health Epidemiological Reporting of Evidence
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
FeLV	Leucemia Felina
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
PYG	Peptona, Levedo, Glicose
CIM	Concentração Inibitória Mínima
ANN	Ágar Não Nutriente
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

## 1. INTRODUÇÃO

Amebas de Vida Livre (AVL) são organismos ubíquos, amplamente dispersos no ambiente, podendo ser encontrados no solo, água e ar.

Dentre as AVL destacamos *Acanthamoeba* spp. e *Naegleria fowleri* com grande prevalência no ambiente. Esses microrganismos são considerados patógenos/opportunistas, pois podem causar doenças em indivíduos saudáveis ou imunocomprometidos. Entre as doenças causadas por *Acanthamoeba* spp. destacam-se a Ceratite Amebiana (CA), que pode levar à perda da visão em indivíduos hígidos e a Encefalite Granulomatosa Amebiana (EAG), uma infecção do sistema nervoso central que pode levar à morte e ocorre em pacientes imunocomprometidos. *Naegleria fowleri* pode causar a Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP), uma infecção não oportunista, de curso rápido e letal que ocorre em indivíduos saudáveis (Visvesvara et al., 2007).

Muitos casos de CA têm sido descritos principalmente devido ao aumento do uso de lentes de contato. Relatos frequentes revelam que os usuários de lentes de contato que contraíram essa doença possuem um histórico de recreação ou mergulho em ambientes aquáticos enquanto faziam uso de suas lentes, além da falta de manutenção e desinfecção das mesmas. É importante ressaltar que não existem soluções de limpeza e conservação de lentes de contato completamente efetivas contra *Acanthamoeba* (Leite e Macente, 2014). A CA é agravada pela possibilidade do parasito produzir cistos dificultando a ação dos produtos de limpeza e desinfecção dos estojos e lentes de contato, bem como das soluções utilizadas para o tratamento (Kilvington et al., 2004). O diagnóstico e tratamento precoces são de extrema importância, entretanto por falta de suspeição médica, o atraso normalmente ocorre e isso acaba agravando o caso e conseqüentemente torna os medicamentos utilizados menos eficazes, além de gerar um custo alto para o sistema de saúde, pois na grande maioria dos casos há necessidade de transplante de córnea (Santos et al., 2018).

Já a EAG é uma doença com curso muitas vezes fatal, causada por *Acanthamoeba* spp., que rompem a barreira hematoencefálica, causando danos aos neurônios. Ela pode ocorrer principalmente em indivíduos imunocomprometidos, com doenças como AIDS, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes e também em pacientes transplantados ou com câncer. A maioria dos

casos são subdiagnosticados e a falta de suspeição atrasa o diagnóstico e intervenção terapêutica (Kalra et al., 2020).

Doenças causadas por *Acanthamoeba* spp. também têm sido reportadas em animais, como lesões cutâneas em cães (Carlesso et al., 2014) e ceratite em gatos abandonados (Montoya et al., 2018) e aves (Karakavuc et al., 2017). Além disso, há estudos de isolamento desse protozoário em morcegos (Mulec et al., 2016). Muitas espécies de *Acanthamoeba* podem abrigar bactérias, fungos ou vírus em seu interior. Segundo Greub e Raoult (2004), alguns desses microrganismos evoluíram e tornaram-se resistentes as amebas, sendo internalizados e desenvolvendo, mantendo ou exacerbando a virulência, incluindo resistência a antibióticos, além de se adaptar à vida dentro de macrófagos humanos. Dentre os microrganismos que podem se tornar resistentes a amebas (MRA) destacam-se *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Helicobacter pylori*, mimivírus e enterovírus.

*Naegleria fowleri*, causadora da MAP, é transmitida através de águas de lagoas, lagos ou piscinas contaminadas, acometendo indivíduos saudáveis, principalmente crianças e jovens adultos. É sensível a algumas condições ambientais, como pH extremo, não sobrevivendo na água do mar (Schuster e Visvesvara, 2004). O trofozoíto entra no organismo através das fossas nasais, penetrando na mucosa nasal e migrando ao longo do nervo olfativo até atingir o Sistema Nervoso Central (SNC). A MAP é uma infecção fatal do SNC (Rojas-Hernández et al., 2004).

Além da MAP em humanos, há relatos dessa doença em animais como antas, ovelhas e bovinos, sendo dois deles em propriedades próximas no estado do Rio Grande do Sul (Henker et al., 2019; Henker et al., 2021).

Muitas doenças que acometem humanos também ocorrem em animais e vice-versa, e podem ser oriundas da relação com o ambiente que os cerca. A abordagem de One Health ou Saúde Única é um conceito que engloba a inter-relação entre saúde humana, animal, ambiental e das plantas, favorecendo um equilíbrio (Cavalcante et al., 2020).

Nessa abordagem de Saúde Única, o objetivo do presente trabalho é propor soluções de prevenção e controle das doenças causadas por AVL, especialmente *Acanthamoeba* spp. e *N.fowleri*, através de pesquisas e ações que

promovam conscientização e tomada de decisões assertivas em prol do bem comum.

Devido à falta de drogas eficazes no tratamento da CA, da EAG e da MAP, à inexistência de soluções efetivas para manutenção e conservação dos estojos e lentes de contato, à carência de diagnósticos rápidos evitando danos à visão e ao SNC, à ineficiência de monitoramento de qualidade da água utilizada por humanos e animais, à ausência de estudos de caracterização molecular que auxiliem a mapear as espécies presentes no ambiente e ao desconhecimento desses microrganismos, é imperioso que sejam realizadas mais pesquisas e ações em prol de soluções efetivas para evitar doenças causadas por *Acanthamoeba* spp. e *N.fowleri*, bem como situar o grupo de Amebas de Vida Livre no âmbito da Saúde Única.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atuação de *Acanthamoeba* spp. e *N. fowleri* como dispersoras de doenças infecciosas negligenciadas e emergentes em humanos e animais e sua relação com o meio ambiente, dentro da abordagem da Saúde Única.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar exames de diagnóstico de Amebas de Vida Livre causadoras de ceratites e encefalites;
- Pesquisar a presença de endossimbiontes em isolados clínicos de *Acanthamoeba* spp. e *N. fowleri*, além de genotipar os isolados, através de metodologias como extração de DNA, PCR e sequenciamento a fim de estudar sua relação com a exacerbação das doenças causadas por esses microrganismos em humanos e animais;
- Determinar a atividade amebicida do sal imidazólico (C<sub>16</sub>MImCl), frente a trofozoítos e cistos de isolados de casos de ceratite humana, sendo um deles carreador de um endossimbionte, e avaliar a possibilidade de utilizá-lo como produto de limpeza e desinfecção de estojos de lentes de contato e superfícies;
- Criar um protocolo de recuperação de placas desidratadas contendo cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., para manutenção de uma coleção seca de amebas em laboratório para fins de pesquisa.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Saúde Única (One Health approach)

O conceito de Saúde Única ressalta que a saúde das pessoas está intimamente ligada à saúde dos animais e do ambiente compartilhado (Cavalcante et al., 2020). O conceito de Saúde Única (One Health approach) é uma abordagem colaborativa, transdisciplinar e multissetorial, que ocorre nos níveis local, regional, nacional ou global, e envolve pilares indissociáveis que são as saúdes humana, animal, das plantas e do ambiente compartilhado (Pettan-Brewer et al., 2021; Cavalcante et al., 2020).

O termo Saúde nos remete a tempos muito distantes. Hipócrates, o pai da Medicina (460-377 a.C.) via o homem como uma unidade organizada e entendia a doença como uma desorganização desse estado (Scliar, 2007). Ele já defendia a ideia de que a saúde estava ligada a um ambiente saudável, através do Tratado “Ares, Águas e Lugares” onde observava que o adoecimento do indivíduo estava relacionado com as condições ambientais e socioculturais (Soares, 2020).

Muitos pensadores e cientistas ao longo do tempo lidaram com a questão da saúde sob várias perspectivas, mas foi no final do século XIX, que Louis Pasteur utilizando um microscópio, revelou a existência de microrganismos causadores de doenças que poderiam ser prevenidas e curadas (Scliar, 2007). Isso mudou completamente a maneira como pensamos e agimos em relação à saúde humana e animal.

Em 1947, o veterinário americano James Steele, trabalhou com a prevenção e erradicação de doenças zoonóticas, assunto que tomou uma proporção maior no final da década de 60, com o pesquisador Calvin Schwabe da Universidade da Califórnia. Acredita-se que o Dr. Schwabe cunhou o termo “One Medicine”, defendendo a interação e colaboração de profissionais das saúdes humana e animal tendo como foco as doenças zoonóticas. O termo One Medicine evoluiu para One Health, enfatizando a promoção da saúde em vez do tratamento das doenças (Gyles, 2016).

O conceito da Organização Mundial da Saúde (OMS), através da carta de princípios de sete de abril de 1948, diz que “Saúde é o estado do mais completo bem-estar físico, mental e social e não apenas a ausência de enfermidade”. Já

em 2008 a OMS, a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) apresentaram uma iniciativa chamada “Um Mundo, Uma Saúde”, onde o conceito de “One Health” mostrou que saúde humana, animal e ambiental são inseparáveis (Carneiro e Pettan-Brewer, 2021).

Hoje em dia, devido ao grande crescimento populacional há uma conexão maior das pessoas com os animais, principalmente os domésticos, que convivem no mesmo espaço e podem ser disseminadores ou reservatórios de patógenos. Áreas florestais, unidades de conservação e grandes complexos da vida silvestre estão sendo invadidos pelos humanos, ocasionando consequências destes atos para nós e para o planeta (Soares, 2020). Devido ao seu comportamento na natureza e sua biologia, os animais podem ser expostos a alterações ambientais mais rapidamente e em um nível maior do que os humanos que residem nas mesmas áreas, tornando-se, portanto, potenciais sentinelas para ameaças emergentes à saúde humana. Historicamente, animais sentinelas têm sido usados *in situ* para monitorar ambientes potencialmente perigosos (Backer e Miller, 2016).

Lerner e Zinsstag (2021) falam da diferença entre os termos “Uma Saúde”, conceito abordado por Cavalcante et al. (2020) e “Abordagem em Saúde Única” ou “One Health Approach”. O segundo termo, mais amplo, nos remete à transdisciplinaridade, englobando não só a saúde humana e animal, mas o meio ambiente e as plantas. (Häsler et al., 2014) (Figura 1). O complemento abordagem da Saúde Única é a medicina comparativa, que tem um importante papel não só na prevenção, mas também no controle de doenças infecciosas emergentes (Hosie e Jasim, 2020).

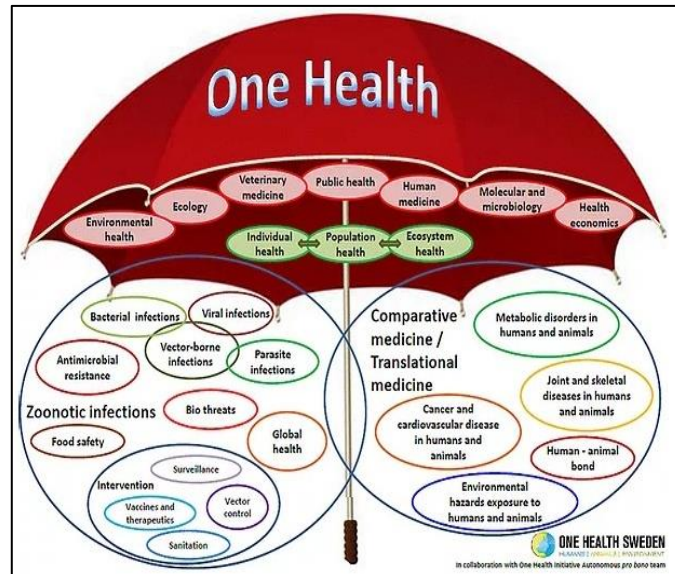


Figura 1: One Health umbrella. Engloba as mais diversas áreas de atuação da One Health (Fonte: One Health Sweden).

A partir do conceito de One Health outras concepções surgiram como a saúde do meio ambiente (Ecohealth), a saúde do planeta (Planetary Health) (entre outras) (Figura 2). O conceito de Ecohealth envolve os aspectos sociais, econômicos e ecológicos que afetam a saúde do ecossistema, impactando assim a saúde humana (Mi et al., 2016). Já o conceito de Planetary Health surgiu principalmente da preocupação com os efeitos globais de sistemas naturais degradados que afetam a saúde humana (Baquero et al., 2021). Essas visões são independentes, mas interconectadas ao mesmo tempo, sendo ferramentas holísticas que propõem soluções mais eficazes para enfrentar as ameaças à saúde, bem-estar e sustentabilidade dos seres humanos, animais, plantas e meio ambiente (Pettan-Brewer et al., 2021).



Figura 2: Termos usados na abordagem em Saúde Única. One Health Brasil (Fonte: Pettan-Brewer).

Baseado no conceito de abordagem em Saúde Única que consiste na tríade humana-animal-ambiental e que abrange uma gama imensa de colaborações interdisciplinares foram estabelecidos critérios para revisões sistemáticas através de uma lista chamada COHERE (Checklist for One Health Epidemiological Reporting of Evidence) proposta por Davis e colaboradores (2017) (Anexo I). Essa lista possui 19 itens com recomendações que devem ser seguidas para realizar uma revisão reunindo a introdução, métodos, resultados e discussão dentro do contexto da abordagem de Saúde Única.

### 3.2 Doenças emergentes, negligenciadas e zoonóticas

Os protozoários podem causar doenças que geram impacto na saúde pública. De acordo com o CDC, doenças emergentes são aquelas cuja incidência em humanos aumentou nas últimas duas décadas ou aumentará num futuro próximo. Não existe uma maneira de barrar completamente essas doenças, entretanto ações de prevenção e controle podem tornar-se difíceis e ineficientes em um primeiro momento (CDC, 2018). As amebas de vida livre (AVL) são um grupo emergente de patógenos/opportunistas capazes de causar várias doenças em humanos e animais (Reyes-Batlle et al., 2021). Doenças negligenciadas são doenças que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países, como a malária e a doença de Chagas (Departamento de Ciência e Tecnologia, 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), zoonose é uma doença infecciosa que é transmitida de um animal para o homem e vice-versa. Parasitas zoonóticos são vulneráveis às mudanças climáticas, influenciando sua transmissibilidade. A distribuição e prevalência de microrganismos na água, por exemplo, está relacionada às mudanças climáticas, com o aumento do fluxo da água devido a inundações e fortes chuvas. (Angelici et al., 2021).

### 3.3 Amebas de Vida Livre (AVL)

As AVL são ubíquas, e comumente isoladas da água (piscinas de hidromassagem, água da torneira, estojos de lentes de contato), ar (aparelhos de

ar-condicionado, torres de resfriamento) e solo (poeira) (Trabelsi et al., 2016). Elas também são consideradas anfitriãs, pois podem viver livremente no ambiente ou tornarem-se parasitas, causando doenças em humanos e animais (Majid et al., 2017). Por essa razão destacamos os gêneros *Acanthamoeba* devido à alta prevalência no ambiente e por ser causador de ceratite e encefalites e *Naegleria*, devido a alta letalidade relacionada a uma meningoencefalite (Lorenzo-Morales et al., 2015).

A classificação taxonômica e a nomenclatura de AVL são baseadas em características morfológicas, bioquímicas e em técnicas moleculares através do sequenciamento do gene 18S rDNA (Figura 3).

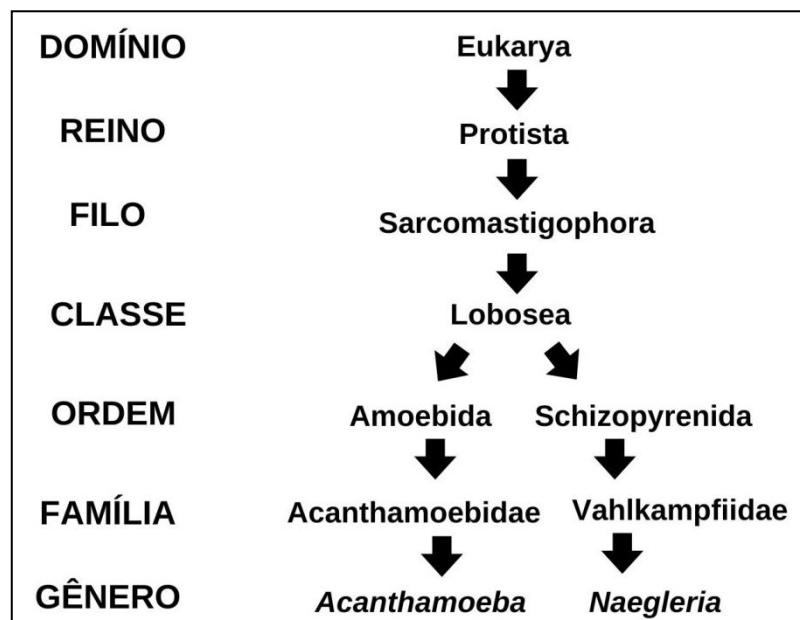


Figura 3: Classificação taxonômica de AVL. Fonte: Adaptado de Khan, 2006.

### 3.3.1 AVL como dispersoras de microrganismos e vetores de doenças

As AVL são consideradas o “cavalo de Tróia” do mundo microbiano, pois podem carrear em seu interior bactérias, vírus, fungos e outros protozoários, através da fagocitose, regulando as densidades microbianas, agindo, portanto, como vetor e/ou reservatório de patógenos (Greub e Raoult, 2004; Khan e Siddiqui, 2014). Possuem um papel importante em relação à ecologia e evolução, na propagação e disseminação de doenças, impactando assim a saúde humana, animal, e ambiental (Khan e Siddiqui, 2014).

A condição evolutiva de uma espécie viver dentro de outra é uma forma de adaptação e evoca o princípio da seleção natural favorecendo a cooperação entre elas. Isso se dá através da fagocitose, devido ao fato das amebas não conseguirem degradar todos os microrganismos, que poderão resistir à digestão ou usá-las como hospedeiros para a sua própria replicação. Bactérias ou fungos internalizados ficam protegidos das condições adversas e a ameba pode aumentar sua virulência (poder de invasão de um microrganismo causador de doenças) e sua patogenicidade (capacidade de produzir doença) também (Thewes et al., 2019; Khan e Siddiqui, 2014).

Já foram isoladas de AVL, bactérias obrigatórias como *Alphaproteobacteria* e *Bacteroidetes* e espécies patogênicas como *Mycobacterium* spp., *Legionella pneumophila* e *Listeria monocytogenes* (Schmitz-Esser et al., 2008).

### 3.4 Características gerais e etiologia de *Acanthamoeba* spp.

*Acanthamoeba* é o gênero pertencente às AVL mais encontrado no ambiente. Possui duas formas de vida: o trofozoíto que é a forma ativa do parasito (Figura 4 A), através da qual se alimenta, se locomove e se reproduz e o cisto que é sua forma de resistência (Figura 4B) que ocorre quando as condições não lhe são favoráveis, como alteração de pH, de temperatura, escassez de alimento ou dessecação. Os trofozoítos medem entre 8 e 40  $\mu\text{m}$  e possuem um único núcleo. O cisto mede em torno de 8 a 29  $\mu\text{m}$ , também com um único núcleo e possui uma dupla camada de celulose separando o endocisto do ectocisto, o que lhe confere proteção até mesmo da cloração ou medicamentos (Khan, 2006).

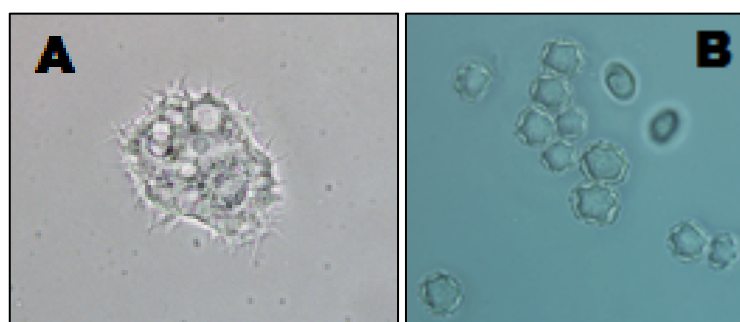


Figura 4: Formas de vida de *Acanthamoeba* spp. **A**- trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. **B**- Cistos de *Acanthamoeba* spp. Observados por microscopia óptica (1000X). Fotos: Laboratório de Protozoologia (UFRGS).

*Acanthamoeba* spp. podem causar doenças como a ceratite amebiana (CA) que acomete indivíduos hígidos, em sua grande maioria usuários de lentes de contato e a encefalite amebiana granulomatosa (EAG) que atinge indivíduos imunocomprometidos (Marciano-Cabral e Cabral, 2003). A transmissão pode ocorrer através de água contendo trofozoítos ou cistos (Figura 5).

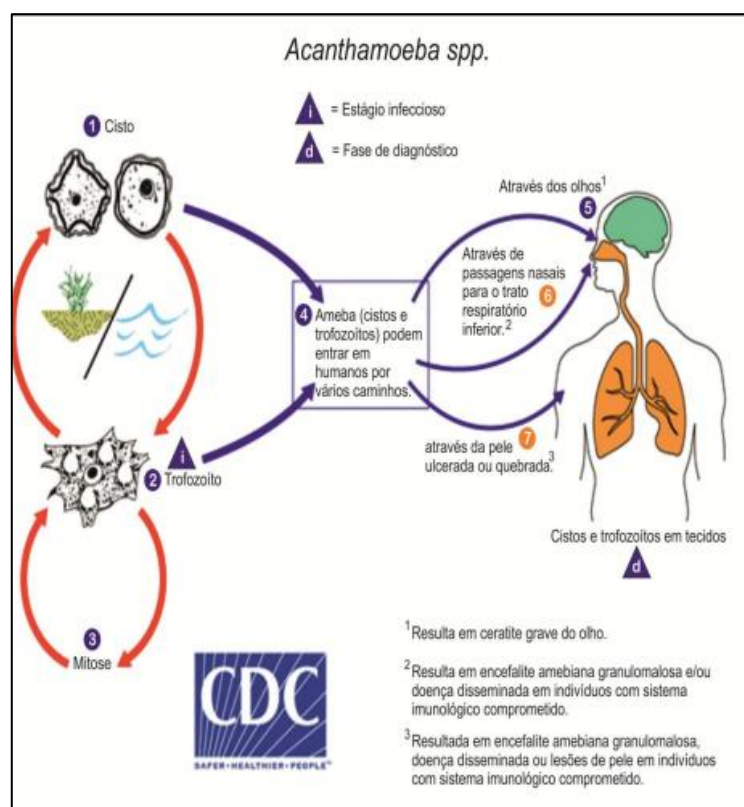


Figura 5: Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. Adaptado de CDC, 2019.

Podemos classificar as diferentes espécies de *Acanthamoeba* através da identificação morfológica de cistos e trofozoítos proposta por Pussard e Pons (1977). Através da visualização da forma e tamanho dos cistos, criaram-se três grupos distintos. O grupo I apresenta os maiores cistos (diâmetro médio  $\geq 18 \mu\text{m}$ ), sendo que o endocisto possui aspecto estrelado e inclui quatro espécies: *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* e *A. tubiashi*. O grupo II apresenta cistos com diâmetro menor que  $18 \mu\text{m}$ , com endocisto de forma estrelada, oval, triangular ou quadrangular e ectocisto seguindo o contorno do endocisto. As espécies de *Acanthamoeba* mais frequentemente isoladas do ambiente encontram-se nesse grupo: *A. mauritanensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhyodes*, *A.*



*paradivionensis* e *A. hatchetti*. Já o grupo III possui cisto com diâmetro médio menor que 19 µm, com endocisto poligonais e ovais e ectocisto liso. Nesse grupo encontramos cinco espécies: *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* e *A. pustulosa* (Khan, 2006; Visvesvara et al., 2007; Trabelsi et al., 2012).

Como as condições ambientais podem alterar a morfologia dos cistos, atualmente utilizam-se técnicas moleculares para sequenciar os genes da subunidade 18S do RNA ribossomal. Até o momento, cerca de vinte genótipos diferentes de *Acanthamoeba* foram descritos: T1–T12 (Stothard et al., 1998), T13 (Horn et al., 1999), T14 (Gast, 2001), T15 (Hewett et al., 2003), T16 (Corsaro, 2010), T17 (Nuprasert et al., 2010), T18 (Qvarnstrom et al., 2013), T19 (Magnet et al., 2014), e T20-21 (Corsaro et al., 2015; 2017). O genótipo T4 é o que apresenta maior prevalência no ambiente com espécies patogênicas causadoras de doenças neurológicas e oculares (Lorenzo-Morales et al., 2015; Omaña-Molina et al., 2016).

#### 3.4.1 Ceratite por *Acanthamoeba* spp. em humanos

A ceratite amebiana (CA) é uma infecção da córnea que pode levar à cegueira se não tratada a tempo. Os indivíduos mais atingidos são usuários de lentes de contato (LC) que não realizam uma correta limpeza e desinfecção de suas lentes e estojos de armazenamento. Mas existem relatos menos comuns de não usuários de LC que desenvolveram a doença (Lorenzo-Morales et al., 2015). Dentre os fatores de risco associados à doença estão o uso de soluções salinas e água para limpeza de LC e estojos e práticas de natação com o uso de LC (Fabres et al., 2018; Calixto et al., 2014). A porta de entrada do parasito ocorre devido à microtraumas, iniciando através da adesão ao epitélio corneano até a invasão que resulta na destruição progressiva dos tecidos da córnea (Trabelsi et al., 2012; Carrijo-Carvalho et al., 2017).

Os sinais clínicos mais comuns são lesões pseudodendríticas (comuns a outros tipos de ceratite), erosões epiteliais puntiformes e infiltrados estromais, perineurais ou em forma de anel (Qian et al., 2010; Carrijo-Carvalho et al., 2017) (Figura 6). Os sintomas mais frequentemente relatados por pacientes com CA são dor desproporcional aos achados clínicos, fotofobia, vermelhidão e sensação de

corpo estranho (Król-Turmińska e Olender, 2017).

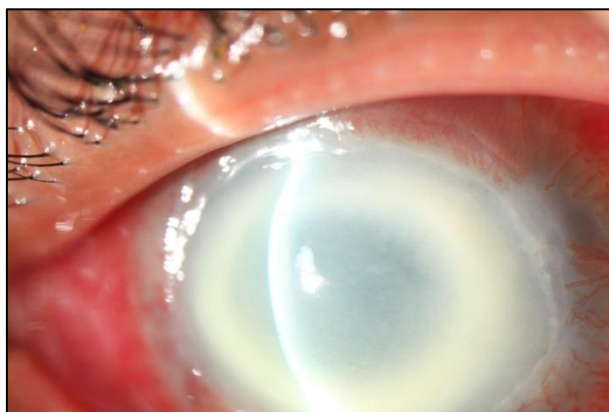


Figura 6: Vascularização da córnea e presença de infiltrado em anel em paciente com ceratite amebiana. Foto cedida pelo oftalmologista Sérgio Kwitko.

O diagnóstico clínico é feito primeiramente por um oftalmologista que ao suspeitar da doença indica a realização de um raspado de córnea para cultivo e isolamento em laboratório. O problema é a falta de suspeição que leva a um atraso no tratamento. Muitas vezes a CA é confundida com outro tipo de ceratite infecciosa causada pelo vírus herpes simples (Greenwell et al., 2013).

O tratamento é realizado através de uma combinação de colírios à base de biguanidas e diamidinas de hora em hora por meses, além de corticosteróides (Lorenzo-Morales et al., 2015). É um tratamento demorado e oneroso para o paciente, além de provocar em alguns casos toxicidade à córnea (Hajjalilo et al., 2015; Kashiwabuchi et al., 2011; Iovieno et al., 2010). A grande maioria acaba realizando transplante por não responder bem ao tratamento. Em alguns casos há recidiva da doença devido à capacidade do parasito encistar no sítio da infecção resistindo aos medicamentos utilizados (Lorenzo-Morales et al., 2015) por isso é importante monitorar o paciente após o fim do tratamento. O diagnóstico molecular também tem sido realizado para fins de pesquisa, para a definição do genótipo e quanto à presença de endossimbiontes que poderiam causar uma exacerbação da doença (Dos Santos et al., 2022; Maschio et al., 2015).

#### 3.4.2 Ceratite por *Acanthamoeba* spp. em animais

Apesar de existirem mais relatos de ceratite por *Acanthamoeba* spp. em humanos, nos últimos anos pesquisas têm mostrado que a doença também atinge

os animais. Muitos casos de ceratite foram reportados a gatos e cães, alguns imunocomprometidos como nos casos positivos de FIV (vírus da Imunodeficiência Felina) e da FeLV (leucemia felina) e que viviam nas ruas, outros que habitavam as casas e dividiam espaço com adultos e crianças (Montoya et al., 2018; Ithoi et al., 2013). A infecção geralmente ocorre devido a lesões na córnea, resultantes de combates, contato com pedras ou areia causando ferimentos acidentais e uso das patas para esfregar ou coçar os olhos (Ithoi et al., 2013).

Como nos casos humanos, o genótipo mais encontrado nas amostras dos animais é o T4, geralmente associado com ceratite amebiana (Montoya et al., 2018; Karakuş et al., 2016; Valladares et al., 2015).

Os sinais clínicos e sintomas também são os mesmos: vermelhidão, secreção, dor, fotofobia, inchaço, edema da córnea, visão prejudicada ou cegueira (Ithoi et al., 2013). No entanto, estudos de Karakuş e colaboradores (2016), revelaram que em 23 amostras positivas para *Acanthamoeba* em cães, não houve sinais de quadro clínico.

Nesse contexto existe a preocupação que animais infectados sejam disseminadores de *Acanthamoeba* spp, contaminando o ambiente e infectando o ser humano, e vice-versa. Os patógenos envolvidos podem ser bactérias, vírus ou parasitos, e podem se disseminar entre os humanos através do contato direto ou de alimentos, água e meio ambiente (OMS, 2020). As amebas de vida livre são consideradas predadoras, veículos de transmissão bacteriana ou “cavalos de Tróia” (Khan e Siddiqui, 2014).

*Acanthamoeba* spp. também podem causar ceratite em aves silvestres, comprometendo sua sobrevivência. Não existem muitos estudos de *Acanthamoeba* em aves, mas já foram isoladas de tecidos do fígado de um tucano-bico-de-quilha (*Ramphastos sulfuratus*) e de um faisão chamado tragopan de Temminck (*Tragopan temminckii*) que morreu de infecção amebiana (Visvesvara et al., 2007 e 2010). Karakavuk e colaboradores (2017) relataram os primeiros casos de ceratite por *Acanthamoeba* nos olhos de aves de rapina na Turquia. Dois isolados de amostras de aves: Gavião-pardal (*Accipiter nisus*) e Falcão-peregrino (*Falco peregrinus*) pertenciam ao genótipo T5 e uma de outro Falcão-peregrino era do genótipo T4. Essas aves predadoras podem se tornar alvos de outros animais selvagens por causa da perda da visão, devido à ceratite amebiana.

Os morcegos podem ser portadores de AVL. Devido à aglomeração em densas colônias durante anos, a transmissão de patógenos é certa entre esses animais. Já se sabe que eles são hospedeiros de vários vírus como Nipah, MERS-CoV e agora o SARS-CoV tornando os morcegos potenciais transmissores de doenças aos humanos (Gorbunova et al., 2020). Mulec e colaboradores (2016) apresentaram estudo da presença de microrganismos em morcegos que vivem em cavernas na Eslovênia. *Acanthamoeba* spp e *Naegleria clarki* foram isoladas de fezes de morcegos, o que causa preocupação devido ao fato das amebas serem vetores de microrganismos muitas vezes patogênicos.

### 3.4.3 EAG em humanos e animais

A encefalite amebiana granulomatosa (EAG), é uma infecção oportunista, acometendo indivíduos imunocomprometidos, principalmente em pacientes com HIV/AIDS ou doentes crônicos como os diabéticos (Visvesvara et al., 2007). Ela atinge o sistema nervoso central através da via hematogênica devido a lesões na pele ou via nasal (trato respiratório inferior) (Taravaud et al., 2021).

Os sintomas assemelham-se aos da meningite: dor de cabeça, rigidez do pescoço, náuseas, vômitos, febre baixa, letargia, ataxia cerebelar, distúrbios visuais, hemiparesia, convulsões, distúrbios mentais e até coma (Król-Turmińska et al., 2017). Na maioria das vezes a doença é confirmada apenas no “post-mortem”, onde as biópsias revelam trofozoítos e cistos, predominantemente nos espaços perivasculares do parênquima (Khan, 2006).

A maioria das espécies causadoras de EAG pertence ao genótipo T4, mas já foram relatados casos onde os genótipos T1, T2, T5, T10 e T12 foram encontrados (Nuprasert et al., 2010).

*Acanthamoeba* spp. também podem causar infecções do SNC de animais, entre eles: gorilas, macacos, cães, ovinos, bovinos, cavalos, cangurus, pássaros, répteis, anfíbios e peixes (Visvesvara et al., 2007).

Os fármacos mais utilizados para tratar a EAG são os azóis, pentamidinas ou sulfamidás e a rifampicina (Król-Turmińska et al., 2017).

### 3.5 Características gerais e etiologia de *Naegleria fowleri*

*Naegleria fowleri* é um patógeno pertencente ao grupo das AVL, causador da MAP em humanos e animais. Possui as formas de trofozoíto e cisto, como as espécies de *Acanthamoeba*, mas difere-se pelo fato de que na presença da água apresenta uma forma flagelada, permitindo que se movimente por longas distâncias à procura de alimento (Siddiqui et al., 2016) (Figura 7). O trofozoíto mede entre 10 a 25  $\mu\text{m}$  com um único núcleo e é a forma pela qual o parasito se alimenta, reproduz e se locomove. A forma flagelada possui dois flagelos na região anterior, podendo emitir de três ou quatro flagelos além desses. Seu comprimento varia de 10 a 16  $\mu\text{m}$  e por não possuir citóstoma, não se alimenta, precisando reverter para a forma de trofozoíto. Se as condições forem desfavoráveis irá se transformar em cisto que é a forma de resistência. O cisto mede cerca de 8-20  $\mu\text{m}$ , possuindo uma dupla camada de celulose (Visvesvara, 2010).

A proliferação de *N. fowleri* ocorre nos meses mais quentes do ano, tolerando temperaturas de até 45°C. Alimentam-se principalmente de bactérias presentes em água doce quente, piscinas aquecidas, aquários, esgotos, e até mesmo de fossas nasais e gargantas de pessoas saudáveis (Visvesvara, 2010; Jahangeer et al., 2020).

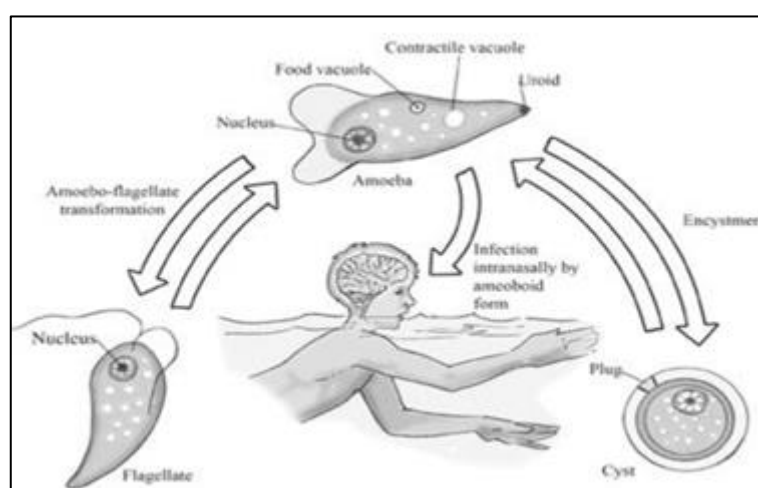


Figura 7: Ciclo de infecção por *N. fowleri*. Imagem: <http://clem.mscedu>

### 3.5.1 MAP em humanos

A MAP é uma doença aguda e altamente letal, com um curso rápido de três a sete dias. Ela ocorre através do contato com a água contendo os parasitos. Eles atingem os hospedeiros entrando pela via nasal, alcançando o neuroepitélio olfativo, instalando-se no sistema nervoso central (Siddiqui et al., 2016). Crianças e adolescentes, principalmente do sexo masculino são os mais atingidos, talvez pelo fato de praticarem mais esportes aquáticos e atividades recreativas (Visvesvara, 2010).

Essa doença também tem sido associada à prática de ablução entre os praticantes da religião islâmica, que consiste na limpeza da boca, rosto, nariz, orelhas, braços e pés ou do uso de lota (recipiente para higienização nasal), muito utilizada pelos adeptos da medicina Ayurvédica (Siddiqui e Khan, 2014).

Os sintomas de MAP incluem dor de cabeça severa, rigidez do pescoço e febre abrupta e alta (38,5 ° C - 41 ° C), fotofobia, náuseas, vômitos, alteração do estado mental, alucinações, convulsões, coma e morte (Yoder et al., 2010).

Nos EUA já foram reportados 151 casos de MAP em humanos (Yoder et al., 2010), com apenas 5 sobreviventes (Figura 8). Geralmente os locais onde foram detectados casos de MAP, são monitorados pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e ações de controle são realizadas, com informações à população.

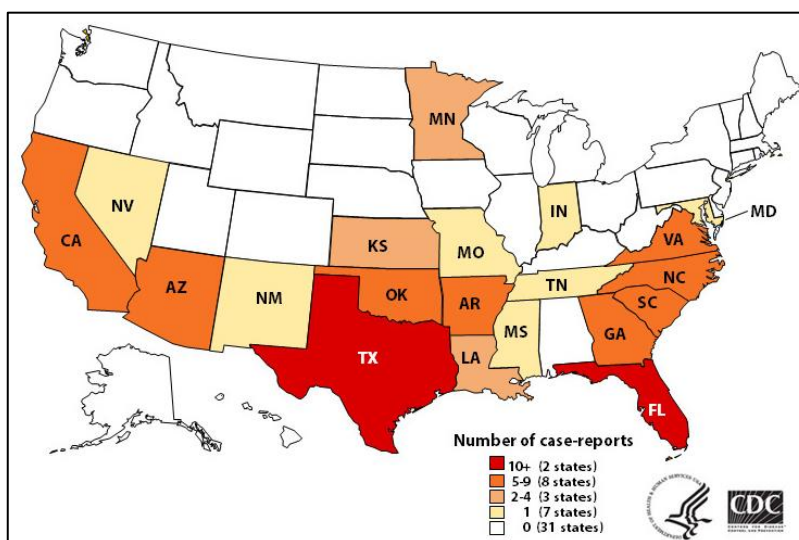


Figura 8: Mapa de casos de MAP nos EUA (CDC, 2020).

No Brasil foram relatados apenas cinco casos de MAP sendo dois em São Paulo (Foronda, 1976; Campos et al., 1977), dois no Ceará (Biasoli et al., 1981), um no Rio de Janeiro (Carvalho et al., 1983). Este último caso identificou *N. fowleri* em tecido cerebral através de métodos imunológicos (Salazar et al., 1983).

Devido à alta letalidade estudos têm sido realizados com a pesquisa de vários fármacos. Na maioria dos casos a droga de escolha tem sido a anfotericina B, que devido a sua toxicidade, tem sido associada à rifampicina, utilizada nos sobreviventes da doença (Jahangeer et al., 2020). A miltefosine, uma droga anti-leishmania, também já foi usada em dois pacientes que sobreviveram à MAP (Cooper et al., 2019).

### 3.5.2 MAP em animais

A MAP também acomete os animais. Ao redor do mundo existem relatos da doença em ovelhas, bovinos e tapir e no Brasil até o momento há três relatos de casos entre bovinos: um na região Nordeste e os outros dois no Sul do País, em diferentes fazendas no município de Glorinha, Rio Grande do Sul. Características gerais de cada caso encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Características de casos de MAP em animais

Animais afetados e mortos por MAP	Idade/Sexo/País/Ano	Local	Sintomas	Referências
Tapir	6 anos/macho EUA/1997	Água contaminada	Tosse seca, diminuição do apetite, letargia, febre, nistagmo horizontal, decúbito lateral.	Lozano-Alarcón et al., 1997
Bovino	EUA/1999	Água superficial não tratada	Anorexia, depressão, paralisia facial, ataxia, fraqueza, convulsões, decúbito lateral	Daft et al., 2005
Bovino	Costa Rica/2003		Anorexia, ataxia, paralisia	Morales et al., 2006

Tabela 1 - Características de casos de MAP em animais (continuação)

Bovino	1 ano Brasil/2009	Transmissões sazonais	Ataxia, decúbito lateral com movimentos de remada	Pimentel et al., 2012
Bovino e ovelha	4,5 anos e 5 anos/ fêmeas Argélia/2016	Água de poço	Febre, anorexia, distúrbios neurológicos	Benterki et al., 2016
Rinoceronte negro	20 anos EUA/2016	Pântano	Letargia, ataxia, falta de apetite, febre.	Yaw et al., 2019
Bovino	4 anos/ fêmeas Brasil/2017 e 2019	Áreas de pastagem inundadas (capim arroz)/ corpos d'água superficiais	Anorexia, ataxia, movimentos de remada, decúbito lateral, nistagmo horizontal	Henker et al., 2019; Henker et al., 2021

### 3.6 Mudanças climáticas e AVL

As mudanças climáticas atuam diretamente no ecossistema, mudando o ciclo de vida de patógenos, vetores e reservatórios, além de suscitar doenças emergentes em plantas, animais e o ser humano (Essack, 2018). Segundo Liang e Gong (2017) o termo “Mudança climática” está relacionado ao clima (temperatura, precipitação, vento, etc.) e pode durar décadas ou mais, enquanto o aquecimento global se refere apenas ao aumento da temperatura da superfície da Terra (Kennedy e Lindsey, 2015).

A partir da era pré-industrial (1880-1900), a temperatura média da superfície global vem aumentando. Isso já foi suficiente para reduzir a cobertura de gelo marinho e neve, intensificar as chuvas e aumentar ou diminuir habitats de plantas e animais (Lindsey e Dahlman, 2021). A América do Sul, em 2020, registrou o segundo ano mais quente em 111 anos, ficando atrás de 2015, segundo o Relatório Global do Clima do National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). Segundo o Acordo de Paris, realizado durante a Conference of the Parties (COP21) e firmado em 2015, seria necessário conter as emissões de gás carbônico para tentar manter o aquecimento a menos de 2°C até o fim do século, para a manutenção da vida humana e de outras espécies neste



planeta. Já o relatório do Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), fala em diminuir até 1,5°C, já que a temperatura para o ano de 2020 bateu em 1,28°C (UN, 2021).

A emissão de gases poluentes na atmosfera, através das indústrias e uso de combustíveis fósseis tem contribuído para a elevação da temperatura na Terra. A floresta Amazônica tem papel fundamental na regulação do clima e o constante desmatamento na região é uma grande preocupação mundial. A disseminação de infecções humanas e animais é uma consequência do aquecimento global e da ação antrópica do homem (Ellwanger et al., 2020). Estudos de Woolway e Maberly (2020) mostram que o efeito estufa tem impulsionado a velocidade de aquecimento da água dos lagos, impactando o habitat de espécies lacustres. Nos oceanos, essas mudanças podem atingir o sistema de correntes, impactando significativamente o ecossistema marinho (Campos, 2014). Os casos de MAP ocorrem principalmente em regiões mais quentes, mas recentemente houve casos em Minnesota e Pensilvânia nos EUA, suscitando preocupação por estarem ocorrendo mais ao norte do País, devido às mudanças climáticas (Maciver et al., 2020).

Algas e cianobactérias planctônicas são a principal fonte de alimento para muitos seres vivos e atuam como um indicador de mudanças ambientais (Andrade e Giroldo, 2014). As cianobactérias (algas azuis) se associam em simbiose com amebas, diatomáceas, algas flageladas, plantas e alguns fungos. O uso de fertilizantes químicos na agricultura aumenta a quantidade de nitrogênio e fósforo nos corpos aquáticos, causando a eutrofização e conseqüentemente a proliferação desses organismos (Siqueira e Oliveira-Filho, 2005). No Lago Guaíba, em Porto Alegre, RS, as cianobactérias afloram muito nos meses de verão devido ao aumento da temperatura (Ribeiro et al., 2012). Essas bactérias servem de alimento para *N. fowleri*. Não há um levantamento da presença do parasito nas águas do Guaíba, devido ao fato de não existirem relatos de MAP, mas como essa doença é confundida com uma meningite, pode existir uma subnotificação.

A perda de biodiversidade e fragmentação do habitat causadas pelo desmatamento, além do contato humano com áreas florestais criam um cenário ideal para a disseminação de microrganismos, favorecendo o surgimento de doenças. Florestas tropicais como a Amazônica abrigam uma grande diversidade

de patógenos desconhecidos (Ellwanger et al., 2020). As amebas de vida livre, dentre elas *Acanthamoeba* spp. podem ser disseminadores dessas doenças, representando um problema de saúde pública, não só de doenças na comunidade como nosocomiais (Bullé et al., 2020). Além dos animais já mencionados nesse trabalho, há o relato de que chimpanzés que vivem isolados em parques nacionais na Guiné Bissau e Costa do Marfim contraíram lepra sem ter contato com o ser humano. Uma das hipóteses é a de que o *Mycobacterium leprae* foi carregado por *Acanthamoeba* spp.

Outro problema grave é a questão da resistência a antimicrobianos. Os resíduos dos antibióticos utilizados em pessoas e pelo agronegócio são lançados no meio ambiente, contribuindo para a resistência dos microrganismos a esses compostos. Há relatos da detecção de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em humanos e macacos selvagens que vivem em uma mesma região no Nepal (Soares, 2020). Estudos de Chomicz et al. (2015) demonstraram que cinco casos de ceratite por *Acanthamoeba* spp. apresentaram resistência às medicações utilizadas. Três amostras possuíam endossimbiontes internalizados: *Candida* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Entamoeba faecalis*. Além disso, *Fusarium solani* é um fungo de solo que comumente ataca raízes de plantas. Esse fungo resistente a tratamentos devido à exposição a defensivos agrícolas, interage com *Acanthamoeba* spp., causando ceratite severa (Nunes et al., 2016; Lee et al., 2010; Sansanayudh et al., 2008).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de desenvolvimento do trabalho

As pesquisas foram realizadas no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas e da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e também de forma remota devido à Pandemia de Covid-19 (Portarias: 2.286/20, 2.291/20 e 5.363/21), através de pesquisas sobre casos de ceratites, EAG e MAP em humanos e animais e o ambiente que os cercam.

### 4.2 Exames de diagnóstico de doenças causadas por AVL

Os exames diagnósticos foram realizados a partir da demanda de casos de ceratite e encefalites ocorridas durante o doutorado. As amostras foram recebidas e identificadas e o cultivo e isolamento realizados. Foram pesquisados trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* spp. e realizado diagnóstico molecular, também para uma amostra de encefalite bovina. Após a confirmação da visualização das estruturas, um laudo foi enviado ao médico solicitante com o resultado.

### 4.3 Amostras utilizadas

Foram utilizadas para o estudo isolados clínicos de *Acanthamoeba* spp., originários da raspagem de córnea de pacientes com ceratite amebiana do serviço de oftalmologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS (HCPA), e um isolado do bulbo olfativo oriundo de cérebro de um bovino com suspeita de MAP.

### 4.4 Isolamento e cultivo e de *Acanthamoeba* spp.

As amostras dos pacientes com suspeita de CA foram coletadas no HCPA, armazenadas em solução salina e enviadas ao Laboratório de Protozoologia da UFRGS, onde foi realizado o cultivo monoxênico (placa com ANN, *E.coli* e *Acanthamoeba* spp). Após a observação das placas e o diagnóstico positivo sugestivo de *Acanthamoeba* através da visualização dos trofozoítos,

iniciou-se o cultivo axênico, em meio PYG (2% proteose peptona, 0,2% de extrato de levedo e 1,8% de glicose), à temperatura de 30°C para posterior extração de DNA.

#### 4.5 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

As amostras obtidas a partir de casos clínicos (tanto humanos quanto animais), cujo material biológico foi encaminhado ao Laboratório de Protozoologia para diagnóstico, foram preparadas para a extração de DNA. A extração e purificação do DNA de cada amostra foram realizadas utilizando o Kit Spin 50® (Kasvi) de acordo com as informações do fabricante. Os primers específicos JDP1 (5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3') e JDP2 (5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA-3') para amplificação de uma região do gene 18S rDNA de *Acanthamoeba* spp. (Schroeder et al., 2001); ITS1 (5'-GAACCTGCGTAGGGATCATTT-3') e ITS2 (5'-TTTCTTTTCCTCCCCTTATTA-3') e ITS2 para amplificação do gene 5.8S rRNA de *Naegleria* spp. (Pelandákis, et al., 2000); e FD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e RP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') para a identificação de microrganismos resistentes a amebas (MRAs) que amplificam o gene 16S rDNA do Domínio Bactéria foram utilizados (Weisburg et al., 1991). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 10 pmol de cada primer, 2,5 mM de dNTPs, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL de tampão 10 X e 1 U de Taq polimerase (Ludwig Biotec®). Os parâmetros de ciclagem de PCR foram definidos da seguinte forma: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, depois 94 °C por 45 s, 60 °C por 40 s e 72 °C por 1 min e 15 s, e uma extensão final em 72°C durante 5 min para o gene 18S rDNA; 94 °C por 5 min, depois 94 °C por 45 s, 56 °C por 40 s e 72 °C por 1 min e 15 s e uma extensão final a 72 °C por 5 min para 16S rDNA e desnaturação inicial a 94 °C por 5 min seguido por 30 ciclos em 94°C por 45 s, 55°C por 40 s e 72°C por 1 min e 15 s, e uma extensão final a 72°C por 5 min para 5.8 S rRNA.

A eletroforese dos amplicons foi realizada em gel de agarose 1,2% e os produtos de PCR foram sequenciados diretamente pelo método de Sanger utilizando um sequenciador ABI Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os primers usados para sequenciamento foram os mesmos usados

para reação de PCR, mas, nesta fase, foram testados separadamente para cada reação (apenas o primer forward ou o primer reverso) usando 4,5 pmol de cada primer por reação de sequenciamento em um volume final de 60 ng. As sequências nucleotídicas geradas foram depositadas no banco de dados do Genbank e submetidas à análise de homologia utilizando o programa NCBI BLAST e alinhadas usando Clustal W 2.1 (Kumar et al., 2018).

#### 4.6 Sal imidazólico

Foi utilizado o sal imidazólio cloreto de 1-n-hexadecil-3-metilimidazólio ( $C_{16}MImCl$ ) que foi sintetizado no Instituto de Química da UFRGS em colaboração com o Prof. Dr. Henri. S. Schrekker.

#### 4.7 Avaliação da atividade amebicida

A atividade amebicida do sal imidazólio sobre os trofozoítos e cistos foi realizada através de diluição seriada. Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos foram determinados para os isolados em placas de 96 poços utilizando a concentração de  $10^4$  trofozoítos/cistos/mL. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 e 48 horas. Foram realizadas triplicatas, com três repetições. Os trofozoítos/cistos foram contados utilizando uma câmara de Fuchs-Rosenthal e a viabilidade verificada utilizando corante de exclusão azul de tripan (0,4%). A clorexidina (0,02%) e os trofozoítos/cistos não tratados foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento amebiano visível. Tanto para trofozoítos quanto para cistos, após a avaliação amebicida, estes foram colocados em placa com 1,5 % de ágar não nutriente (ANN) com uma camada de *Escherichia coli* inativada pelo calor para ser acompanhada por sete dias e confirmar a viabilidade, utilizando-se uma concentração anterior e outra posterior a CIM.

#### 4.8 Manutenção e coleção de amebas em laboratório

Vinte placas de cultura monoxênicas já desidratadas (2019 a 2021) foram separadas para possível recuperação (dez de origem clínica e dez de origem ambiental). Um volume de 5 mL de tampão salino tamponado com fosfato (PBS 1x) foi adicionado às 20 placas. As placas foram colocadas em um agitador de placas KLINE por 10 minutos a 10% de velocidade. Logo após, o líquido de cada placa foi retirado e colocado em tubos para centrifugação (1800 rpm por 10 minutos). Após a centrifugação, uma alíquota (500 µl) de líquido de cada tubo foi inoculada em placas com ágar não nutriente 1,5% de ANN contendo uma camada de *Escherichia coli* (ATCC 25922) inativada pelo calor (por 2 h a 56°C) para novo cultivo monoxênico. O experimento foi realizado em triplicata, resultando em um total de 60 placas (30 clínicas e 30 ambientais) que foram seladas com Parafilm® (SPI Supplies, West Chester, PA), incubadas a 37°C e monitoradas por um período de 15 dias para visualização em microscópio óptico para busca de trofozoítos e/ou cistos de *Acanthamoeba* spp. As placas foram novamente incubadas para desidratar.

Após essa fase, mais cinquenta placas foram inoculadas: 26 (ANN com *E. coli*) receberam recortes de ágar, sendo 22 clínicas e quatro ambientais, 20 (ANN, 10 com *E. coli* e 10 sem *E. coli*) receberam alíquota (150 µl em cada placa) de amostras axênicas de origem clínica; e quatro placas (ANN com *E. coli*) receberam repiques de placas monoxênicas de origem ambiental. As placas foram seladas com Parafilm®, incubadas a 30°C e trofozoítos e cistos visualizados em microscópio óptico após 48 h. O Parafilm® foi retirado e essas placas foram deixadas na estufa até a desidratação. Seus recortes foram armazenados em coleção.

## 5. ARTIGOS

### 5.1Capítulo I

“*Naegleria fowleri*-associated meningoencephalitis in a cow in southern Brazil- First molecular detection of *N. fowleri* in Brazil.” de autoria de Hencker LC, Lorenzetti MP, Santos DL, Virginio VG, Driemeier D, Rott MB, Pavarini SP., publicado no periódico *Parasitology Research*, em junho de 2021. doi: 10.1007/s00436-021-07209-5.

### 5.2 Capítulo II

“Clinical and molecular diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis in contact lens wearers in southern Brazil reveals the presence of an endosymbiont.” de autoria de Santos DL, Virginio VG, Berté FK, Lorenzatto KR, Marinho DR, Kwitko S, Locatelli Cl, Freitas EC, Rott MB., publicado no periódico *Parasitology Research*, em maio de 2022. DOI: 10.1007/s00436-022-07474-y.

### 5.3. Capítulo III:

“Prevalence of free-living amoebae in swimming pools and recreational waters, a systematic review and meta-analysis” de autoria de Chaúque BJM, Santos DL, Anvari D, Rott MB publicado no periódico *Parasitology Research*, em agosto de 2022. DOI: 10.1007/s00436-022-07631-3.

### 5.4. Capítulo IV

“Abordagem da saúde única no diagnóstico de doenças causadas por *Acanthamoeba* spp. e *Naegleria fowleri* em humanos e animais” de autoria de Santos DL, Virginio VG, Marinho DR, Kwitko S, Rott MB publicado no periódico *Archives of Health*, em março de 2022. ISSN: 2675-4711.

### 5.5Capítulo V

"Occurrence of *Naegleria fowleri* and their implication for health - a look under the One Health approach” de autoria de Santos DL, Chaúque BJM, Virginio

VG, Cossa VC, Pettan-Brewer C, Schrekker HS, Rott MB, publicado no periódico International Journal of Hygiene and Environmental Health em outubro de 2022. DOI: 10.1016/j.ijheh.2022.114053.

## 5.6. Capítulo VI

“Imidazolium salt inactivates trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* spp. from patients with keratitis - a promising disinfectant for contact lenses and surfaces” de autoria de Santos DL, Chaúque BJM, Berté FK, Demétrio da Silva V, Marinho DR, Kwitko S, Locatelli CI, Ziulkoski AL, Schrekker HS, Rott MB, submetido ao periódico AAPS PHARMSCITECH em setembro de 2022. As orientações para a submissão seguem em arquivo separado (Anexo III). O material suplementar encontra-se no Apêndice I.

### **Imidazolium salt inactivates trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* spp. from patients with keratitis - a promising disinfectant for contact lenses and surfaces**

Denise Leal dos Santos<sup>a</sup>, Beni Jequicene Mussengue Chaúque<sup>a,b</sup>, Francisco Kercher Berté<sup>a</sup>, Vinícius Demétrio da Silva<sup>c</sup>, Amanda Schmeling Franceschi<sup>e</sup>, Diane Ruschel Marinho<sup>d</sup>, Sergio Kwitko<sup>d</sup>, Claudete Inês Locatelli<sup>d</sup>, Eduarda Correa Freitas<sup>d</sup>, Ana Luiza Ziulkoski<sup>e</sup>, Henri Stephan Schrekker<sup>c</sup>, Marilise Brittes Rott<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Setor de Protozoologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e



Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, Centro Histórico, 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Science, Technology, Engineering and Mathematics, Universidade Rovuma, Niassa Branch, Mozambique.

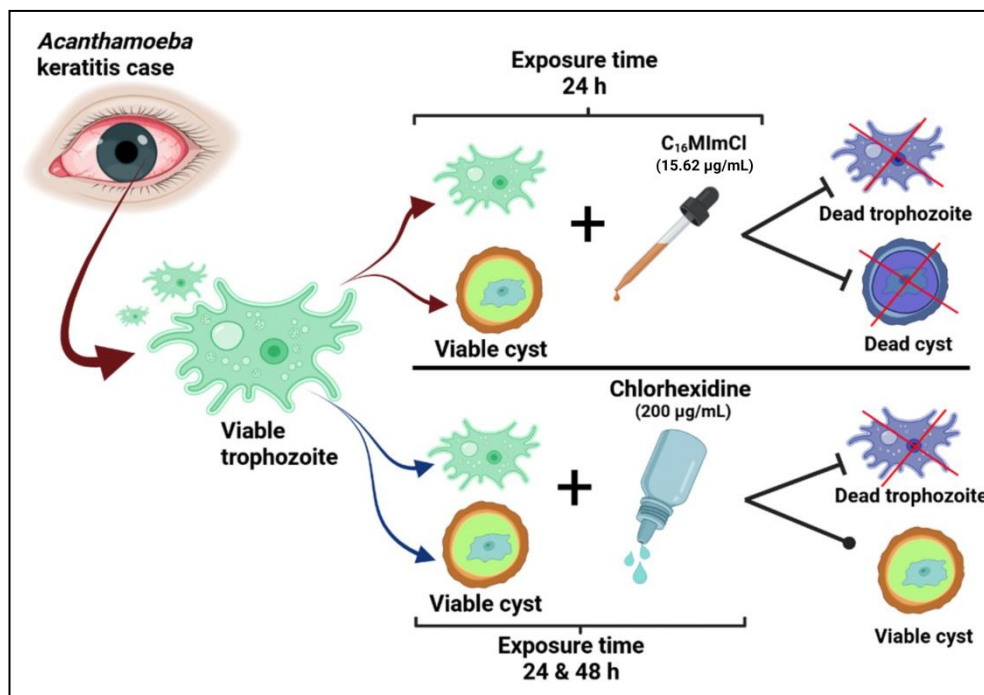
<sup>c</sup>Laboratory of Technological Processes and Catalysis, Institute of Chemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil.

<sup>d</sup> Departamento de Córnea, Serviço de Oftalmologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90035-903, Brazil.

<sup>e</sup>Laboratório de Citotoxicidade, Instituto de Ciências da Saúde, Campus II, Universidade Feevale/RS.

Corresponding author: Marilise Brittes Rott\*

Mailing address MBR: Laboratory 311, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Department of Parasitology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmento Leite Street, N 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90050-170, Brazil. Tel: +55 51 3308 4537 and +55 51 999530060. E-mail: [marilise.rott@ufrgs.br](mailto:marilise.rott@ufrgs.br)



**Graphical Abstract**

## ABSTRACT

Keratitis caused by *Acanthamoeba* spp. is a rare disease, although increasingly common, especially among contact lens wearers. The occurrence and devastating effect of this disease are associated with the lack of care in cleaning and disinfecting lenses and storage cases, as well as ineffective drugs to mainly eliminate the parasite's cysts. This work evaluated the amoebicidal activity of the imidazolium salt 1-*n*-hexadecyl-3-methylimidazolium chloride ( $C_{16}MImCl$ ) against trophozoites and cysts of two characterized isolates (HCPA 2 and HCPA 4) from keratitis cases caused by *Acanthamoeba* spp. The concentrations and exposure time for 100% of inactivation of trophozoites were respectively: 15.62  $\mu g/mL$  (24 h) and 7.81  $\mu g/mL$  (48 h) for the HCPA 2 and 7.81  $\mu g/mL$  (24/48 h) for the HCPA 4. The inactivation of 100% of the cysts was achieved at a concentration of 7.81  $\mu g/mL$  for the HCPA 2

and of 1.95 µg/mL for the HCPA 4, both 24 and 48 h. Low concentrations of C<sub>16</sub>MImCl were as effective as high concentrations of chlorhexidine against trophozoites. The same salt concentrations eliminated 100% of the cysts, however, the commercial formulation of chlorhexidine did not trigger any reduction in the viability of the cysts. Related to the cytotoxicity to mammalian cells, C<sub>16</sub>MImCl was not cytotoxic to HaCaT cells, but it was cytotoxic to NIH-3T3 and SH-SY5Y cells. Our study reveals the inactivation of trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* spp. from patients with keratitis through of imidazolium salt C<sub>16</sub>MImCl which proved to be a promising disinfectant for contact lenses and surfaces.

**Keywords:** 1-*n*-Hexadecyl-3-methylimidazolium chloride, *Acanthamoeba* keratitis, cysts, chlorhexidine, cytotoxicity.

## Introduction

Free-living amoebae (FLA) are ubiquitous organisms, widely dispersed in the environment, and can be found in soils, cooling towers, rivers, lakes, sewers, swimming pools, and other water sources as well as in the air (1). Among the FLA, *Acanthamoeba* spp. stands out for its great prevalence in the environment. The genus *Acanthamoeba* has two forms of life: the trophozoite, which is the vegetative form and the cystic one, the latter being the form of resistance of the microorganism in the environment (2). These microorganisms are considered pathogens because they can cause disease in a healthy individual, or opportunistic, when they reach immunocompromised individuals (3). *Acanthamoeba* spp, can cause Granulomatous Amebic Encephalitis (GAE) leading to very serious neurologic problems and Amoebic Keratitis (AK), which can culminate in blindness (4,5). *Acanthamoeba* spp. are

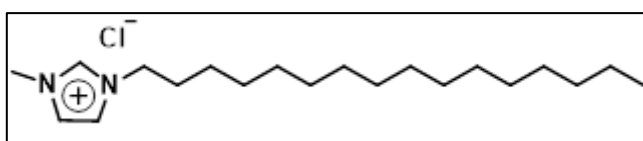
excellent predators and are considered the Trojan horse of the microbial world, being therefore involved in the dispersion and persistence of microorganisms in the environment and in living beings (6,7,8). This parasite can encompass microorganisms such as bacteria, fungi, viruses and other protozoa that resist phagocytosis and live internalized. It was reported that some bacteria may increase their pathogenicity by coming into contact with the amoeba (9,10,11).

Many cases of AK have been described primarily due to increased use of contact lenses (CL). Frequent reports reveal that CL users who contracted the disease had a history of recreation or diving in aquatic environments while using their CL, in addition to the lack of disinfection and maintenance of both lenses and storage cases (12). It is important to note that there are no completely effective CL cleaning and preserving solutions against *Acanthamoeba*. This disease is aggravated by the possibility of the parasite producing cysts, hindering the action of cleaning and disinfecting products for storage cases and CL, as well as the solutions used for the treatment (13,4). Therefore, it is necessary to search for new drugs that can combat the cysts. There is an effort to prospect for drugs of biological and chemical origin that show activities against protozoa (14,15,16). A promising class of compounds for the development of new drugs are the Imidazolium Salts (IS).

These IS are organic compounds made up of an imidazolium-based cation and an (in) organic anion. Among IS, those that are molten state at below 100°C are classified as ionic liquids (17, 18). The IS have very versatile physicochemical properties, including negligible volatility, non-flammable, high thermal and chemical stability, electrical conductivity and ability to dissolve organic and inorganic compounds (18). Several biological activities of IS have been reported: antibacterial, anti-inflammatory, anti-yeast, antifungal and antiparasitic (19,20,21, 22). IS were

recently tested for the first time in *Acanthamoeba* spp. trophozoites with excellent results (14).

The present study evaluated the amoebicidal activity of the IS (1-*n*-hexadecyl-3-methylimidazolium chloride) C<sub>16</sub>MImCl, figure 1, against *Acanthamoeba* spp. to prospect products effective against trophozoites and especially against cysts. The amoebicidal effect was tested against trophozoites and cysts of HCPA 2 and HCPA 4 isolates obtained from the corneal scraping of patients with AK, already characterized and deposited in Genbank (23). The HCPA 4 isolate has an endosymbiont called *Candidatus Paracaedibacter acanthamoebae*.



**Fig. 1:** Chemical structure of 1-*n*-hexadecyl-3-methylimidazolium chloride (C<sub>16</sub>MImCl)

## Materials and Methods

### Preparation of the imidazolium salt

C<sub>16</sub>MImCl was prepared as previously described in the literature (24, 25) using the following adapted method: 1-chlorohexadecane (39.79 mmol) was added to 1-methylimidazole (39.79 mol) in a 50 mL round-bottom flask, mixed at 90°C for 24 h, and then cooled to room temperature. The product was further purified by recrystallization in tetrahydrofuran (THF). After being washed three times with THF and two times with diethyl ether, the white crystalline powder was collected by filtration and dried at room temperature in a vacuum oven. The spectral data were in

accordance with those reported (see the  $^1\text{H}$  NMR spectrum in the supplementary information, figure S1). Before use the IS was diluted in MiliQ<sup>®</sup> water to the desired concentration.

### **Trophozoites culture**

Trophozoites of *Acanthamoeba* spp. from the AK (HCPA 2 e HCPA 4) were isolated and cultivated in PYG medium (2% proteose peptone, 0.2% yeast extract and 1.8% glucose), supplemented with antibiotics (penicillin 100 U/mL and streptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and incubated at temperature of 30 °C. For the experiments, 1 mL of each culture was centrifuged for 5 min at 2.500 rpm. The supernatant was discarded and the precipitate washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and then diluted in PYG medium to obtain a final concentration of  $10^4$  cells/mL (26).

### **Cysts culture**

The trophozoites of the isolates were placed in contact with a Neff encystment solution (0.1 M KCl, 0.02 M Trisamine, 8 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.4 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) supplemented with antibiotics (penicillin 100 U/mL and streptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and incubated from 48 to 72 h at 30 °C. Dilution was performed in encystment solution to obtain a final concentration of  $10^4$  cells/mL(26).

### **Assessment of amoebicidal activity**

The amoebicidal activity of the IS on trophozoites and cysts was

performed by serial dilution (100  $\mu$ L of Milli-Q® water and 100  $\mu$ L of IS) and the final concentrations tested were: 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.91, 1.95, 0.97 and 0.49  $\mu$ g/mL. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of the compounds were determined using the concentration of  $10^4$  trophozoites/cysts/mL in 96-well plates (100  $\mu$ L). The plates were sealed and incubated at 30 °C for 24 and 48 h. These were performed in triplicate and with three repetitions. Trophozoites/cysts were counted using a Fuchs-Rosenthal chamber and viability was checked using trypan blue exclusion dye (0.4%). Chlorhexidine (0.02%) and untreated trophozoites/cysts were used as positive and negative controls, respectively. MIC values were defined as the lowest concentration of compound capable of inhibiting visible amoebic viability. The cysts, after the amoebicidal evaluation, were plated on non-nutrient agar (NNA) with a layer of heat-inactivated *Escherichia coli* to be monitored for 7 days and to confirm viability, using a concentration below and above the MIC (14).

### **Cells culture**

The cell line 3T3 (embryo fibroblasts from mice NIH-3T3), SH-SY5Y (derived from a human neuroblastoma) and HaCaT (human keratinocytes cells) were originally obtained from Cell Bank of Rio de Janeiro (BCRJ/Brazil). The 3T3 and HaCaT cells were cultivated in Dubelco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma®) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab®). The SH-SY5Y cells were cultivated in DMEM Low+Ham F12 (1:1, v/v) medium supplemented with 10% FBS. The cultures were kept in a semi-open system (standard condition) under a humid atmosphere 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, using the trypsinization process for their

maintenance. For the assays, 100.000 cells/well of SH-SY5Y and 15.000 cells/well of 3T3 or HaCaT were plated on 96-well polystyrene microplates and kept under usual conditions until reaching sub confluence (27).

### **Cytotoxicity in 3T3, SH-SY5Y and HaCaT cells**

For exposure to the compounds, the cell culture medium was exchanged for media containing 1% FBS C<sub>16</sub>MImCl at concentrations of 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100µM, in quadruplicates, and maintained on display for 24 and 96 h. As negative control, cultures kept in culture medium with 1% SFB were used, and as positive control cultures incubated with 1% hydrogen peroxide (Synth®) for 60 min were used.

Cytotoxicity was evaluated at the end of the incubation period through the reduction of 3-(4.5-dimethylthiazol-2-yl)-2.5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) that determines mitochondrial functionality; and Neutral Red Uptake (NRU), used to assess lysosomal viability. Briefly, in the MTT assay, the cells were washed with buffered saline solution without Calcium and Magnesium Free (CMF), culture medium containing 200 µg/mL of MTT was added and the cultures were kept in an incubator for 2 h (28). After discarding this medium, the formazan crystals were dissolved with DMSO (Nuclear®), followed by reading in a microplate spectrophotometer (Spectramax M3, Molecular Devices®) at 570nm. For the NRU assay, after washing with CMF, medium containing 50 µg/mL of NRU was added and incubated for 3 h. After washings with CMF and fixation with 1% CaCl<sub>2</sub> solution in 0.5% formaldehyde, the incorporated NR was eluted with 1% acetic acid in 50% ethanol, followed by reading at 540nm (29).



## Data analysis

Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. Two-tailed paired t-test, as well as analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test were used to assess the significance of the difference in the data. The Kruskal-Wallis test was used in cases of non-normal data distribution. A value of  $p < 0.05$  was considered significant. The BioEstat 5.0 software was used to perform the analyzes and the GraphPad prism 8.02 program to plot the graphs.

The selectivity index (SI) of the IS was calculated as the ratio of cytotoxicity to biological activity ( $SI = CC_{50} \text{ cells}/IC_{50} \text{ trophozoites}$ ). The  $CC_{50}$  was estimated by minimum squares method and  $IC_{50}$  corresponds to the dose capable of killing 50% of the parasites.

## Results

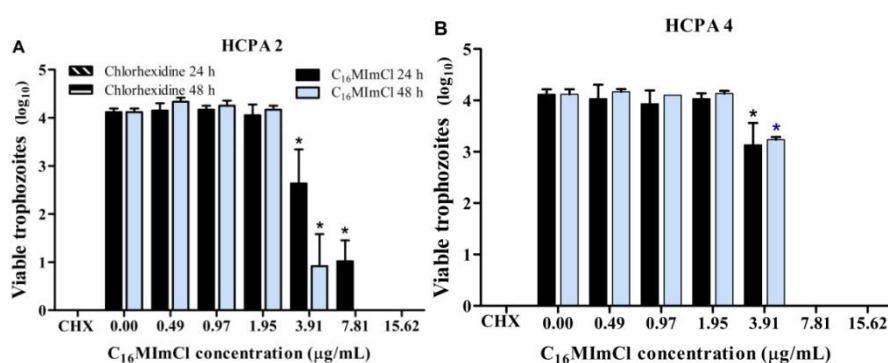
### Assessment of amoebicidal activity against trophozoites

MIC values for  $C_{16}MImCl$  were determined against *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. The reduction in trophozoite viability began to be observed from the concentration of  $3.91 \mu\text{g/mL}$  for the different amoebae tested for both 24 and 48 h of exposure. Complete inactivation of trophozoites was observed at the following concentrations:  $15.62 \mu\text{g/mL}$  (24 h) and  $7.81 \mu\text{g/mL}$  (48 h) for the HCPA 2 isolate (figure 2A); and  $7.81 \mu\text{g/mL}$  (24 h/48 h) for the HCPA 4 isolate (figure 2B). The use of chlorhexidine at  $200 \mu\text{g/mL}$  as positive control showed total inactivation of trophozoites after 24 h of exposure for all tested amoebae.

All tested microorganisms, exposed to different concentrations of the IS

C<sub>16</sub>MImCl presented non-statistically different trophozoite inactivation profiles ( $p < 0.05$ ) between the 24 and 48 h exposure times. As consequence, only the data referring to 24 h of exposure were used for comparison purposes (see in the supplementary information, figure S2).

At the concentration of 3.91  $\mu\text{g/mL}$ , there was a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in trophozoite viability for all amoebae tested (HCPA 2 and HCPA 4). Inactivation profiles (considering the joint variation at all concentrations) of trophozoites from different amoebae by C<sub>16</sub>MImCl were not significantly different ( $p < 0.05$ ) (see in the supplementary information, figure S2).

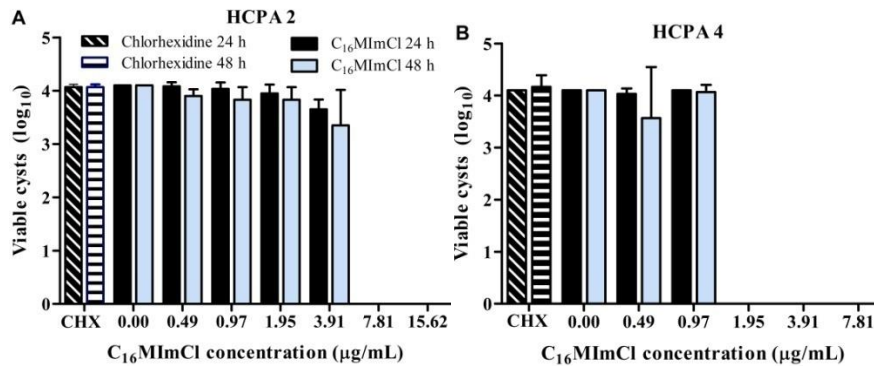


**Fig. 2:** Trophozoite inactivation profile of HCPA 2 (A) and HCPA 4 (B) isolates exposed to C<sub>16</sub>MImCl for 24h and 48h. \* = significantly differs from the respective positive control. Names followed by the same letter do not differ significantly from each other ( $p < 0.05$ ).

### Assessment of amebicidal activity against cysts

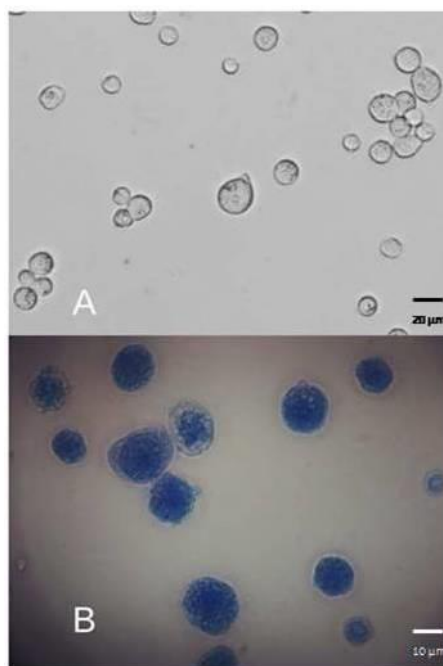
Total reduction in cyst viability was obtained from a concentration of 7.81 and 1.95  $\mu\text{g/mL}$  of C<sub>16</sub>MImC at all exposure times (24 and 48 h) for HCPA 2 and HCPA 4, respectively (figure 3 A and B). The mean values of cysts that remained viable at concentrations below 7.81 and 1.95  $\mu\text{g/mL}$  of C<sub>16</sub>MImC (figure 4 A) for HCPA 2 and HCPA 4, respectively, did not differ significantly from the corresponding

controls, either for 24 h or for 48 h of exposure time ( $p < 0.05$ ). In contrast, no reduction in cyst viability was observed when the cysts were exposed to chlorhexidine (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 and 48 h.



**Fig. 3:** Cyst inactivation profile of HCPA 2 (A) and HCPA 4 (B) isolates exposed to C<sub>16</sub>MImCl for 24h and 48h.

The inactivation profiles of cysts (figure 4B) and trophozoites of the HCPA 2 and HCPA 4 isolates exposed 24 h to C<sub>16</sub>MImCl are compared (see in the supplementary information, figure S2). The results show that the HCPA 4 isolate was the most susceptible to C<sub>16</sub>MImC and, surprisingly, the cysts of these isolates were more susceptible than the trophozoites. Analysis of variance shows that the cyst inactivation profile of the HCPA 4 isolate differs significantly from the trophozoite and cyst inactivation profile of the HCPA 2 isolate. However, the trophozoite inactivation profile of the HCPA 4 isolate did not differ significantly from the cyst inactivation profile of the HCPA 4 isolate, nor from the trophozoite and cyst inactivation profile of the HCPA 2 isolate (see in the supplementary information, figure S2).



**Fig. 4:** Cysts of *Acanthamoeba* spp. **A:** Viable cysts **B:** Unviable cysts exposed to C<sub>16</sub>MImCl for 48h (trypan blue). The cysts were analyzed by optical microscopy (×1000)

### Cytotoxicity assay

The half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values were calculated for trophozoites and cysts in the HCPA2 (3.98 and 6.43) and HCPA 4 (6.26 and 1.70) isolates, respectively. For calculation of CC<sub>50</sub> (50% cytotoxic concentration), the following results were obtained: 16.42 (3T3), 17.57 (SH-SY5Y) and 171.50 (HaCaT). Based on the selectivity indexes, the IS concentrations used in this assay proved to be cytotoxic for NIH-3T3 and SH-SY5Y cells, while for HacaT cells it was not cytotoxic (Table I).

**Table I:** Selectivity indexes of C<sub>16</sub>MImCl on cell lines related to *Acanthamoeba* spp. isolates

Cells	Isolates			
	HCPA 2 <sup>a</sup>	HCPA 2 <sup>b</sup>	HCPA 4 <sup>a</sup>	HCPA 4 <sup>b</sup>

---

<b>3T3</b>	4.12	2.55	2.62	9.66
<b>SH-SY5Y</b>	4.41	2.73	2.80	10.3
<b>HaCaT</b>	43.1	26.7	27.4	155.9

---

<sup>a</sup>Trophozoites, <sup>b</sup>Cysts. An index value of  $\leq 10$   $\mu\text{M}$  indicates high in vitro cytotoxicity and lack of protozoan selectivity, meaning that the C<sub>16</sub>MImCl salt will kill both the protozoan and cell lineage tested (eg, 3T3 + HCPA 2). Index value  $> 10$  means that the C<sub>16</sub>MImCl salt, at the concentration tested, will kill the protozoan, without harming the examined cell line, under in vitro test conditions (eg, HaCaT + HCPA 4).

## Discussion

Keratitis caused by *Acanthamoeba* spp. despite being considered a rare disease, it has devastating effects, especially among CL wearers who exhibit risk behaviors associated with AK, such as lack of proper care for cleaning and disinfecting CL and storage cases (12). Multipurpose solutions currently available on the market are not 100% effective in eradicating *Acanthamoeba* spp. (5). Therefore, it is necessary to search for new drugs to fight this disease. In the present work, the efficacy of the IS C<sub>16</sub>MImCl was evaluated against trophozoites and cysts from AK isolates.

Our findings show that an exposure to a concentration of 15.62  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of C<sub>16</sub>MImCl for 24 h was sufficient to achieve a total (4 log<sub>10</sub>) inactivation of trophozoites from the HCPA 2 isolate, however when a 48 h exposure time was used, a lower concentration (7.81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was sufficient to achieve the same result (figure 2 A). The fact that elimination of all trophozoites was achieved at lower concentrations of IS when a longer exposure time was used suggests that the amoebic action of IS against trophozoites persists for a longer time.

On the other hand, the concentration of 7.81 µg/mL of IS was sufficient to inactivate 100% of the trophozoites of the HCPA 4 isolate during 24 h of exposure. This result suggests that the trophozoites from the HCPA 4 are more sensitive to C<sub>16</sub>MIImCl at this concentration than the HCPA 2.

These results are in agreement with the findings of a previous study, which tested the same IS, against *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30010) and a clinical isolate (genotype T4) (14). Unlike the results of the present study, that study showed 100% elimination of trophozoites (5 log<sub>10</sub>) using relatively higher concentrations for *A. castellanii* (31.25 µg/mL) and the isolate (62.50 µg/mL). In our study, different isolates were used compared to the study mentioned above. These differences can in part be attributed to the different initial densities of trophozoites used in the tests, as well as to differences in the level of sensitivity to the IS among the microorganisms tested, in addition to the fact that we use recent (more virulent) isolates. Thus, it is necessary to carry out comparative studies to establish the susceptibility profiles of different strains and isolates of protozoa of interest to C<sub>16</sub>MIImCl.

All amoebae used in the present study were classified as T4 genotype (23, 30). The isolates were recently obtained (2019) from corneal scrapes from patients with AK. The HCPA 4 isolate have obligatory endosymbionts internalized, namely *Candidatus Paraceadibacter acanthamoebae*(31). Several authors (32, 33) claim that endosymbionts can potentiate the virulence of the amoeba, exacerbating the diseases, for this reason research on amoebic endosymbionts from clinical samples is of great importance. The HCPA 4 isolate containing endosymbiont, used in our study was obtained from a patient with AK who had to undergo a corneal transplant in both eyes.

It is important to highlight that although the trophozoites of all tested amoebae

had significantly different sensitivity levels for the 7.81 µg/mL concentration of C<sub>16</sub>MImCl ( $p < 0.05$ ), in general, all trophozoites had a similar sensitivity profile, i.e., the IS was equally effective against the trophozoites of all amoebae tested. The amoebicidal property of C<sub>16</sub>MImCl can be attributed to compromising the integrity of the plasma membrane of trophozoites, as this IS can interact with this vital cellular component (34). Chlorhexidine also leads to bacterial cell membrane disruption, causing the microorganism's death (35). At low concentrations it is bacteriostatic and it is bactericidal at higher concentrations (36). In our study, the concentration of 200 µg/mL (0.02%) was sufficient to inactivate 100% of trophozoites in 24h of exposure for all tested amoebae, thus confirming its efficacy as a drug. On the other hand, using much lower concentrations of C<sub>16</sub>MImCl (15 and 7.81 µg/mL), we verified the unviability of 100% of trophozoites (4 log<sub>10</sub>) in the same exposure time, i.e., a smaller amount of C<sub>16</sub>MImCl is just as effective as chlorhexidine at higher concentrations against amoeba trophozoites. Both substances were tested in very sensitive cells such as 3T3 in the effective concentration (which kills more cysts) and the selectivity index of the imidazole salt was better. In other words, it reaches the expected goal of killing the protozoan, without reaching the tested cell.

Our findings show that C<sub>16</sub>MImCl has strong biocidal properties against *Acanthamoeba* spp cysts. A drastic reduction in cyst viability (100% inactivation 4 log<sub>10</sub>) of HCPA 2 was obtained from exposure to this IS at a concentration of 7.81 µg/mL for 24 h. On the other hand, no reduction in cyst viability was obtained in treatments with exposure to chlorhexidine (200 µg/mL) both for 24 h and for 48 h. As far as we know, this is the first study that evaluated and reported the amoebicidal activity of C<sub>16</sub>MImCl against cysts of *Acanthamoeba* spp. The high efficacy of C<sub>16</sub>MImCl against *Acanthamoeba* cysts suggests that this IS has a high capacity to

cross the double layer of cysts, which usually makes them highly resistant to several biocidal factors, including UV radiation, salinity, chlorine-based disinfectants (37), as well as various drugs (38,39). Importantly, unlike trophozoites, the inability of chlorhexidine to inactivate *Acanthamoeba* cysts suggests that this drug cannot cross the barrier established by the rigid cyst wall.

The study on the relationship between the *Wolbachia* endosymbiont (obligate intracellular bacterial) and filarial worm revealed that the death of *Wolbachia* occurred at low concentrations of antibiotics which may not initially cause damage to the worm's cells, but may allow the antibiotics to become infiltrate bacteria before of signaling and triggering host defense mechanisms (40). The IS showed an excellent result in HCPA 4 isolate, as with only 1.95 µg/mL there was 100% inactivation of the cysts for both 24 and 48 h. We can infer when comparing the cysts of the two isolates that probably the salt may have made the obligatory endosymbiont unfeasible, which contributed to the death of the amoeba, just like in filarial worm related to *Wolbachia*.

Our findings from the cytotoxicity assays reveal that C<sub>16</sub>MImCl is cytotoxic to 3T3 and SH-SY5Y cells at the concentrations tested. This is in agreement with the findings (14) who reported that C<sub>16</sub>MImCl is cytotoxic to macrophages and brain cells. Altogether, these findings suggest that this IS has little potential to be applied in the production of eye drops, at least not without being improved to reduce cytotoxicity. It is necessary to carry out cytotoxicity studies with this IS in human corneal cells so that the previous point of view can be validated or discarded. On the other hand, C<sub>16</sub>MImCl was not cytotoxic to HaCaT cells at the concentrations used in the present study.

Based on the results presented in this study, we understand that C<sub>16</sub>MImCl



can be used for the preparation of a disinfectant for surfaces and contact lens cases. Furthermore, we understand that it is desirable that more tests be performed in vitro as well as in ex-vivo models to assess their antimicrobial potential and cytotoxicity when used in combination with other antimicrobials. Likewise, studies that assess its environmental impact (persistence, stability and degradation in the environment) are highly desirable. As a future perspective, it is intended to test IS on corneal cells to really be sure of toxicity for use in direct contact with human eyes. However, its use as a disinfectant could already be indicated.

### **Conclusions**

The C<sub>16</sub>MImCl salt is a highly effective amebicide (at much lower concentrations) against trophozoites and cysts, however, although it is not cytotoxic to HaCaT cells, it is cytotoxic to 3T3 and SH-SY5Y cells, so it can be used as a surface disinfectant, but needs to be improved before it can be used as a drug. Furthermore, future studies aiming to elucidate the mechanism of action of the C<sub>16</sub>MImCl salt are needed.

**Acknowledgments:** Henri S. Schrekker and Marilise Brittes Rott are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) for the research productivity PQ fellowships. V.D.S. is grateful to CNPq for the PDJ fellowship (151220/2020-4).

**Funding:** This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

**Declarations of interest:** none.

## References

1. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006;30: 564–95. [https://doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x).
2. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol. 2004; 34: 1001-27. [https://doi: 10.1016/j.ijpara.2004.06.004](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.004).
3. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007;50:1–26. [https://doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x).
4. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasit Vectors. 2012;5:6. [https://doi: 10.1186/1756-3305-5-6](https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-6).
5. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. Parasite. 2015; 22:10. [https://doi: 10.1051/parasite/2015010](https://doi.org/10.1051/parasite/2015010).
6. Horn M, Wagner M. Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. J Eukaryot Microbiol. 2004; 51:509-14. [https://doi: 10.1111/j.1550-7408.2004.tb00278.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00278.x). PMID: 15537084.
7. Saberi R, Seifi Z, Dodangeh S, Najafi A, Abdollah Hosseini S, Anvari D, et al. A systematic literature review and meta-analysis on the global prevalence of *Naegleria* spp. in water sources. Transbound Emerg Dis. 2020; 67:2389-2402. <https://doi.org/10.1111/tbed.13635>.
8. Chaúque BJM, Rott MB. The role of free-living amoebae in the persistence of viruses in the era of severe acute respiratory syndrome 2, should we be concerned? Rev Soc Bras Med Trop. 2022; 55:e0045. [https://doi: 10.1590/0037-8682-0045-2022](https://doi.org/10.1590/0037-8682-0045-2022).
9. Thewes S, Soldati T, Eichinger L. Editorial: Amoebae as Host Models to Study the Interaction With Pathogens. Front Cell Infect Microbiol. 2019; 9:47.
10. Khan NA, Siddiqui R. Predator vs aliens: bacteria interactions with *Acanthamoeba*. Parasitology. 2014; 141:869-74.
11. Greub G, Raoult D. Microorganisms Resistant to Free-Living

Amoebae. Clin Microbiol Rev. 2004; 17:413-33.

12. Dos Santos DL, Kwitko S, Marinho DR, de Araújo BS, Locatelli CI, Rott MB. *Acanthamoeba* keratitis in Porto Alegre (southern Brazil): 28 cases and risk factors. Parasitol Res. 2018;117:747-50. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5745-y>.

13. Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Piñero JE, Valladares B. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? Trends in Parasitol. 2013; 29:181–87. <https://doi:10.1016/j.pt.2013.01.006>.

14. Fabres LF, Gonçalves FC, Duarte EOS, Berté FK, da Conceição DKSL, Ferreira LA, et al. In Vitro Amoebicidal Activity of Imidazolium Salts Against Trophozoites. Acta Parasitol. 2020; 65:317-26. <https://doi:10.2478/s11686-019-00161-6>.

15. Faber K, Zorzi GK, Brazil NT, Rott MB, Teixeira HF. siRNA-loaded liposomes: Inhibition of encystment of *Acanthamoeba* and toxicity on the eye surface. Chem Biol Drug Des. 2017;90:406-16. <https://doi:10.1111/cbdd.12958>.

16. Benitez LB, Caumo K, Brandelli A, Rott, MB. Bacteriocin-like substance from *Bacillus amyloliquefaciens* shows remarkable inhibition of *Acanthamoeba polyphaga*. Parasitol Res. 2011; 108:687-91. <https://doi:10.1007/s00436-010-2114-5>.

17. Riduan SN, Zhang Y. Imidazolium salts and their polymeric materials for biological applications. Chem Soc Rev. 2013; 42:9055–70. <https://doi:10.1039/c3cs60169b>.

18. Biczak R, Pawłowska B, Bałczewski P, Rychter P. The role of the anion in the toxicity of imidazolium ionic liquids. J Hazard Mater. 2014; 274:181-90. <https://doi:10.1016/j.jhazmat.2014.03.021>.

19. Fang B, Zhou CH, Rao XC. Synthesis and biological activities of novel amine-derived bis-azoles as potential antibacterial and antifungal agents. Eur J Med Chem. 2010;45:4388–98. <https://doi:10.1016/j.ejmech.2010.06.012>.

20. Schrekker HS, Donato RK, Fuentesfria AM, Bergamo V, Oliveira IF, Machado MM. Imidazolium salts as antifungal agents: activity against emerging yeast pathogens, without human leukocyte toxicity. Med Chem Commun. 2013;4:1457–60. <https://doi.org/10.1039/C3MD00222E>.

21. Dalla Lana DF, Donato RK, Bundchen C, Guez CM, Bergamo VZ, de Oliveira LF, et al. Imidazolium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes. J Appl Microbiol. 2015;119:377-88. <https://doi:10.1111/jam.12862>.

22. Ghashghaei O, Kielland N, Revés M, Taylor MC, Kelly JM, Di Pietro O, et al. Tetra substituted imidazolium salts as potent antiparasitic agents against African and American trypanosomiasis. *Molecules*. 2018;23:177. [https://doi: 10.3390/molecules23010177](https://doi.org/10.3390/molecules23010177).
23. Dos Santos DL, Virginio VG, Berté FK, Lorenzatto KR, Marinho DR, Kwitko S, et al. Clinical and molecular diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis in contact lens wearers in southern Brazil reveals the presence of an endosymbiont. *Parasitol Res*. 2022;121:1447-54. [https://doi: 10.1007/s00436-022-07474-y](https://doi.org/10.1007/s00436-022-07474-y).
24. Shen J, He W, Wang T. Multifunctional amphiphilic ionic liquid pathway to create water-based magnetic fluids and magnetically-driven mesoporous silica. *RSC Advances*. 2019;9:3504–13. <https://doi.org/10.1039/C8RA10065A>.
25. Zhou Y, Antonietti M. A Series of Highly Ordered, Super-Microporous, Lamellar Silicas Prepared by Nanocasting with Ionic Liquids. *Chem Mater*. 2004;16:544–50. [https://doi: 10.1021/cm034442w](https://doi.org/10.1021/cm034442w).
26. Schuster FL. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:342–54. [https://doi: 10.1128/CMR.15.3.342-354.2002](https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.342-354.2002).
27. Capes-Davis A, Freshney RI. *Freshney's Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. Wiley-Blackwell.2015; 7<sup>th</sup>ed.
28. Mosman T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival, Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63. [https://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
29. Borenfreund E, Puerner J. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*.1985; 24:119-24. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3).
30. Schmitz-Esser S, Toenshoff ER, Haider S, Heinz E, Hoenninger VM, Wagner M, et al. Diversity of bacterial endosymbionts of environmental *Acanthamoeba* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74: 5822-31. [https://doi: 10.1128/AEM.01093-08](https://doi.org/10.1128/AEM.01093-08).
31. Horn M, Fritsche TR, Gautom RK, Schleifer KH, Wagner M. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ Microbiol*.1999;1:357–67. [https://doi: 10.1046/j.1462-2920.1999.00045.x](https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00045.x).
32. Heinz E, Kolarov I, Kästner C, Toenshoff ER, Wagner M, Horn H. An *Acanthamoeba* sp. containing two phylogenetically different bacterial

endosymbionts. *Environ Microbiol.* 2007;9:1604–09. [https://doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01268.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01268.x).

33. Rayamajhee B, Subedi D, Peguda HK, Willcox MD, Henriquez FL, Carnt N. A Systematic Review of Intracellular Microorganisms within *Acanthamoeba* to Understand Potential Impact for Infection. *Pathogens* (Basel, Switzerland).2021;10:225. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020225>.

34. Egorova KS, Gordeev EG, Ananikov VP. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine. *Chem Rev.* 2017;117:7132-89. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00562>.

35. Karpinski TM, Szkaradkiewicz AK. Chlorhexidine-pharmacobiological activity and application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19:1321–26.

36. Steinsapir KD, Woodward JA. Chlorhexidine Keratitis: Safety of Chlorhexidine as a Facial Antiseptic. *Dermatol Surg.* 2017;43:1-6. [https://doi: 10.1097/DSS.0000000000000822](https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000822).

37. Chaúque BJM, Rott MB. Photolysis of sodium chloride and sodium hypochlorite by ultraviolet light inactivates the trophozoites and cysts of *Acanthamoeba castellanii* in the water matrix. *J Water Health.* 2021;19:190–202. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.401>.

38. Wekerle M, Engel J, Walochnik J. Anti-*Acanthamoeba* disinfection: hands, surfaces and wounds. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;56:106122. [https://doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106122](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106122).

39. Anwar A, Khan NA, Siddiqui R. Combating *Acanthamoeba* spp. cysts: what are the options? *Parasit Vectors.* 2018;11:26. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2572-z>.

40. Bulman CA, Chappell L, Gunderson E, Vogel I, Beerntsen B, Slatko BE, et al. The Eagle effect in the *Wolbachia*-worm symbiosis. *Parasit Vectors.* 2021;14:118. doi: 10.1186/s13071-020-04545-w.

## 5.7. Capítulo VII

“Amoebae collection: recovery and conservation method of monoxenic and axenic cultures of free-living amoebae” de autoria de Santos DL, Guedes VHZ, Matiazó FF, Rott MB. Em fase de final de escrita a ser submetido

## **Amoebae collection: recovery and conservation method of monoxenic and axenic cultures of free-living amoebae**

Denise Leal dos Santos<sup>a</sup>, Vitor Hugo Zeilmann Guedes<sup>a</sup>, Fernanda Fraga Matiazo<sup>a</sup>, Marilise Brittes Rott<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Setor de Parasitologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, Centro Histórico, 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

Corresponding author: Marilise Brittes Rott\*

Mailing address MBR: Laboratory 311, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Department of Parasitology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmento Leite Street, N 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90050-170, Brazil. Tel: +55 51 3308 4537 and +55 51 999530060. E-mail: marilise.rott@ufrgs.

### **ABSTRACT**

*Acanthamoeba* spp. can be grown in monoxenic or axenic medium, depending on the experiment to be performed. Usually, monoxenic culture plates are kept until the end of the research, but they tend to dry out and present a “film paper” appearance, causing the researcher to believe that there are no more viable microorganisms there. At the same time, axenic cultures can often contaminate, making the sample unfeasible, be it a strain or an isolate. The objective of this study was to present a method of recovering monoxenic and axenic cultures, so that the material contained there is not lost and can be reused for research purposes. Twenty

plates (monoxenic culture) with dates between 2019 and 2021, ten of clinical origin (CL samples and storage cases from patients with AK) and ten of environmental origin (lakes, lettuce and hospital), were rehydrated, centrifuged and realized triplicate being performed for each of the plates, resulting in a total of 60 plates. The plates were followed by visualizing trophozoites and/or cysts present, and all 30 plates of clinical origin were recuperated while 10/30 environmental plates were not recovered. There were many fungi in them, which may have made it difficult or prevented the amoebas growing on the plate. The next step was to cultivate 50 plates using various techniques: using dehydrated ATCC plate clippings, aliquots of axenic culture, fresh agar clippings from monoxenic cultures, and desiccated clinical plaque clippings. All plates showed trophozoites and/or cysts of *Acanthamoeba* spp. These plates were dehydrated and their clippings placed on new plates with *E. coli* for the reactivation of the structures, which so far showed positivity for 26 plates. To date, there is no description in the literature of methods for recovering microbiological material for the purpose of assembling an amoeba collection. Our work reveals the importance of recovering material that would be discarded or lost, thus composing a parasitological collection in the laboratory to be used in future research.

**Keywords:** *Acanthamoeba* spp., trophozoites, cysts, viability.

## 1. INTRODUCTION

Free-living amoebae (FLA) such as *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri* are ubiquitous protozoa, which have gained importance in clinical research since the 19th century, due to their pathogenic potential (Visvesvara et al., 2007; Khan, et al., 2006). *Acanthamoeba* spp. can be

found in diverse habitats, such as freshwater, swimming pools, water treatment plants, tap water, soil, dust, ventilation/air conditioning units, contact lenses (CL) and storage cases, among others (Dos Santos et al., 2018; Lorenzo-Morales et. al. 2005). The genus *Acanthamoeba* can cause diseases such as Granulomatous Amebic Encephalitis (GAE) responsible for causing severe and/or fatal damage to the central nervous system (CNS) (Khan, et.al 2006; Schuster & Visvesvara, 2004a) and *Acanthamoeba* Keratitis (AK), mainly affecting users of contact lenses that do not perform proper hygiene and consequently develop a severe infection in the cornea (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Morphologically, *Acanthamoeba* spp. can present two forms: trophozoites and cysts. Trophozoites are considered the active form of the protozoan, enabling its nutrition and locomotion. Cysts (resistance form) are formed when the amoeba is subjected to factors that can compromise its survival, such as chemical products (disinfectants and antimicrobials) and physical factors (temperature, freezing and UV radiation), in addition to being able to remain viable *in vitro* and in plates for approximately 20 years (Lorenzo-Morales et.al., 2015; Sriram et al., 2008; Schuster & Visvesvara, 2004b).

The cultivation of *Acanthamoeba* spp. can be axenic or monoxenic. Monoxenic cultivation involves inoculation of the isolate on a plate containing Non-Nutrient Agar (NNA) and overlayer of a *Escherichia coli* inactivated, allowing the amoeba to nourish itself by phagocytosis. In axenic culture, the medium used is PYG (2% peptone proteose, 0.2% yeast extract and 1.8% glucose), allowing only one strain of microorganism to grow (Lorenzo-Morales et.al. 2015). Cysts can be scraped off the agar surface using phosphate buffered saline (PBS) and used for assays (Khan, 2006).

Due to the COVID-19 pandemic, several academic institutions interrupted



their activities and, consequently, some research laboratories suffered the impact through the loss of biological materials due to infeasibility. The monoxenic culture plates that contained cultures of *Acanthamoeba* spp., dried out and were brittle, similar to crumpled cling film. The samples of axenic culture dried out or contaminated due to time without follow-up. The objective of this study was to promote the recovery of microbiological material from “aged” culture plates and of axenic cultures making them viable for further studies.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

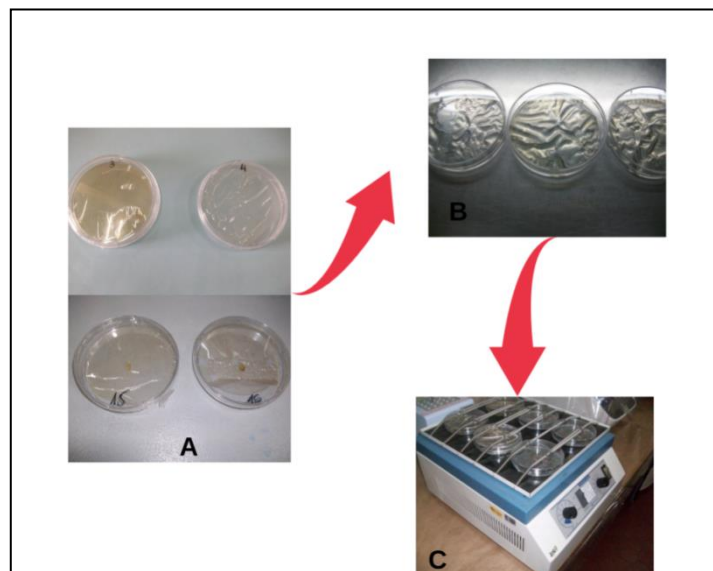
### **2.1. Recovery of existing plates in the laboratory**

Twenty already dehydrated monoxenic culture plates (2019 to 2021) (Table 1) that were incubated at 30°C were separated for possible recovery (ten of clinical and ten environmental origin). A volume of 5 mL of phosphate-buffered saline buffer (PBS 1x) was added in the 20 plates. Plates were placed on a KLINE plate shaker for 10 minutes at 10% speed. Soon after, the liquid from each plate was removed and placed in tubes for centrifugation (1800 rpm for 10 minutes) (Figure 1). After centrifugation, the one aliquot (500 µl) of liquid from each tube was inoculated onto plates with non-nutrient agar 1.5% (NNA) containing an overlayer of an *Escherichia coli* (ATCC 25922) suspension that had been heat inactivated (for 2 h at 56°C) for new monoxenic cultivation. The experiment was carried out in triplicate, resulting in a total of 60 plates (30 clinical and 30 environmental) that were sealed with Parafilm® (SPI Supplies, West Chester, PA), incubated at 37°C and monitored over a period of 15 days for visualization under an optical microscope to search for trophozoites and/or cysts of *Acanthamoeba* spp. The plates were again incubated to dehydrate.

**Table 1:** Plates dehydrated of monoxenic cultivation, its origin and year in which the cultivation was carried out.

Dehydrated plates - monoxenic cultivation of <i>Acanthamoeba</i> spp.					
Plates	Clinical Origin	Year	Plates	Environmental Origin	Year
1	CL	2020	11	Lettuce	2020
2	CL	2019	12	Lettuce	2020
3	CL	2019	13	Lettuce	2020
4	CL	2021	14	Lettuce	2020
5	CL	2021	15	Lake	2020
6	CL	2021	16	Lettuce	2020
7	Storage case liquid	2020	17	Hospital	2020
8	Storage case liquid	2019	18	Lettuce	2020
9	Storage case liquid	2019	19	Lettuce	2020
10	CL	2021	20	Lettuce	2020

CL: contact lens



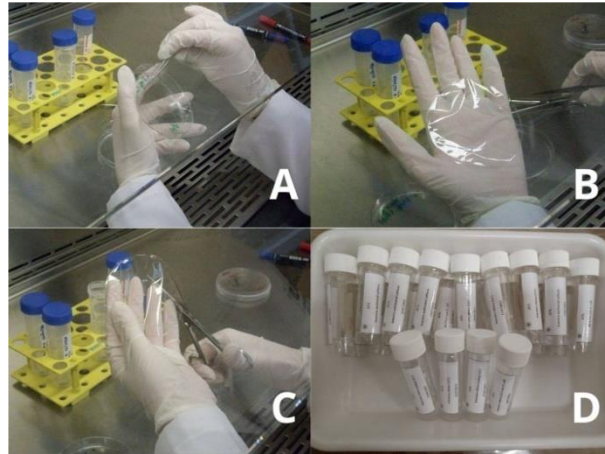
**Figure 1:** Plates rehydration method. **A:** Dehydrated plates. **B:** Plates hydrated. **C:** Plates in shaker.

## **2.2. Cultivation of cultures for later storage in collection**

Another stage of the experiment was to grow different samples on NNA plates with or without *E. coli*. Fifty plates were inoculated with different techniques, among which, twenty-six plates (NNA with *E. coli*) received agar clippings from clinical (22) and environmental (4) plates; twenty plates (NNA, 10 with *E. coli* and 10 without *E. coli*) received aliquot (150 µl in each plate) of axenic samples of clinical origin and four plates (NNA with *E. coli*) received repeats of monoxenic plates of environmental origin. The plates were sealed with Parafilm®, incubated in at 30°C and trophozoites and cysts visualized under an optical microscope after 48 h. The Parafilm® was removed and these plates were left in the oven until they dehydrated.

## **2.3. Collection and reactivation of culture plates from dehydrated material**

The dehydrated material from the recovered plates were cut and packed in properly identified tubes at room temperature to compose the dry collection of microbiological material. For reactivation from dehydrated material, the agar clippings were rehydrated with PBS 1x and placed on a news plates with NNA and *E. coli*. The plates were sealed and incubated in an oven at 30° C for monitoring and visualization of the structures(Figure 2).

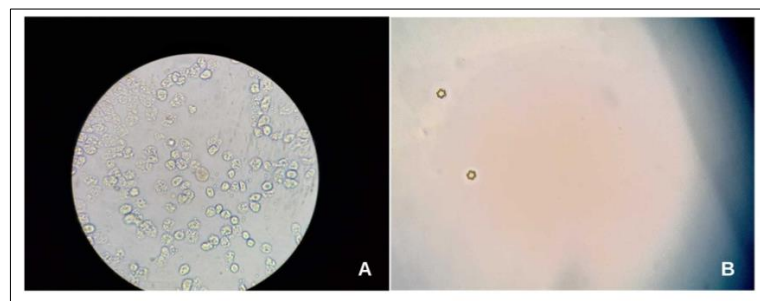


**Figure 2:** Collection Amoebae: **A:**removal of dehydrated agar from the plate **B:** dehydrated agar **C:** agar clipping **D:** agar in tubes.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Recovery of dehydrated plates

After 72h of the beginning of the experiment using the recovery methodology above mentioned, the 60 plates (triplicate) were examined under a light microscope (at 100x) to check the presence of trophozoites and/or cysts of *Acanthamoeba* spp. The plates of clinical origin performed in showed at positive result (presence of trophozoites and/or cysts of *Acanthamoeba* spp.) in all plates (30/30) and of environmental origin (20/30)(Table S1 in Supplementary material)(Figure 3).



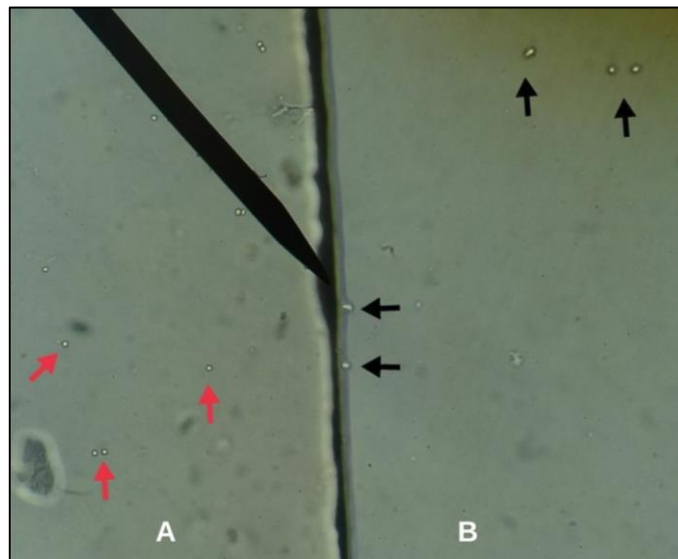
**Figure 3:** Trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* spp recovered from plates of monoxenic cultures. **A:** trophozoites **B:** cysts. The recovered isolates were visualized through microscopy using an optical microscopy ( $\times 1000$ ).

### 3.2. Cultivation of new plates of clinical and environmental origin

The results were positive in relationship the all plates (50) that were inoculated with axenic samples, or that received spikes and clippings of dry or not agar.

### 3.3. Reactivation of *Acanthamoeba* spp. from dehydrated agar clippings

The 50 plates were dehydrated and their clippings were placed in contact with plates with NNA and *E. coli* for reactivation of the cysts. So far 26 boards revealed the passage of the trophozoites (in the agar clipping) to the plate (Figure 4).



**Figure 4:** Passage of trophozoites in monoxenic cultivation **A:** Cut rehydrated agar containing *Acanthamoeba* cysts (red arrows); **B:** Agar with *E. coli* containing *Acanthamoeba* trophozoites (black arrows). The structures were visualized through microscopy using anoptical microscopy ( $\times 1000$ ).

#### 4. DISCUSSION

Our study is not the only one to recover dehydrated plates containing trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* spp. (Sriram et al., 2008), but we believe to be the first to propose this method as a solution for storing microbiological material for research purposes.

Dehydrated clinical and environmental plates containing *Acanthamoeba* trophozoites and cysts that had been in the laboratory for about three years were subjected to the hydration process for recovery of microbiological material. Of the 60 plates incubated from the dehydrated plates, the most (83.0%) showed trophozoites and/or cysts of *Acanthamoeba* spp. while 17.0% were no protozoan structures were seen. The best results (100%) obtained in our experiment came from of 30/30 clinical samples originating from contact lens samples and from storage cases of patients diagnosed with AK. On the other hand, the plates with environmental isolates origin presented 66.7% (20/30) of recovery, possibly because there was no viable material on the plates and also because there was a large amount of filamentous fungi, which competes for food and space, becoming more prevalent. Even so, it is possible to recover environmental samples, but it takes more time and more work to do it.

We showed that it is possible to store axenic cultures through the dehydration method of plates by transferring them to an NNA plate with or without an *E. coli* layer. Is possible to reactivate trophozoites and cysts through by placing a piece of dehydrated agar in monoxenic or axenic culture. The results revealed material recovery through the method proposed in our study. Upon being rehydrated and placed on the plate again, the material was recovered in less than 24 hours. Studies by (Mazur et al., 1995; Sriram et al., 2008) report that the cysts can remain viable for

several years, maintaining their pathogenicity, fulfilling a role in the transmission of infections by *Acanthamoeba* spp. Therefore, it is extremely important to recover material from dehydrated plates, for the storage of cysts in a microbiological collection, which can be used in future experiments.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to the staff of the Department of Microbiology, Immunology and Parasitology of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Funding:** The authors are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Conflict of interest:** On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

**Data availability:** All relevant data generated during this study are included in the article.

**Author's contribution:** Denise L. dos Santos: Conceptualization, Writing, Original draft preparation, Methodology, Visualization, Investigation, Writing-Reviewing and Editing; Vitor Hugo Z. Guedes: Writing, Visualization, Investigation; Fernanda F. Matiazzo: Visualization, Investigation; Marilise B. Rott: Conceptualization, Visualization, Supervision, Writing- Reviewing and Editing.

**Ethics approval:** No ethical approval was required for this study.

**Consent to participate:** All authors give their consent to participate in this article.

**Consent for publication:** All authors give their consent for the publication of this article.

## 6. References

Dos Santos DL, Kwitko S, Marinho DR, de Araújo BS, Locatelli CI, Rott MB. *Acanthamoeba* keratitis in Porto Alegre (southern Brazil): 28 cases and risk factors. *Parasitol Res.* 2018 Mar;117(3):747-750. doi: 10.1007/s00436-017-5745-y. Epub 2018 Jan 14. PMID: 29332157.

Khan NA (2006) *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Ver* 30(4):564–595. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x.

Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martínez E, Valladares B (2005) Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res.* 95(4):273-277. doi: 10.1007/s00436-005-1301-2.

Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J (2015) An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* 22:10. doi:10.1051/parasite/2015010.

Marciano-Cabral F, Cabral G (2003) *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 16(2):273–307. doi: 10.1128/CMR.16.2.273-307. 2003.

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(2): 106–108.

Schuster FL, Visvesvara GS (2004a) Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34, 1001-



1027. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.06.004.

Schuster FL, Visvesvara GS (2004b) Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet Parasitol* 126(1-2): 91-120. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.09.019.

Sriram R, Shoff M, Booton G, Fuerst P, Visvesvara GS (2008) Survival of *Acanthamoeba* Cysts after Desiccation for More than 20 Years. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, p. 4045–4048 Vol. 46, No. 12. doi:10.1128/JCM.01903-08.

Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007 Jun;50(1):1-26. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x. Epub 2007 Apr 11. PMID: 17428307.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

As Amebas de Vida Livre são protozoários ambientais, mas que podem se tornar patógenos causadores de doenças em humanos e animais constituindo assim um campo de pesquisa dentro da abordagem da Saúde Única.

No presente estudo três amostras suspeitas de CA foram encaminhadas ao Laboratório de Protozoologia da UFRGS para análise. Todos os pacientes eram usuários de lentes de contato. Isso geralmente ocorre devido à falta de cuidados com a limpeza e desinfecção das lentes de contato e estojos de armazenamento (Khan, 2006), além do uso de água para limpar as LC e o uso das mesmas durante banhos de piscinas ou chuveiro (Arance-Gil et al. 2014). Essas amostras foram isoladas e cultivadas para a confirmação da presença de *Acanthamoeba* spp. e pesquisa de endossimbiontes através da extração de DNA, uso de primers específicos e sequenciamento. Os resultados obtidos mostraram que todos os isolados eram pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, apresentavam genótipo T4, que costuma ser o mais relacionado a doenças infecciosas como a CA (Lorenzo-Morales et al. 2015; Omaña-Molina et al. 2016), e um deles carregava um endossimbionte obrigatório de *Acanthamoeba*: *Candidatus Paracaedibacter acanthamoebae* (Horn et al., 1999). Amebas de Vida Livre podem transportar microrganismos patogênicos aumentando sua virulência e/ou provavelmente realizando trocas gênicas com eles (Khan e Siddiqui, 2014). O paciente cuja amostra foi detectada com o endossimbionte foi acometido por uma CA severa não responsiva ao tratamento convencional e necessitou realizar transplante de córnea em ambos os olhos, o que nos leva a suspeitar que talvez a presença dessa bactéria internalizada na ameba tenha exacerbado a doença.

Estudos de Ithoi et al. (2013) e Karakus et al. (2016) mostraram que tanto animais selvagens como domésticos podem desenvolver CA. Nesse contexto devemos pensar na possibilidade de amebas ambientais serem transmitidas de animais para humanos e vice-versa, caracterizando uma zoonose.

Em nosso estudo, um isolado de origem animal (amostra de cérebro de bovino) foi enviado ao laboratório e teve seu DNA extraído a fim de investigarmos a presença de *Naegleria* spp. O diagnóstico molecular foi positivo e, além disso, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica, pesquisa no BLAST e análise de árvore filogenética. Até onde temos conhecimento esse é o primeiro caso de

*Naegleria fowleri* no Brasil confirmado por PCR. É importante que mais pesquisas sejam feitas principalmente na localidade do município de Glorinha/RS onde outro caso de MAP acometeu um bovino em uma propriedade próxima ao caso que publicamos (Henker et al., 2021) porque mais casos podem ocorrer e como essa doença também atinge humanos e é altamente letal, ela pode custar vidas humanas, além de perdas relacionadas à pecuária. Deve-se levar em conta a questão ambiental principalmente em relação ao aquecimento global que está demonstrado através de estudos realizados por Woolway e Maberly (2020), tem influência sobre as águas de rios, lagos e oceanos, fazendo com que cianobactérias se proliferem em ambientes aquáticos de água doce e consequentemente sirvam de alimento para *N. fowleri* permitindo o aumento de sua densidade no ambiente (Andrade e Giroldo, 2014).

Compondo nosso conjunto de estudos com a finalidade de incluir as AVL na abordagem de Saúde Única, determinamos a atividade amebicida do sal imidazólico C<sub>16</sub>MImCl frente a trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* spp. Para isso, foram utilizados dois isolados dos casos de CA: HCPA 2 e HCPA 4 (com endossimbionte). Já é bem documentado que os cistos são resistentes à cloração e medicamentos (Chaúque e Rott, 2021) e a busca por compostos com atividade sobre essas estruturas deve ser constante. Nossos resultados mostraram que o C<sub>16</sub>MImCl teve atividade contra cistos de *Acanthamoeba* spp. para os dois isolados (HCPA 2), numa concentração menor e com melhor desempenho que a clorexidina, comumente usada no tratamento da CA. Em relação aos ensaios de citotoxicidade, o C<sub>16</sub>MImCl não foi citotóxico apenas para as células HaCaT. Ele já foi testado para células HBMEC e macrófagos e também se mostrou tóxico (Fabres et al., 2020). Estudos de citotoxicidade em células da córnea humana e animal seriam muito importantes na busca de um fármaco eficaz na inativação de cistos. Num primeiro momento, acreditamos na possibilidade de usar esse sal imidazólico para uma formulação de solução para desinfecção de superfície.

## 7. CONCLUSÃO

Exames de diagnóstico foram realizados no Laboratório de Protozoologia da UFRGS, atendendo a casos clínicos humanos e animais suspeitos de acometimento por doenças infecciosas negligenciadas e emergentes causadas por Amebas de Vida Livre. Além disso, essas amostras têm sido utilizadas em pesquisa, trazendo muitas contribuições para o conhecimento nessa área.

Devido à resistência do cisto de *Acanthamoeba* spp. foi realizada pesquisa de atividade do sal imidazólico C<sub>16</sub>MImCl que foi efetivo em baixas concentrações quando comparado ao fármaco de referência usado para tratar a ceratite amebiana. Uma possível formulação de um produto usado para erradicar as estruturas císticas base desse sal imidazólico é uma das perspectivas desse trabalho.

Baseado na abordagem da Saúde Única, revisões e outros experimentos foram realizados, pesquisando a relação das AVL com o ser humano, animal e o meio ambiente.

## 8. REFERÊNCIAS

- Andrade RR, Giroldo D. 2014. Limnological characterisation and phytoplankton seasonal variation in a subtropical shallow lake (Guaíba Lake, Brazil): a long-term study. *Acta Limnol. Bras.* 26(4):442-56.
- Angelici MC, Walochnik J, Calderaro A, Saxinger L, Dacks JB. 2021. Free-living amoebae and other neglected protistan pathogens: Health emergency signals? *Eur J Protistol.* 77:125760.
- Arance-Gil A, Gutiérrez-Ortega AR, Villa-Collar C, Nieto-Bona A, Lopes-Ferreira D, González-Méijome JM. 2014. Corneal cross-linking for *Acanthamoeba* keratitis in an orthokeratology patient after swimming in contaminated water. *Cont. Lens Anterior Eye.* 37: 224–27.
- Backer LC, Miller M. 2016. Sentinel Animals in a One Health Approach to Harmful Cyanobacterial and Algal Blooms. *Vet Sci.* 3(2):8. doi: 10.3390/vetsci3020008.
- Baquero OS, Benavidez Fernández MN, Acero Aguilar M. 2021. From Modern Planetary Health to Decolonial Promotion of One Health of Peripheries. *Front Public Health.* 9:637897. doi: 10.3389/fpubh.2021.637897.
- Benterki MS, Ayachi A, Bennoune O, Régoudis E, Pélandakis M. 2016. Meningoencephalitis due to the amoeboflagellate *Naegleria fowleri* in ruminants in Algeria. *Parasite* 23(11):1–4.
- Biasoli WM, Araripe CA, Lima JMO, Lopes, E. 1981. **Meningoencefalite amebiana de origem hídrica diagnosticada pelo exame do liquor.** Apresentação de dois casos. In: XV Congresso Brasileiro de Patologia Clínica, São Paulo.
- Bullé DJ, Benitez LB, Rott MB. 2020. Occurrence of *Acanthamoeba* in hospitals: a literature review. *Rev Epidemiol Controle Infecç.* 10(2): 174-80.
- Calixto PHM, Trindade FR, Ballarini AJ, Gellis CA, Dias M, Campos CEC, Oliveira JCS. 2014. Aspectos biológicos das principais amebas de vida-livre de importância médica. *Biota Amazonia.*4:124-29.
- Campos, EJD. 2014. O papel do oceano nas mudanças climáticas globais. *Rev USP.* 103: 55-66.
- Campos R, Gomes MCO, Pringenzi LS., Stecca J. 1977. Meningoencefalite por ameba de vida livre. Apresentação do primeiro caso latino-americano. *Rev Inst Med Trop SP.* 19:349-51.
- Carlesso AM, Mentz MB, da Machado ML, Carvalho A, Nunes TE, Maschio VJ, Rott MB. 2014. Characterization of isolates of *Acanthamoeba* from the nasal mucosa and cutaneous lesions of dogs. *Curr Microbiol.*68:702-7.

- Carneiro LA, Pettan-Brewer C. 2021. **Pesquisa em Saúde & Ambiente na Amazônia: perspectivas para sustentabilidade humana e ambiental na região.** Cap. 13. Editora Científica.332 p.
- Carrijo-Carvalho LC, Sant'ana VP, Foronda AS, de Freitas D, de Souza Carvalho FR. 2017. Therapeutic agents and biocides for ocular infections by free-living amoebae of *Acanthamoeba* genus. *Surv Ophthalmol* 62(2):203–18.
- Carvalho FG, Moura H, Guimarães Neto FD, Salazar HC, Gonçalves AJ, Lomelino MR, Avila CM. 1983. Meningoencefalite amebiana primária. Relato de caso. *Rev Bras Neurol.* 19:83-6.
- Cavalcante KKS, Moreno JO, Cavalcante FRA, Nzundu R, Correia FGS, Florêncio CMGD, Alencar CH. 2020. Saúde única: perspectivas para o enfrentamento da cOVID-19. *Inter Am J Med Health.* 3:e202003031.
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). **Number of Case-reports of Primary Amebic Meningoencephalitis by State of Exposure.**2020.Disponível em:<<https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/state-map.html>>. Acesso em: 10 ago. 2021.
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). **Number of Case-reports of Primary Amebic Meningoencephalitis by Year — United States, 1962-2019.**2020.Disponível em:<<https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/graphs.html>>. Acesso em: 10 ago. 2021.
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health. **Emerging Infectious Diseases.** 2018. Disponível em:<<https://www.cdc.gov/niosh/topics/emerginfectdiseases/default.html>>. Acesso em: 10 ago. 2021.
- Chaúque BJM, Rott MB. 2021. Photolysis of sodium chloride and sodium hypochlorite by ultraviolet light inactivates the trophozoites and cysts of *Acanthamoeba castellanii* in the water matrix. *J. Water Health.* 19(1):190–202.
- Chomicz L, Conn DB, Padzik M, Szaflik JP, Walochnik J, Zawadzki PJ, Pawłowski W, Dybicz M. 2015. Emerging Threats for Human Health in Poland: Pathogenic Isolates from Drug Resistant *Acanthamoeba* Keratitis Monitored in terms of Their In Vitro Dynamics and Temperature Adaptability. *Biomed Res Int.* 231285.

- Cooper AM, Aouthmany S, Shah K, Rega PP. 2019. Killer amoebas: Primary amoebic meningoencephalitis in a changing climate. *JAAPA*. 32(6):30-35.
- Corsaro D, Venditti D. 2010. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa Acanthamoebida). *Parasitol Res*. 7: 233–38.
- Corsaro D, Köhler M, Montalbano Di Filippo M, Venditti D, Monno R, Di Cave D, Berrilli F, Walochnik J. 2017. Update on *Acanthamoeba jacobsi* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. *Parasitol Res*. 116(4):1273-84.
- Corsaro D, Walochnik J, Köhler M, Rott MB. 2015. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res*. 114:2481-90.
- Daft BM, Visvesvara GS, Read DH, Kinde H, Uzal FA, Manzer MD. 2005. Seasonal meningoencephalitis in Holstein cattle caused by *Naegleria fowleri*. *J Vet Diagn Invest*. 17(6):605–09.
- Davis MF, Rankin SC, Schurer JM, Cole S, Conti L, Rabinowitz P, COHERE Expert Review Group. 2017. Checklist for One Health Epidemiological Reporting of Evidence (COHERE). *One Health*. 4:14-21.
- Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde. 2010. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde [Neglected diseases: the strategies of the Brazilian Ministry of Health]. *Rev Saude Publica*. 44(1):200-2. doi: 10.1590/s0034-89102010000100023.
- Ellwanger JH, Kulmann-Leal B, Kaminski VL, Valverde-Villegas JM, Veiga ABGD, Spilki FR, Fearnside PM, Caesar L, Giatti LL, Wallau GL, Almeida SEM, Borba MR, Hora VPD, Chies JAB. 2020. Beyond diversity loss and climate change: Impacts of Amazon deforestation on infectious diseases and public health. *An Acad Bras Cienc*. 92(1):e20191375.
- Essack SY. 2018. Environment: the neglected component of the One Health triad. *Lancet Planet Health*. 2(6): e238-e239.
- Fabres LF, da Costa Gonçalves F, Duarte EOS, Berté FK, da Conceição DKSL, Ferreira LA, Schrekker HS, Rott MB. 2020. In Vitro Amoebicidal Activity of Imidazolium Salts Against Trophozoites. *Acta Parasitol*. 65(2):317-26.
- Fabres LF, Maschio VJ, Santos DLD, Kwitko S, Marinho DR, Araújo BS, Locatelli CI, Rott MB. 2018. Virulent T4 *Acanthamoeba* causing keratitis in a patient after swimming while wearing contact lenses in Southern Brazil. *Acta Parasitol*. 63(2):428-32
- Foronda AS. 1976. Crescimento de amebas de vida livre em meios semeados com líquido cefalorraquidiano humano. *Nota Prévia. Rev Paul Med*. 87:140.

- Gast RJ. 2001. Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48:609–15.
- Gorbunova V, Seluanov A, Kennedy BK. 2020. The World Goes Bats: Living Longer and Tolerating Viruses. *Cell Metab.* 32(1):31-43.
- Greenwell TH, Loh RS, Chehade M, Mills RA. 2013. Misdiagnosis of orthokeratology related *Acanthamoeba* spp keratitis as herpes simplex virus keratitis. *Clin Experiment Ophthalmol.* 41(4):418-20.
- Greub G, Raoult D, 2004. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clin Microbiol Rev.* 17:413-33.
- Gyles C. 2016. One Medicine, One Health, One World. *Can Vet J.* 57(4):345-46.
- Hajjalilo E, Niyayati M, Solaymani M, Rezaeian M. 2015. Pathogenic Free-Living Amoebae Isolated From Contact Lenses of Keratitis Patients. *Iran J Parasitol.* 10(4):541-46.
- Häsler B, Cornelsen L, Bennani H, Rushton J. 2014. A review of the metrics for One Health benefits. *Rev Sci Tech.* 33(2): 453-64.
- Henker LC, Da Cruz RAS, Da Silva FS, Driemeier D, Sonne L, Uzal FA, Pavarini SP. 2019. Meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* in cattle in Southern Brazil. *Braz J Vet Parasitol.* 28(3):514–17.
- Henker LC, Lorenzetti MP, Dos Santos DL, Virginio VG, Driemeier D, Rott MB, Pavarini SP. 2021. *Naegleria fowleri*-associated meningoencephalitis in a cow in Southern Brazil—first molecular detection of *N. fowleri* in Brazil. *Parasitol Res.* 1-7
- Hewett MK, Robinson BS, Monis PT, Saint CP. 2003. Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer. *Acta Protozool.* 42:325–29.
- Horn M, Fritsche TR, Gautam RK, Schleifer KH, Wagner M. 1999. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ Microbiol.* 1(4):357-67.
- Hosie MJ, Jasim S. The case for adopting a combined comparative medicine and One Health approach to tackle emerging diseases. *Vet Rec.* 2020 Jul;187(1):24-26. doi: 10.1136/vr.m2686.
- Iovieno A, Oechsler RA, Ledee DR, Miller D, Alfonso EC. 2010. Drug-resistant severe *Acanthamoeba* keratitis caused by rare T5 *Acanthamoeba* genotype. *Eye Contact Lens.* 36(3):183-84
- Ithoi I, Mahmud R, Abdul Basher MH, Jali A, Abdulsalam AM, Ibrahim J, Mak JW. 2013. *Acanthamoeba* genotype T4 detected in naturally-infected feline



- corneas found to be in homology with those causing human keratitis. *Trop Biomed.* 30(1):131-40.
- Jahangeer M, Mahmood Z, Munir N, Waraich UE, Tahir IM, Akram M, Ali Shah SM, Zulfqar A, Zainab R. 2020. *Naegleria fowleri*: Sources of infection, pathophysiology, diagnosis, and management; a review. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 47(2):199-212.
- Kalra SK, Sharma P, Shyam K, Tejan N, Ghoshal U. 2020. *Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis. *Exp, Parasitol.* 208:107788.
- Karakuş M, Aykur M, Özbel Y, Töz S, Dağcı H. 2016. Molecular detection and genotyping of *Acanthamoeba* spp. among stray dogs using conjunctival swab sampling. *Acta Trop.* 164:23-26.
- Karakavuk M, Aykur M, Şahar EA, Karakuş M, Aldemir D, Döndüren Ö, Özdemir HG, Can H, Gürüz AY, Dağcı H, Döşkaya M. 2017. First time identification of *Acanthamoeba* genotypes in the cornea samples of wild birds; Is *Acanthamoeba* keratitis making the predatory birds a target? *Exp Parasitol.* 183:137-42.
- Kashiwabuchi RT, Carvalho FRS, Khan YA, de Freitas D, Foronda AS, Hirai FE, Campos MS, McDonnell PJ. 2011. Assessing efficacy of combined riboflavin and UV-A light (365 nm) treatment of *Acanthamoeba* trophozoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(13):9333-38.
- Kennedy C, Lindsey R. 2015. **What's the difference between global warming and climate change?** NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) Disponível em: <<https://www.climate.gov/news-features/climate-qa/whats-difference-between-global-warming-and-climate-change>>. Acesso em: 11 ago. 2021.
- Khan NA. 2006 *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev.* 30(4):564-95.
- Khan NA, Siddiqui R. 2014. Predator vs aliens: bacteria interactions with *Acanthamoeba*. *Parasitology.* 141(7):869-74.
- Kilvington S, Gray T, Dart J, Morlet N, Beeching JR, Frazer DG, Matheson M. 2004. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest Ophthalmol vis sci.* 45:165-169.
- Król-Turmińska K, Olender A. 2017. Human infections caused by free-living amoebae. *Ann Agric Environ Med.* 24(2):254-60.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35(6):1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

- Lee B, Grossniklaus HE, Edelhauser HF. 2010. Concurrent *Acanthamoeba* and *Fusarium* keratitis with silicone hydrogel contact lens use. *Cornea*. 29(2):210-3.
- Leite FP, Macente S. 2014. Soluções Multiuso na Desinfecção de Lentes de Contato: Uma Revisão sobre sua Eficácia. *Revista Saúde e Pesquisa*. 7: 295-302.
- Lerner H, Zinsstag J. 2021. “**Towards a Healthy Concept of Health.**” In Zinsstag J, Schelling E, Crump L, Whittaker M, Tanner M, Stephen C , eds. *One Health: the theory and practice of integrated health approaches*. Oxfordshire: 2nd Ed, CAB International. p.52-57.
- Liang L, Gong P. 2017. Climate change and human infectious diseases: A synthesis of research findings from global and spatio-temporal perspectives. *Environ Int*. 103:99-108.
- Lindsey R, Dahlman L. 2021. **Climate Change: Global Temperature**. NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration).Disponível em: <<https://www.climate.gov/news-features/understanding-climate-global-temperature>>. Acesso em: 11 ago. 2021.
- Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. 2015. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* 22:10.
- Lozano-Alarcón F, Bradley GA, Houser BS, Visvesvara GS. 1997. Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* in a South American tapir. *Vet Pathol*. 34(3):239–43.
- Maciver SK, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. 2020. Is *Naegleria fowleri* an Emerging Parasite? *Trends Parasitol*. 36(1):19-28.
- Magnet A, Henriques-Gil N, Galván-Díaz AL, Izquierdo F, Fenoy S, Del Aguila C. 2014. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitol. Res*. 113:2845–50.
- Majid MAA, Mahboob T, Mong BG, Jaturas N, Richard RL, Tian-Chye T, Phimphila A, Mahaphonh P, Aye KN, Aung WL, Chuah J, Ziegler AD, Yasiri A, Sawangjaroen N, Lim YA, Nissapatorn V. 2017. Pathogenic waterborne free-living amoebae: An update from selected Southeast Asian countries. *PLoS One*. 12(2):e0169448.
- Marciano-Cabral F, Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*. 16:273–307.
- Maschio VJ, Corção G, Rott MB. 2015. Identification of *Pseudomonas* spp. as amoeba-resistant microorganisms in isolates of *Acanthamoeba*. *Rev Inst Med Trop*. 57(1):81-3. doi: 10.1590/S0036-46652015000100012.

- Mi E, Mi E, Jeggo M. 2016. Where to Now for One Health and Ecohealth? *Ecohealth*. 13(1):12-7. doi: 10.1007/s10393-016-1112-1.
- Montoya A, Miró G, Saugar JM, Fernández B, Checa R, Gálvez R, Bailo B, Marino V, Piñero JE, Lorenzo-Morales J, Fuentes I. Detection and molecular characterization of *Acanthamoeba* spp. in stray cats from Madrid, Spain. *Exp Parasitol*. 2018 May;188:8-12.
- Morales JA, Chaves AJ, Visvesvara GS, Dubey JP. 2006. *Naegleria fowleri*-associated encephalitis in a cow from Costa Rica. *Vet Parasitol* 139(1-3):221-23.
- Mulec J, Dietersdorfer E, Üstüntürk-Onan M, Walochnik J. 2016. *Acanthamoeba* and other free-living amoebae in bat guano, an extreme habitat. *Parasitol Res*. 115:1375-83.
- Nunes TET, Brazil NT, Fuentefria AM, Rott MB. 2016. *Acanthamoeba* and *Fusarium* interactions: A possible problem in keratitis. *Acta Trop*. 157:102-07,
- Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakanok L, Jongwutiwes S. 2010. Identification of a novel t17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand. *J Clin Microbiol*. 48(12):4636-40.
- Omaña-Molina M, Vanzzini-Zago V, Hernandez-Martinez D, Gonzales-Robles A, Salazar-Villatoro L, Ramirez-Flores E, Oregon-Miranda E, Lorenzo-Morales J, Martinez-Palomo A. 2016. *Acanthamoeba* genotypes T3 and T4 as causative agents of amoebic keratitis in Mexico. *Parasitol Res*. 15: 873-78.
- OMS: Organização Mundial da Saúde. 2020. **Zoonoses**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>>. Acesso em: 12 ago. 2021.
- Pelandakis M, Serre S, Pernin P. 2000. Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. *J Eukaryot Microbiol*. 47:116-21.
- Pettan-Brewer C, Martins AF, de Abreu DPB, Brandão APD, Barbosa DS, Figueroa DP, Cedieli N, Kahn LH, Brandespim DF, Velásquez JCC, Carvalho AAB, Takayanagui AMM, Galhardo JA, Maia-Filho LFA, Pimpão CT, Vicente CR, Biondo AW. 2021. From the Approach to the Concept: One Health in Latin America-Experiences and Perspectives in Brazil, Chile, and Colombia. *Front Public Health*. 9:687110. doi: 10.3389/fpubh.2021.687110.
- Pimentel LA, Dantas AFM, Uzal F, Riet-Correa F. 2012. Meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in cattle of northeast Brazil. *Res Vet Sci*. 93(2):811-12.
- Pussard M, Pons R. 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*. 13, 557-98.

- Qian Y, Meisler DM, Langston RH, Jeng BH. 2010. Clinical experience with *Acanthamoeba* keratitis at the Cole Eye Institute, 1999-2008. *Cornea*. 29(9):1016-21.
- Qvarnstrom Y, Nerad TA, Visvesvara GS. 2013. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J Eukaryot Microbiol*. 60(6):626–33.
- Reyes-Batlle M, Díaz FJ, Sifaoui I, Rodríguez-Expósito R, Rizo-Liendo A, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. 2021. Free living amoebae isolation in irrigation waters and soils of an insular arid agroecosystem. *Sci Total Environ*. 753:141833.
- Ribeiro GF, Andrade RR, Maizonave CRM, Crossetti LO. 2012. Effects of cyanobacterial summer bloom on the phytoplankton structure in an urban shallow lake, Guaíba Lake, southern Brazil. *Neotropical Biol Conserv*. 7(2):78-87.
- Salazar HC, Moura H, Carvalho FG, Guimaraes Neto, FD, De Jonckheere JF. 1983. A case of Primary Amebic Meningoencephalitis in Rio de Janeiro. In: III International Conference on Small Free-Living Amoebae, Colorado, USA, 1983.
- Sansanayudh W, Cevallos V, Porco TC, Margolis TP, Lietman TM, Acharya NR. 2008. *Fusarium* and *Acanthamoeba* keratitis: can a single centre detect outbreaks? *Br J Ophthalmol*. 92(5):720-21.
- Santos DL, Kwitko S, Marinho DR, Araújo BS, Locatelli CI, Rott, MB. 2018. *Acanthamoeba* keratitis in Porto Alegre (southern Brazil): 28 cases and risk factors. *Parasitol. Res*. 117:747-750.
- Schmitz-Esser S, Toenshoff ER, Haider S, Heinz E, Hoenninger VM, Wagner M, Horn M. 2008. Diversity of bacterial endosymbionts of environmental *Acanthamoeba* isolates. *Appl. Environ. Microbiol*. 74(18):5822-31. doi: 10.1128/AEM.01093-08.
- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ. 2001. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol*. 39(5):1903-11.
- Schuster FL, Visvesvara GS. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol*. 34:1001-27.
- Scliar M. 2007. História do Conceito de Saúde. *PHYSIS: Rev. Saúde Coletiva, Rio de Janeiro*. 17(1):29-41.
- Siddiqui R, Ali IKM, Cope JR, Khan NA. 2016 Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. *Acta Trop*. 164:375-94.

- Siqueira DB, Oliveira-Filho EC. 2005. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. *Universitas Ciências da Saúde*, 3(1):109-27.
- Soares TF. 2020. Meio Ambiente e Saúde Única: o que podemos esperar? *RVBMA*. 8(4):74-80.
- Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ. 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.
- Taravaud A, Fectali-Moute Z, Loiseau PM, Pomel S. 2021. Drugs used for the treatment of cerebral and disseminated infections caused by free-living amoebae. *Clin Transl Sci*. 14(3):791-805.
- Thewes S, Soldati T, Eichinger L. 2019. Editorial: Amoebae as Host Models to Study the Interaction With Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 9:47.
- Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol*. 60(6):399-405.
- Trabelsi H, Dendana F, Neji S, Sellami H, Cheikhrouhou F, Makni F, Ayadi A. 2016. Morphological and molecular identification of free living amoeba isolated from hospital water in Tunisia. *Parasitol Res*. 115(1):431-5.
- UN: United Nations. 2021. **Climate and Environment**. Disponível em: <<https://news.un.org/en/story/2021/08/1097362>>. Acesso em 11 ago. 2021.
- Visvesvara GS. 2010. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis*. 23(6):590-94.
- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 50(1):1-26.
- Visvesvara GS, Shoff ME, Sriram R, Booton GC, Crary M, Fuerst PA, Hanley CS, Garner MM. 2010. Isolation, morphologic, serologic and molecular identification of *Acanthamoeba* T4 genotype from the liver of a Temminck's tragopan (*Tragopan temminckii*). *Vet Parasitol*. 170(3-4):197-200.
- Valladares M, Reyes-Batlle M, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Dorta-Gorrín A, Wagner C, Martínez-Carretero E, Piñero JE, Valladares B, Lorenzo-Morales J. 2015. Molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Arch Microbiol*. 197(5):639-43.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 173(2):697-703.

- Woolway RI, Maberly SC. 2020. Climate velocity in inland standing waters. *Nat. Clim. Chang.* 10, 1124-29.
- Yaw TJ, O'Neil P, Gary JM, Ali IK, Cowart JR, Wallace RS, Estep JS. 2019. Primary amebic meningoencephalomyelitis caused by *Naegleria fowleri* in a south-central black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 255, 219-223. doi: 10.2460/javma.255.2.219.
- Yoder JS, Eddy BA, Visvesvara GS, Capewell L, Beach MJ. 2010. The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. *Epidemiol Infect.* 138:968-75.

## 9. APÊNDICES

9.1 Apêndice I: Material suplementar do artigo “Imidazolium salt inactivates trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* spp. from patients with keratitis - a promising disinfectant for contact lenses and surfaces”

### Support information

#### **Imidazolium salt inactivates trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* spp. from patients with keratitis - a promising disinfectant for contact lenses and surfaces**

Denise Leal dos Santos<sup>a</sup>, Beni Jequicene Mussengue Chaúque<sup>a,b</sup>, Francisco Kercher Berté<sup>a</sup>, Vinícius Demétrio da Silva<sup>c</sup>, Amanda Schmeling Franceschi<sup>e</sup>, Diane Ruschel Marinho<sup>d</sup>, Sergio Kwitko<sup>d</sup>, Claudete Inês Locatelli<sup>d</sup>, Eduarda Correa Freitas<sup>d</sup>, Ana Luiza Ziulkoski<sup>e</sup>, Henri Stephan Schrekker<sup>c</sup>, Marilise Brittes Rott<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Setor de Parasitologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, Centro Histórico, 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Science, Technology, Engineering and Mathematics, Universidade Rovuma, Niassa Branch, Mozambique.

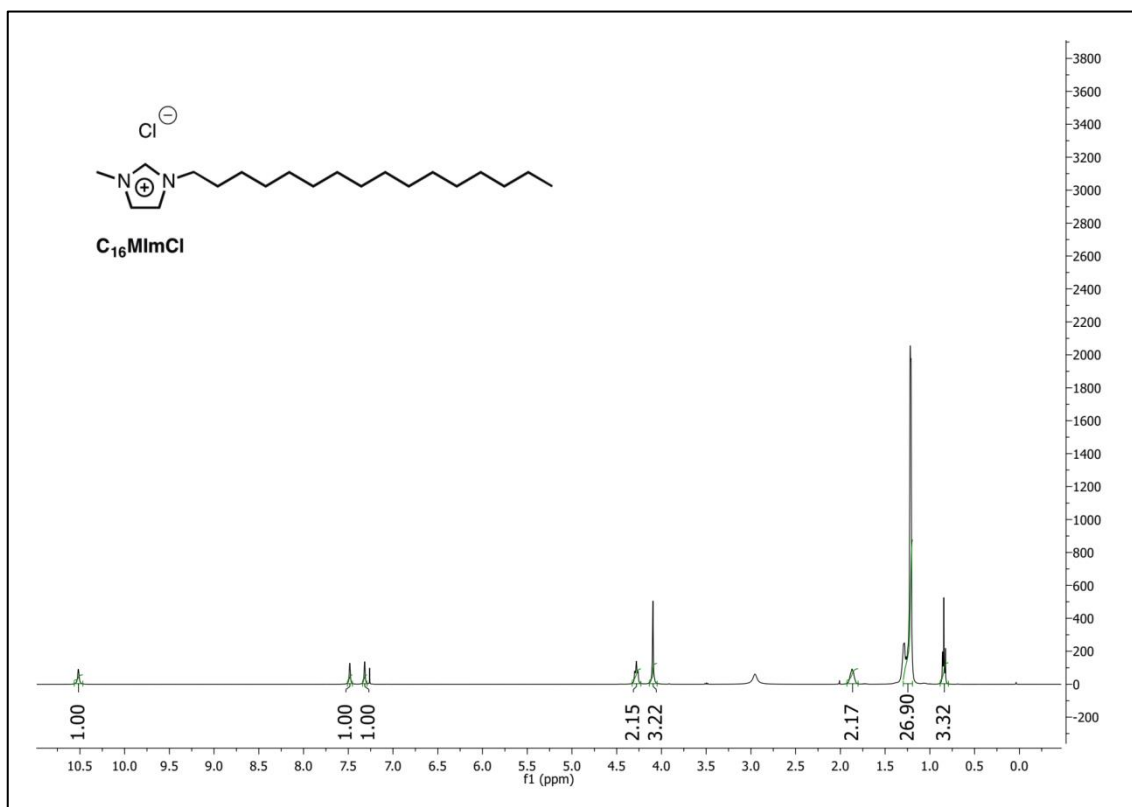
<sup>c</sup>Laboratory of Technological Processes and Catalysis, Institute of Chemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil.

<sup>d</sup> Departamento de Córnea, Serviço de Oftalmologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90035-903, Brazil.

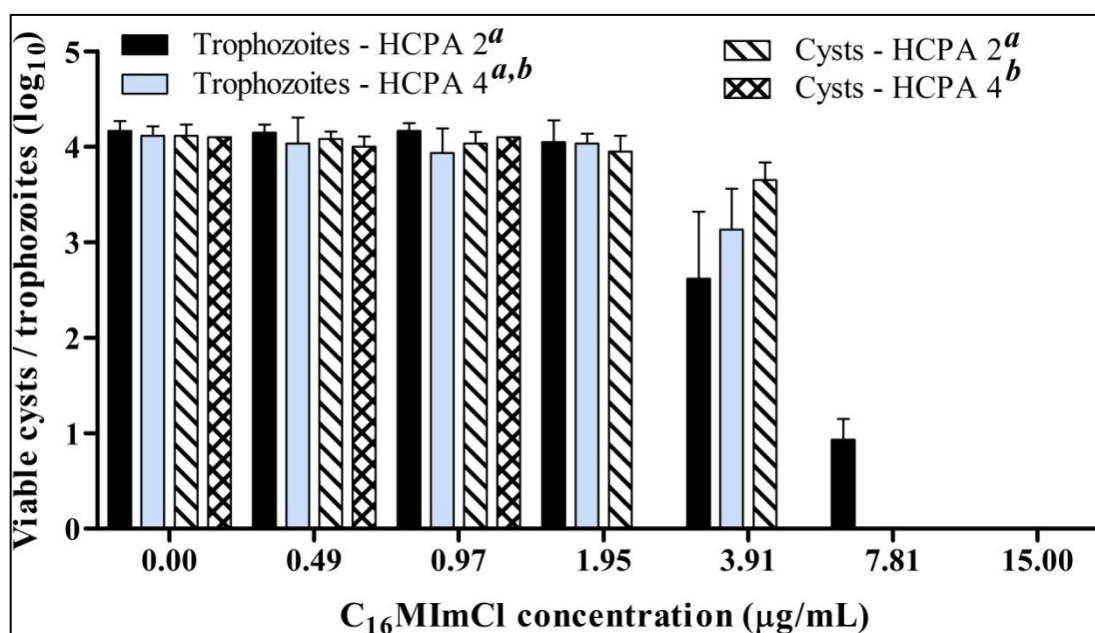
<sup>e</sup>Laboratório de Citotoxicidade, Instituto de Ciências da Saúde, campus II, Universidade Feevale/RS.

Corresponding author: Marilise Brittes Rott\*

Email: [marilise.rott@ufrgs.br](mailto:marilise.rott@ufrgs.br)



**Figure S1.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of  $\text{C}_{16}\text{MImCl}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figure S2:** Comparison of the susceptibility of cysts and trophozoites of the HCPA 2 and HCPA 4 isolate exposed to  $\text{C}_{16}\text{MImCl}$  for 24 h. Captions marked with different letters indicate that they are statistically different from each other.



9.2 Apêndice II: Material suplementar do artigo “Amoebae collection: recovery and conservation method of monoxenic and axenic cultures of free-living amoebae”.

### Supplementary information

#### **Amoebae collection: recovery and conservation method of monoxenic and axenic cultures of free-living amoebae**

Denise Leal dos Santos<sup>a</sup>, Vitor Hugo Zeilmann Guedes<sup>a</sup>, Fernanda Fraga Matiazo<sup>a</sup>, Marilise Brittes Rott<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Setor de Parasitologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, Centro Histórico, 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

Corresponding author: Marilise Brittes Rott\*

Mailing address MBR: Laboratory 311, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Department of Parasitology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmento Leite Street, N 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90050-170, Brazil. Tel: +55 51 3308 4537 and +55 51 999530060. E-mail: [marilise.rott@ufrgs.br](mailto:marilise.rott@ufrgs.br)

**Table S1:** Results of monoxenic plates cultivate (triplicate)

---

**Monoxenic Plates Cultivation- Triplicate**

<b>Plates</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Plates</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	Positive	Positive	Positive	<b>11</b>	Positive	Positive	Positive
<b>2</b>	Positive	Positive	Positive	<b>12</b>	Negative	Negative	Negative
<b>3</b>	Positive	Positive	Positive	<b>13</b>	Positive	Negative	Negative
<b>4</b>	Positive	Positive	Positive	<b>14</b>	Negative	Negative	Negative
<b>5</b>	Positive	Positive	Positive	<b>15</b>	Positive	Negative	Positive
<b>6</b>	Positive	Positive	Positive	<b>16</b>	Positive	Negative	Positive
<b>7</b>	Positive	Positive	Positive	<b>17</b>	Positive	Positive	Positive
<b>8</b>	Positive	Positive	Positive	<b>18</b>	Positive	Positive	Positive
<b>9</b>	Positive	Positive	Positive	<b>19</b>	Positive	Positive	Positive
<b>10</b>	Positive	Positive	Positive	<b>20</b>	Positive	Positive	Positive

---

## 10. ANEXOS

Os anexos (arquivos em PDF) serão enviados por e-mail à Banca.

10.1 Anexo I: Checklist do COHERE

10.2 Anexo II: Guideline da revista AAPS PHARMSCITECH

10. Anexo IV: Guideline da revista Parasitology Research