

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**IDENTIFICAÇÃO DE ENDOSSIMBIONTES EM ISOLADOS DE
ACANTHAMOEBA SPP.**

Dissertação de Mestrado

Vinicius José Maschio

Porto Alegre, 2013.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**IDENTIFICAÇÃO DE ENDOSSIMBIOTES EM ISOLADOS DE
ACANTHAMOEBA SPP.**

Vinicius José Maschio

Biomédico – UNOESC

Dissertação de Mestrado apresentada como
um dos pré-requisitos para obtenção do grau
de Mestre em Microbiologia Agrícola e do
Ambiente

Orientadora: Dra. Marilise Brittes Rott

Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil

Fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, pelo dom da vida e por estar sempre presente nela!

Aos meus pais, Moacir e Clarice, por me ensinarem o verdadeiro valor da vida, norteando-me e lapidando-me em preceitos éticos, honrosos e humanitários. Amo vocês!

As minhas irmãs Julia e Marina, pelo afeto, amor e carinho!

A minha namorada, Keli, pelo companheirismo, amor e compreensão!

A professora Marilise, por ter aceitado me orientar neste trabalho, pelos ensinamentos, amizade, apoio e confiança! MUITÍSSIMO OBRIGADO!

Aos colegas e amigos dos laboratórios do PPGMAA, Carol, Ana Maris, Lua, Ismael, Éder, Jú, Karin, Francielle, Fabrício, Natália, Rene. Muito obrigado pelos ensinamentos, mas principalmente pelos momentos engraçados e ilustres que juntos presenciamos! Obrigado por tudo!

A professora Gertrudes pela imensa colaboração no meu trabalho!

Aos demais professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, pela atenção e colaboração.

Aos professores do setor de Parasitologia pela amizade e colaboração!

Ao Capes, pelo apoio financeiro.

IDENTIFICAÇÃO DE ENDOSSIMBIOTES EM ISOLADOS DE *ACANTHAMOEBA* SPP.¹

Autor: Vinicius José Maschio

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilise Brittes Rott

RESUMO

Amebas de vida livre (AVL) do gênero *Acanthamoeba* estão distribuídas mundialmente e habitam uma ampla variedade de nichos ambientais. *Acanthamoeba* pode ser considerada um importante veículo de patógenos humanos por abrigar inúmeras bactérias endossimbiontes. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o potencial patogênico de 12 isolados de *Acanthamoeba* previamente isoladas de estojos de lentes de contato e ductos de ar condicionado usando testes de osmotolerância e termotolerância, bem como caracterizar e identificar a comunidade de endossimbiontes presentes, utilizando duas técnicas de biologia molecular, a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante). Dentre os isolados estudados ¼ destes, foram considerados potencialmente patogênicos a partir dos testes de osmotolerância e termotolerância. Todos os isolados quando submetidos à PCR demonstraram a presença de endossimbiontes, sendo que todos continham bactéria do gênero *Pseudomonas* spp. Não foi possível confirmar a presença de microorganismos da família *Legionellaceae* bem como da ordem *Chlamydiales*. A DGGE possibilitou caracterizar a diversidade bacteriana nos isolados de *Acanthamoeba*, entretanto a identificação de bactérias através desta metodologia apresentou-se comprometida, sendo que apenas 2 espécies bacterianas, *Paenibacillus glucanolyticus* e *Candidatus* Protochlamydia amoebophila, foram identificadas, nos isolados A2 e A12 respectivamente. As demais bandas sequenciadas apresentaram similaridade para bactérias incultiváveis, sem que espécie ou gênero pudessem ser identificados. Os resultados deste primeiro estudo de identificação e caracterização de endossimbiontes em isolados de *Acanthamoeba* oriundas da cidade de Porto Alegre/RS confirmam a presença de isolados de *Acanthamoeba* carreadoras de endossimbiontes e demonstram que diferentes populações bacterianas estão internalizadas nessas amebas.

Palavras - Chave: *Acanthamoeba*; Endossimbiontes; PCR; DGGE.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil (66 p.). Fevereiro, 2013.

IDENTIFICATION OF ENDOSYMBIONTS IN ISOLATES OF *ACANTHAMOEBA* SPP.¹

Author: Vinicius José Maschio

Advisor: Prof^a. Dr^a. Marilise Brittes Rott

ABSTRACT

Free-living amoebae (AVL) of the genus *Acanthamoeba* are distributed worldwide and inhabit a wide variety of environmental niches. *Acanthamoeba* can be considered an important vehicle for human pathogens harbor numerous bacteria endosymbionts. This study aimed to characterize the pathogenic potential of *Acanthamoeba* isolates from 12 previously isolated from contact lens cases and air conditioning ducts using assessed by osmotolerance and temperature tolerance as well as identify and characterize the community of endosymbionts present, using two techniques molecular biology, PCR (Polymerase Chain Reaction) and DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Among the isolates studied $\frac{1}{4}$ these were considered potentially pathogenic from tests osmotolerance and temperature tolerance. All strains when subjected to PCR demonstrated the presence of endosymbionts, all of which contained bacteria of the genus *Pseudomonas* spp. It was not possible to confirm the presence of microorganisms of family Legionellaceae and order Chlamydiales. The DGGE enabled characterization of bacterial diversity in the strains of *Acanthamoeba*, however the identification of bacteria using this methodology appeared compromised, with only two bacterial species, *Paenibacillus glucanolyticus* and *Candidatus Protochlamydia amoebophila* were identified in isolates A2 and A12 respectively. The other bands showed similarity to sequenced uncultivable bacteria, without which species or genus could be identified. The results of this first study of identification and characterization of endosymbionts in *Acanthamoeba* isolates deriving from the city of Porto Alegre / RS confirm the presence of strains of *Acanthamoeba* endosymbionts of carrier and show that different bacterial populations are internalized these amoebae.

Keywords: *Acanthamoeba*; Endosymbionts; PCR; DGGE.

¹Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (66 p.). Fevereiro, 2013.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
	2.1 Amebas de vida Livre (AVL).....	3
	2.2 Gênero <i>Acanthamoeba</i>	5
	2.3 Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp.	8
	2.4 Encefalite amebiana granulomatosa.....	11
	2.5 Endossimbiontes de <i>Acanthamoeba</i> spp.	13
	2.6 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante	16
3	MATERIAS E MÉTODOS.....	19
	3.1 Local de desenvolvimento do trabalho.....	19
	3.2 Isolado de referência contendo endossimbionte e DNA controle positivo para reações da PCR.....	19
	3.3 Culturas Axênicas de <i>Acanthamoeba</i> spp.	20
	3.4 Teste de Osmotolerância.....	20
	3.5 Teste de Termotolerância.....	21
	3.6 Extração de DNA total de <i>Acanthamoeba</i>	22
	3.7 Oligonucleotídeos utilizados no estudo para identificação de endossimbiontes através da PCR convencional.....	23
	3.8 PCR e Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante...	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
	4.1 Caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> spp.	26
	4.2 Identificação de endossimbiontes nos isolados de <i>Acanthamoeba</i> spp.	29
	4.3 Identificação de <i>Legionellaceae</i> , <i>Chlamydiales</i> e <i>Pseudomonas</i> spp. através da PCR.....	32
	4.4 Utilização da técnica de DGGE para caracterização da populações bacteriana e identificação de endossimbiontes.....	35

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
6. BIBLIOGRAFIA.....	44
ANEXOS.....	55
ANEXO A. Meio Proteose Peptona - Extrato de Levedo - Glicose (PYG).....	55

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Genótipos de <i>Acanthamoeba</i> e suas associações com doenças humanas.....	8
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados no estudo de endossimbiontes.....	23
Tabela 3. Grupo genotípico e características de termotolerância e osmotolerância dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> spp.	27
Tabela 4. Máxima porcentagem de similaridade encontrada entre sequências obtidas através da PCR para o gênero <i>Pseudomonas</i> spp. e sequências publicadas no <i>Genbank</i> (banco de sequências nucleotídicas do NCBI)	34
Tabela 5. Máxima porcentagem de similaridade encontrada entre sequências obtidas através da PCR 16s domínio BACTERIA e sequências, publicadas no <i>Genbank</i> (banco de sequências nucleotídicas do NCBI)	39

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Artigos científicos publicados nas últimas cinco décadas.....	4
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i>	6
Figura 3: Fatores de risco que contribuem para a ceratite amebiana.....	9
Figura 4: Ceratite amebiana em humano.....	10
Figura 5: Secção coronal dos hemisférios cerebrais apresentando necrose cortical e subcortical em um caso humano de encefalite granulomatosa amebiana fatal.....	12
Figura 6: Análise molecular do gene 16s rRNA para identificação de isolados de <i>Acanthamoeba</i> spp. portadores de endossimbiontes	30
Figura 7: Análise molecular através da PCR para identificação de <i>Pseudomonas</i> nos isolados de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	33
Figura 8: Avaliação da comunidade bacteriana através de DGGE.....	36
Figura 9: Dendrograma de proximidade genética pelo método de Neighbor-joining entre as amostras sequenciadas e sequências externas utilizando o programa MEGA 5.1.....	40

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

- % - Porcento
- °C – Graus Celsius
- AVL - Ameba De Vida Livre
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- DNA – Ácido Desoxiribonucléico
- dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- DGGE - Eletroforese em gel com gradiente desnaturante
- EAG - Encefalite Amebiana Granulomatosa
- FISH - Hibridização Fluorescente *in situ*
- M - Manitol
- MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
- mL - Mililitro
- mM – Micro Molar
- mm - Milímetro
- NaCl – Cloreto de Sódio
- PBS - *Phosphate buffered saline* (Tampão Fosfato Salino)
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- pmol - Picomol
- PYG - Meio Protease, peptona e extrato de levedura
- rRNA - Ácido Ribonucléico Ribossomal
- SDS - Dodecil Sulfato De Sódio
- SNC - Sistema Central Nervoso
- TAE – Tris acetato EDTA
- Tris – Hidroximetil aminometano
- HCl – Ácido clorídrico
- µg - Microgramas
- µL – Microlitros

1. INTRODUÇÃO

Protozoários do gênero *Acanthamoeba* spp. constituem um grupo amplamente distribuído no meio ambiente, sendo encontrados no solo, água, poeira, ar, além de serem largamente distribuídos em ambientes antropogênicos. Essas amebas possuem capacidade de viver como organismos de vida livre e eventualmente habitar um hospedeiro causando-o dano e por esse motivo são chamadas de anfizóicas. Algumas espécies podem comportar-se como parasitos facultativos de seres humanos e de animais domésticos, causando infecções consideradas acidentais e/ou oportunistas, como a Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) e Ceratite Crônica Amebiana (KHAN, 2006).

Além de possuir grande relevância à área médica e ambiental, outra característica importante de *Acanthamoeba* spp. é a de desempenhar a função de carreador de microrganismos patógenos, como algumas bactérias, fungos, vírus e até outros protozoários como *Cryptosporidium* sp., estabelecendo assim uma associação endossimbiótica com esses microrganismos. Estas geralmente são encontradas hospedando patógenos como *Mycobacterium* spp., *Legionella* spp., *Chlamydia* spp., *Parachlamydia* spp., *Listeria* spp.,

Burkholderia spp., *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella enterica*, *Francisella tularensis* e *Simkania negevensis* bem como outros microorganismos procarióticos ainda não classificados taxonomicamente (GREUB & RAOULT, 2004; ADÉKAMBI *et al.*, 2006).

Assim, a característica de ubiquidade de *Acanthamoeba* spp., e a presença de um estágio de cisto, sendo esse resistente às adversidades do ambiente bem como ao tratamento e a sua habilidade em suportar o crescimento de uma variedade de patógenos intracelulares elevam a importância deste microrganismo frente a epidemiologia (FRITSCHE *et al.*, 2000). Desta forma, amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* spp. são extremamente importantes por serem potencialmente patogênicas para humanos além de poderem atuar como “cavalos de tróia”, podendo estar naturalmente infectadas com bactérias e estas relacionadas com infecções humanas. Logo, a identificação e caracterização de bactérias resistentes a amebas são de grande importância visto que esses microorganismos podem exacerbar as infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. (HEINZ *et al.*, 2007).

Assim sendo, este estudo teve como objetivo identificar endossimbiontes em isolados de *Acanthamoeba* spp. bem como avaliar a capacidade da técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) como ferramenta de “screening” e identificação destas bactérias.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Amebas de Vida Livre (AVL)

As amebas de vida livre (AVL) constituem um grupo de protozoários amplamente distribuídos na natureza, ocorrendo no solo, ar, água, poeira e também na orofaringe de indivíduos saudáveis, sendo que algumas espécies podem comportar-se como parasitos facultativos de seres humanos e animais domésticos (LARKIN *et al.*, 1990; WALOCHNIK *et al.*, 2002; KHAN, 2003; SCHUSTER & VIVESVARA, 2004). Os cistos desse grupo de amebas resistem a extremas condições de pH e temperatura, assim como ao cloro e a certos sistemas de desinfecção. Além disso, em seu interior, bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* e *Legionella* spp., além de fungos, vírus, outros protozoários e até mesmo algas podem ser utilizados como substrato alimentar (AKSOZEK *et al.*, 2002; ALVES, 2001; KHAN, 2006).

Ao contrário dos "verdadeiros" parasitos, AVL podem completar seu ciclo de vida no meio ambiente, sem passar por um hospedeiro humano ou animal, ou seja, podem ou não causar patologias, caracterizando-os como microorganismos anfitriões. Das AVL que são encontradas no meio ambiente,

três gêneros têm sido associados a doenças humanas. Uma espécie do gênero *Naegleria*, *N. fowleri*, uma espécie de *Balamuthia*, *B. mandrillaris* e várias espécies de *Acanthamoeba* que podem causar infecção fatal no sistema nervoso central (SNC) e além desta, *Acanthamoeba* spp. podem causar lesões cutâneas e ceratite amebiana (SIDDIQUI & KHAN, 2012).

Entretanto nos últimos anos, *Acanthamoeba* spp. tem obtido grande destaque quando comparada a outras AVL devido ao aumento da incidência deste protozoário associado principalmente a casos de ceratite, bem como os inúmeros estudos de interação de *Acanthamoeba* spp. com outros microorganismos (bactérias, fungos, leveduras, protozoários) que vem sendo publicados (SIDDIQUI & KHAN, 2012) (Figura 1).

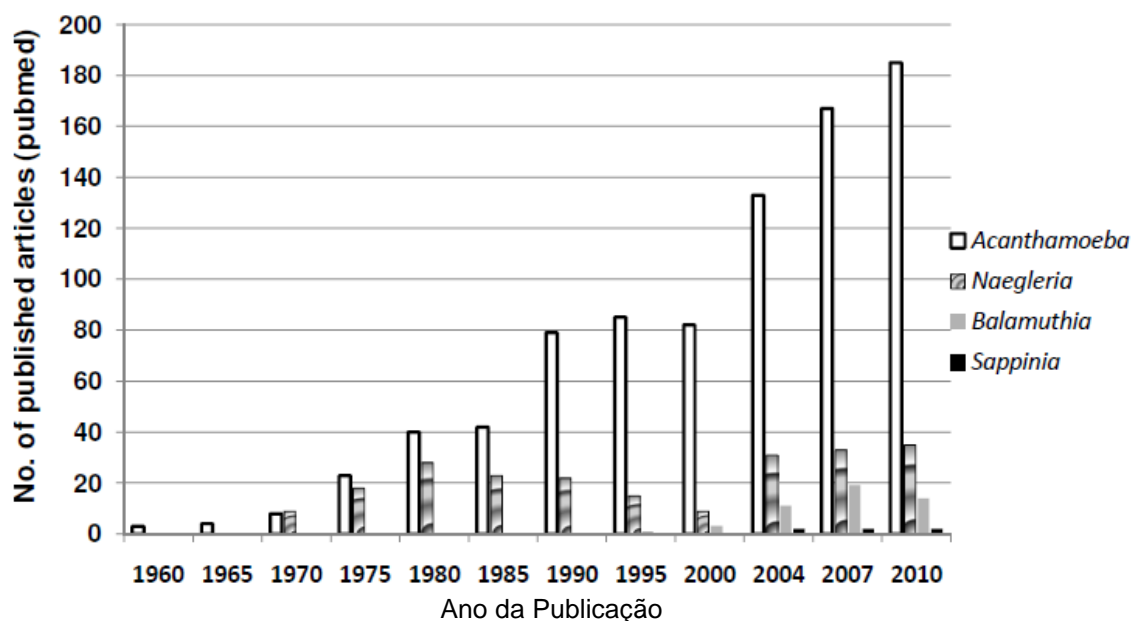


Figura 1: Artigos científicos publicados nas últimas cinco décadas. Busca feita em www.pubmed.com utilizando as palavras "*Acanthamoeba*", "*Balamuthia*", "*Naegleria*" "ou" "*Sappinia*". Fonte: Siddiqui & Khan, 2012.

2.2 Gênero *Acanthamoeba*

Acanthamoeba spp. são amebas de vida livre com característica ubiquitária e anfizóica, sendo amplamente distribuída no ambiente (SIDDIQUI & KHAN, 2012). Esse protozoário tem sido isolado de diversos locais tais como, água de torneira (WINCK *et al.*, 2011), ambiente hospitalar (CARLESSO *et al.*, 2010), água de piscina (CAUMO *et al.*, 2009) e outros. Protozoário pertencente ao filo Sarcomastigophora e sub-filo Sarcodina, *Acanthamoeba* spp. possui dois estágios em seu ciclo de vida, o trofozoíto e o cisto. Os trofozoítos representam a forma metabolicamente ativa, dividem-se assexuadamente, possuindo normalmente um tamanho aproximado de 12-35 μm de diâmetro, podendo variar entre isolados pertencentes a diferentes espécies/genótipos (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; KHAN, 2006).

O outro estágio é representado pelo cisto, uma estrutura de dormência formada quando o trofozoíto se encontra em situações de adversidade, como deficiência nutricional do meio, dessecação, alterações no pH, temperatura, entre outras (MARCIANO CABRAL & CABRAL, 2003; AKSOZEK *et al.*, 2002; COULON *et al.*, 2010). Os cistos medem 13-23 μm , possuem poros conhecidos como ostíolos, que são usados para monitorar mudanças ambientais. Essa forma pode permanecer viável por muitos anos, e em condições favoráveis, os trofozoítos emergem dos cistos através dos poros (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008) (Figura 2).

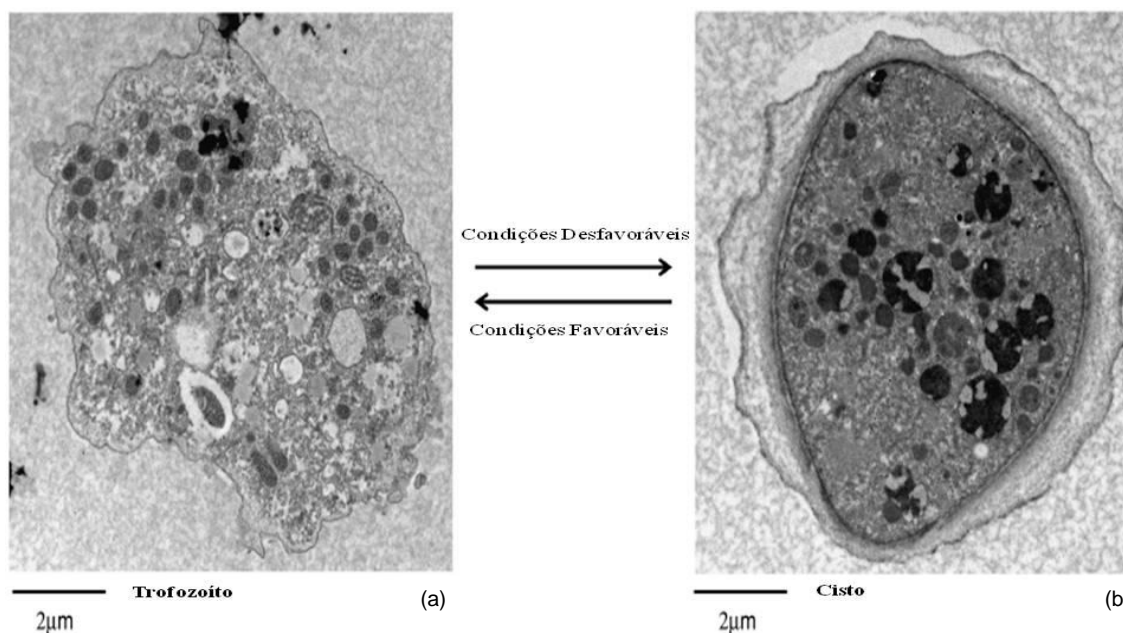


Figura 2: Ciclo de vida de *Acanthamoeba*: (a) Trofozoíto de *Acanthamoeba* (b) Cisto de *Acanthamoeba*, forma de resistência em condições desfavoráveis, caracterizados pela dupla parede. Sob condições favoráveis o trofozoíto emerge do cisto. Fonte: Siddiqui & Khan, 2012.

Acanthamoeba foi descoberta em 1930 por Castellani ao examinar culturas da levedura *Cryptococcus pararoseus* (CASTELLANI, 1930). No ano seguinte, Volkonsky classificou a nova ameba como *Hartmanella castellanii* (VOLKONSKY, 1931). Entretanto esta classificação inicial ficou mal definida, sendo que a mesma baseava-se tanto na presença do cisto com parede dupla bem como na posição das fibras do fuso durante a mitose. Nos anos 1960 e 1970, ficou claro que um novo sistema de classificação era necessário, pois mais espécies de *Acanthamoeba* começaram a ser descritas. Este novo modo de classificação dividiu *Acanthamoeba* spp. em três grupos com base na morfologia, tamanho e forma do cisto (PAGE 1967; PUSSARD & PONS, 1977).

No entanto, a classificação baseada no tamanho e forma do cisto não era confiável, visto que a morfologia dos cistos podia mudar devido às condições de cultura. Além disso, este sistema de classificação não incorporou

critérios bioquímicos ou imunológicos (DAGGETT *et al.*, 1985; STRATFORD & GRIFFITHS, 1978). Em 1991, Visvesvara criou um novo sistema de classificação de espécies dividindo *Acanthamoeba* spp. em três subgrupos diferentes com base na morfologia, análise de isoenzimas e sorologia. Entretanto determinantes antigênicos e padrões de isoenzimas também podem mudar quando as cepas são cultivadas em diferentes condições (JACOBSON & BAND, 1987; WEEKERS & JONCKHEERE, 1997).

Atualmente, *Acanthamoeba* spp. é dividido em 17 genótipos com base em sequências de genes de rRNA (T1 - T17) (Tabela 1) (DAGGETT *et al.*, 1985; COTE *et al.*, 1991; SIDDIQUI & KHAN, 2012). Cada genótipo exibe 5% ou mais de divergência de sequência entre os diferentes genótipos. A maioria das infecções humanas ocasionadas por *Acanthamoeba* está associada com isolados do genótipo T4, sendo que mais de 90% dos casos de ceratite amebiana por *Acanthamoeba* estão relacionados com este genótipo. Do mesmo modo, T4 foi o principal genótipo associado às demais infecções causadas por esse protozoário. Atualmente, não está claro porque isolados T4 são mais abundantes em infecções humanas, mas é provável que uma maior virulência, propriedades que melhoram a sua transmissibilidade bem como a sua sensibilidade reduzida à agentes quimioterápicos sejam os fatores que contribuem para seu alto índice nas infecções (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; SIDDIQUI & KHAN, 2012). Estudos futuros irão identificar traços de virulência e marcadores genéticos limitados apenas a determinados genótipos que poderão ajudar a esclarecer essas questões.

Genótipo	Doença
T1	Encefalites
T2a	Ceratites
T2b	NA (Não associado)
T3	Ceratites
T4	Ceratites e Encefalites
T5	Ceratites e Encefalites
T6	Ceratites
T7	NA
T8	NA
T9	NA
T10	Encefalites
T11	Ceratites
T12	Encefalites
T13	NA
T14	NA
T15	NA
T16	NA
T17	NA

Tabela 1. Genótipos de *Acanthamoeba* e suas associações com doenças humanas Fonte: Siddiqui e Khan, 2012.

2.3 Ceratite por *Acanthamoeba*

Desde 1973, tem sido reconhecido que *Acanthamoeba* spp. pode causar ceratite, patologia essa definida como uma inflamação crônica da córnea e que pode causar cegueira em casos não tratados (GARDUÑO-VIEYRA *et al.*, 2011). Na maioria dos casos, a ceratite ocorre em usuários de lentes de contato imunocompetentes que não conseguem de forma eficaz descontaminar suas lentes, sendo que surtos têm sido associados ao uso de soluções para limpeza e conservação de lentes de contato contaminadas com *Acanthamoeba* (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003). Entretanto, outras formas de contaminação podem levar à ceratite acantamebiana (Figura 3).

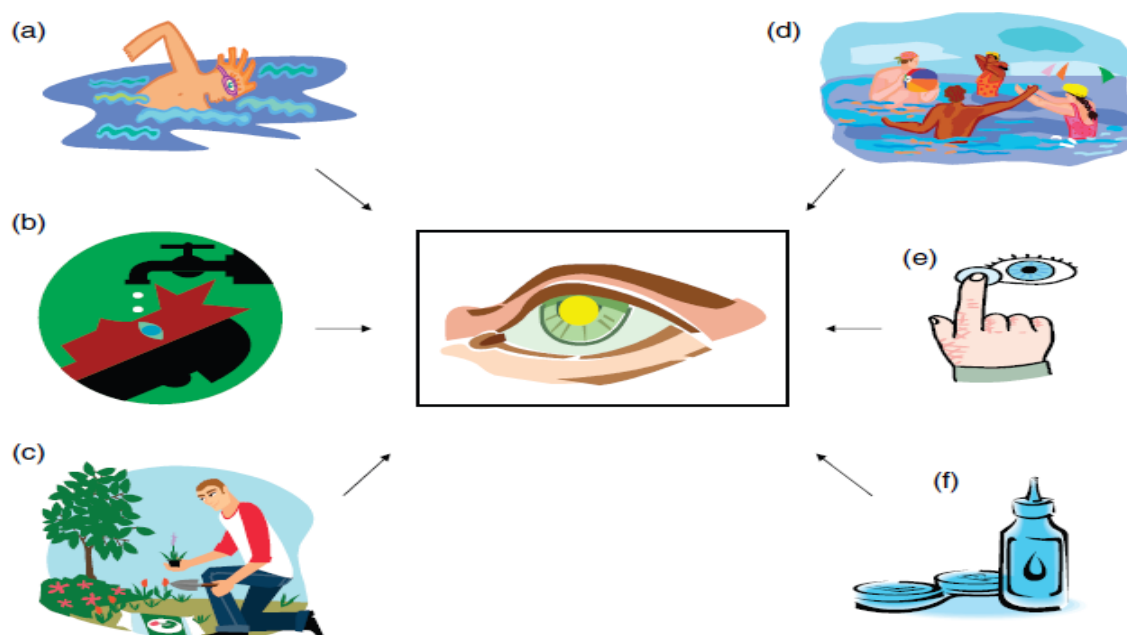


Figura 3: Fatores de risco que contribuem para a ceratite amebiana: (a) natação, especialmente usando lentes de contato; (b) lavar os olhos com água de torneira usando lentes de contato; (c) trabalhar com o solo sem proteção ocular; (d) exercer atividades relacionadas à água (em piscinas ou praias); (e) manipular lentes de contato com as mãos sujas; (f) usar solução salina caseira para a limpeza e conservação das lentes de contato. Fonte: KHAN, 2006.

Quando em contato com a córnea, os trofozoítos aderem e penetram no epitélio. Esta aderência é mediada por uma proteína da membrana do trofozoíto, que se liga à manose de glicoproteínas do epitélio. Estudos sugerem que enzimas como neuraminidase, elastase e várias proteases produzidas pelo protozoário podem ser fatores que determinam a infecção por *Acanthamoeba*. Após a penetração, o quadro clínico segue com ulceração, infiltrado neutrofílico em forma de anel e inflamação (Figura 4) (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; GARDUÑO-VIEYRA *et al.*, 2011). Substâncias como Imunoglobulina A e proteases, presentes no fluido lacrimal, garantem a proteção a indivíduos saudáveis, uma vez que impedem a aderência de *Acanthamoeba*, processo chave na patogenia da ceratite (SARAVANAN *et al.*, 2008).

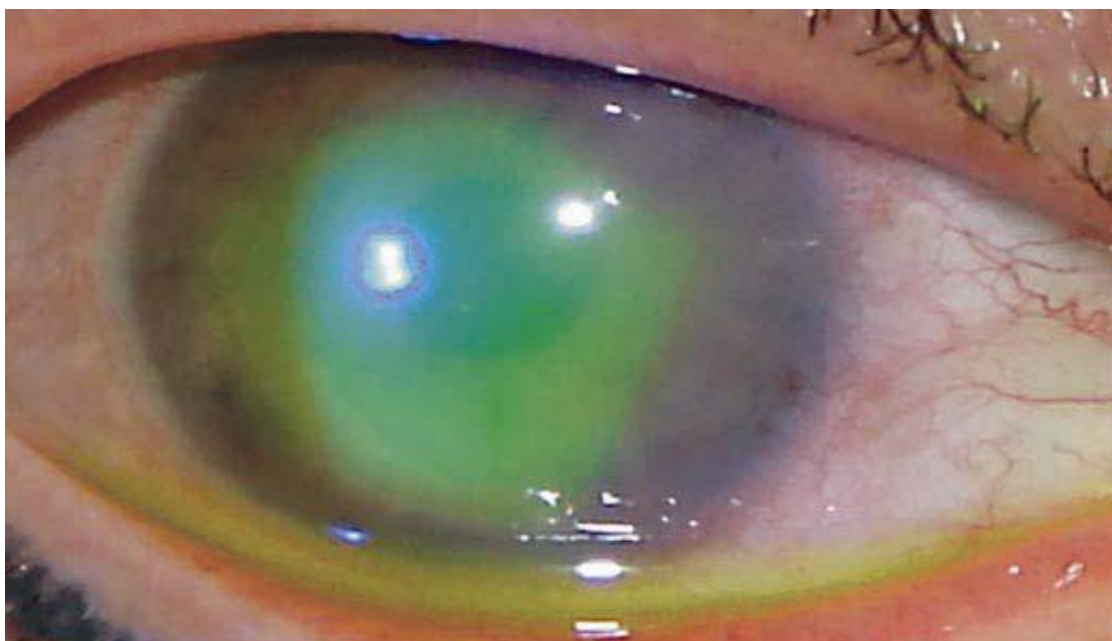


Figura 4: Ceratite amebiana em humano. Infiltrado neutrofilico em formato de anel característico. Fonte: Garduño-Vieyra *et al.*, 2011.

O diagnóstico clínico pode ser feito baseado na constatação de lesões epiteliais, infiltrado estromal, ceratoneurite radial associado a sintomas como dor intensa e fotofobia (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; TRNKOVÁ *et al*, 2009). Raspado de córnea e material de biópsia podem ser utilizados para cultura e identificação do agente etiológico, (KILVINGTON *et al*, 1990; SCHAUMBERG *et al*, 1998). A PCR tem tido uma baixa utilização, apesar de sua eficácia como ferramenta diagnóstica capaz de detectar DNA de *Acanthamoeba* em amostras da córnea e inclusive em lágrimas contendo um máximo de cinco amebas (KIM *et al*, 1996; KONG & CHUNG, 1996; KHAN *et al*, 2001).

O desenvolvimento da ceratite amebiana não ocorre somente pelo simples contato da *Acanthamoeba* com o epitélio ocular, visto que a presença deste protozoário é frequente em usuários de lentes de contato, porém de forma assintomática, sendo que 50% dos indivíduos saudáveis possuem

anticorpos contra *Acanthamoeba* (LARKIN *et al*, 1990; TANAKA *et al*, 1994). Isso levanta a hipótese de que outros fatores possam estar envolvidos na patogênese desta doença e que o sistema imune do paciente pode exercer um papel fundamental na predisposição à doença. A carga parasitária infectante, por exemplo, pode contribuir para o estabelecimento ou não da infecção. Deve-se levar em consideração, também, que cepas de ameba podem variar quanto a sua patogenicidade.

Além disso, a presença de AVL não patogênicas ou de baixo potencial patogênico em lentes de contato, é um fato que não deve ser desconsiderado no desenvolvimento de ceratite, pois elas podem albergar bactérias e agir como seus veículos. *Pseudomonas aeruginosa*, um dos principais patógenos oculares, pode sobreviver e já foi isolada dos cistos de *Acanthamoeba* spp. (WALOCHNIK *et al*, 1999).

2.4 Encefalite amebiana granulomatosa

Embora a ceratite amebiana seja a patologia mais comum associada com infecção por *Acanthamoeba*, encefalite amebiana granulomatosa (EAG) é a doença mais grave e geralmente fatal associada com esse microorganismo (KHAN, 2006). EAG acomete quase que exclusivamente indivíduos imunocomprometidos, é caracterizada por ser uma doença de curso clínico prolongado, com um quadro subagudo ou crônico, provocada por várias espécies de amebas do gênero *Acanthamoeba*. Na EAG, tanto a pele como o trato neuro-olfativo servem como porta de entrada para a ameba, sendo que processos inflamatórios primários podem ser observados nesses locais

(WALOCHNIK *et al.*, 2002). A patogênese da infecção envolve necrose hemorrágica grave, edema moderado a intenso com lesões multifocais, exsudato crônico inflamatório e vasculite com linfócitos perivasculares. Comumente, trofozoítos podem ser encontrados nos tecidos recobertos por células inflamatórias constituindo a forma granulomatosa típica desta infecção. No entanto, esta forma pode apresentar-se ausente ou pouco nítida em pacientes com resposta imune muito debilitada (MARTINEZ & VISVESVARA, 1997; VISVESVARA *et al.*, 2007).

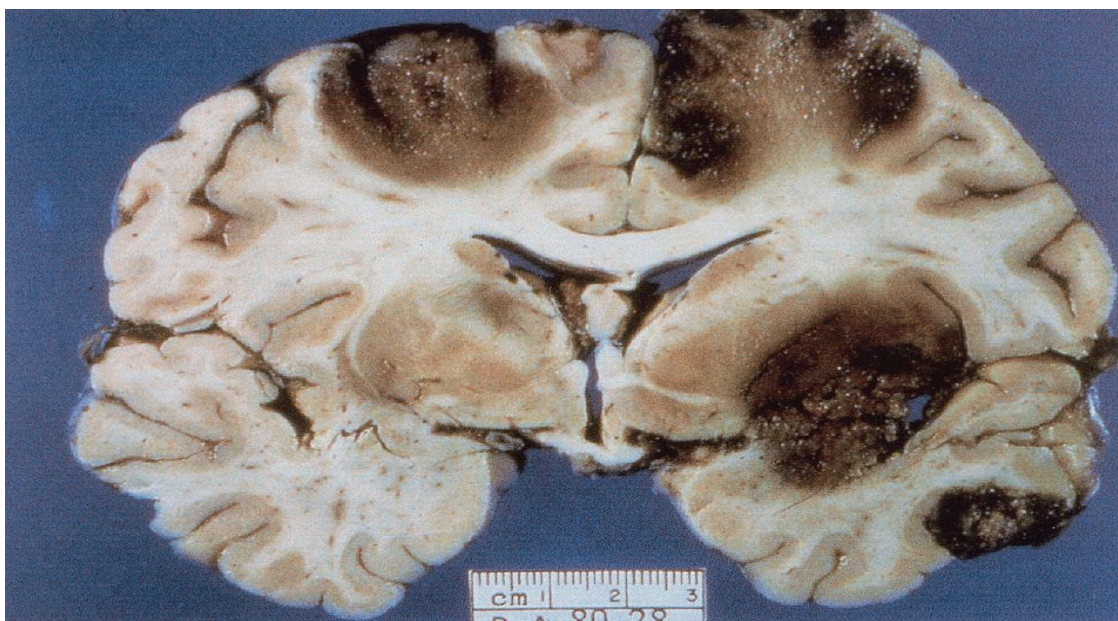


Figura 5: Secção coronal dos hemisférios cerebrais apresentando necrose cortical e subcortical em um caso humano de encefalite granulomatosa amebiana fatal. Fonte: MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003.

Para pacientes com sintomas neurológicos, o diagnóstico pode ser citopatológico, utilizando amostra de fluido cérebro espinal (SHARMA *et al.*, 1993; SINGHAL *et al.*, 2001). Métodos de cultivo também podem ser utilizados no diagnóstico. Amostras biológicas como fluido cérebro espinal e tecido cerebral, podem ser inoculadas em meio de crescimento para ameba

(MARTINEZ & VISVESVARA, 1991). Ressonância magnética e tomografia computadorizada apesar de não fornecerem diagnóstico definitivo, são realizadas em alguns pacientes e ajudam a localizar e reconhecer as lesões características (MARTINEZ & VISVESVARA, 1997).

2.5 Endossimbiontes de *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba é um importante predador no ambiente, pois se alimenta de vários organismos como bactérias, fungos e conseqüentemente atua controlando essas comunidades microbianas (RODRIGUEZ-ZARAGOZA, 1994). No entanto, várias bactérias desenvolveram estratégias para sobreviver à fagocitose e são capazes de se multiplicar dentro de amebas.

Dois tipos diferentes de tais interações podem ser distinguidas. Algumas bactérias desenvolveram mecanismos para explorar as amebas como um “recipiente” para sua replicação, e neste caso a relação com as amebas é apenas transitória (GREUB & RAOULT, 2004). Um exemplo bem estudado é a *Legionella pneumophila*, agente causador da doença do legionário, a replicação intracelular dentro das amebas é considerada um passo importante antes da infecção de seres humanos (MOLMERET *et al.*, 2005). Além disso, o estilo de vida intracelular destas bactérias as protege no ambiente permitindo a elas sobreviver em condições adversas (GREUB & RAOULT, 2004; MOLMERET *et al.*, 2005). O segundo grupo de bactérias que interagem com amebas de vida livre, são capazes de manter uma relação estável com seus hospedeiros e por isso essas bactérias são chamadas de endossimbiontes e aparentemente não prosperam fora de seus hospedeiros. No entanto, a

incapacidade de cultura destas bactérias fora de suas células hospedeiras, neste caso as amebas, prejudica gravemente a sua identificação e a investigação dessas interações simbióticas. Por ser um importante reservatório ambiental de bactérias, o gênero *Acanthamoeba* é também referidos como "cavalos de Tróia" do mundo microbiano (BARKER & BROWN, 1994).

Entre patógenos bacterianos, *Acanthamoeba* é observada como hospedeira e/ou reservatório de *Aeromonas* spp., *Bacillus cereus*, *Bartonella* spp., *Burkholderia* spp., *Burkholderia pickettii*, *Campylobacter jejuni*, *Candidatus Odysella thessalonicensis*, *Chlamydomydia pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Cytophaga* spp., *Escherichia coli* O157, *Escherichia coli* K1 neuropatogênica, *Flavobacterium* spp., *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente, *Mycobacteria tuberculosis*, *M. avium*, *M. leprae*, *Parachlamydia acanthamoebae*, *Pasteurella multocida*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *S. sonnei*, *Simkania negevensis*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Waddlia chondrophila* bem como novos endossimbiontes bacterianos que estão relacionados com *Caedibacter caryophilus*, *Holospora elegans* e *Holospora obtuse*, os quais foram propostos como '*Candidatus Caedibacter Acanthamoebae*', '*Candidatus Paracaedibacter Acanthamoebae*' e '*Candidatus Paracaedibacter symbiosus*' (KHAN, 2006; GREUB & RAOULT, 2004; MOREIRA & BROCHIER-ARMANET, 2008).

Além de bactérias, *Acanthamoeba* tem se mostrado como um

reservatório de uma variedade de vírus, incluindo coxsackievírus, adenovírus, vírus da poliomielite, echovírus, enterovírus, ou o vírus da estomatite vesicular bem como de leveduras, *Cryptococcus neoformans* (STEENBERGEN *et al.*, 2001) *Blastomyces dermatitidis* (STEENBERGEN *et al.*, 2004), *Sporothrix schenckii* (STEENBERGEN *et al.*, 2004), *Histoplasma capsulatum* (STEENBERGEN *et al.*, 2004), *Streptomyces californicus* e *Exophiala dermatitidis*, e protistas, incluindo *Cryptosporidium parvum* (GÓMEZ-COUSO *et al.*, 2007) e *Toxoplasma gondii* (WINIECKA-KRUSNELL *et al.*, 2009).

A capacidade de vários agentes patogênicos bacterianos de sobreviver intracelularmente em *Acanthamoeba* tem sido sugerido como um passo-chave para a evolução de microrganismos ambientais para produzir infecções humanas (SNELLING *et al.* 2006). A interação entre esses parasitos, pode contribuir para a evolução de um (bactéria ou *Acanthamoeba*) ou ambos para se tornar um patógeno bem sucedido ou para a dispersão destes no ambiente, assim sendo, esta área de pesquisa é de grande importância tanto clinica como ambientalmente (SIDDIQUI & KHAN, 2012).

Além do papel de carreadora de bactérias, esses endossimbiontes podem ter uma importante influência sobre a fisiologia e viabilidade do seu hospedeiro. *Parachlamydia acanthamoeba* um endossimbionte da ordem das *Chlamydias*, agente causal de pneumonias, além disso, apresenta-se com possibilidade de transmissão transplacentária (GREUB, 2009; BAUD *et al.*, 2009) este simbiote amebiano também é conhecido tanto por ser simbiótico bem como lítico ao seu hospedeiro, dependendo das condições ambientais, por exemplo, temperatura. Além disso, *P. acanthamoeba* pode inibir o processo

de encistamento em *Acanthamoeba*, estratégia essa, de sobrevivência essencial do seu hospedeiro para evasão de agentes quimioterápicos, dessecação e radiação (LEITSCH *et al.*, 2010).

Além disso, vários endossimbiontes de *Acanthamoeba* são também parasitos de macrófagos humanos (por exemplo, *Legionella*) e sua habilidade de sobreviver na ameba, pode ser uma fase pré-adaptativa para infectar células humanas (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008). A associação ameba-bactéria poderá provocar a perda da susceptibilidade a certos antibióticos, como ocorre no caso de *L. pneumophila* e *Micobacterium avium* quando infectam espécies de *Acanthamoeba*. O mecanismo pelo qual adquirem este tipo de resistência é desconhecido e não há evidências que estes fenótipos possam manter-se fora da ameba (BARKER & BROWN, 1994).

2.6 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Pesquisadores têm buscado metodologias que permitam identificar os microorganismos no ambiente, bem como associá-los a processos biogeoquímicos ou a mudanças ambientais. Entretanto, a maioria dos microorganismos obtidos de amostras ambientais não podem ser cultivados em meios artificiais (AMANN, *et al.* 1995). Assim, as técnicas moleculares podem auxiliar no estudo da ecologia microbiana. Os estudos sobre ecologia microbiana do solo têm avançado pela utilização de métodos moleculares independentes de cultivo, considerando-se que mais de 99% dos microrganismos do solo não são cultiváveis (MALIK *et al.*, 2008). Dentro das técnicas moleculares, as de *fingerprint* são utilizadas a fim de se obter uma

ampla caracterização da estrutura da comunidade microbiana. Em estudos de ecologia microbiana essas técnicas vêm sendo muito utilizadas, devido à rapidez na obtenção de resultados que permitem avaliar muitas amostras de um ou mais ambientes simultaneamente. PCR-DGGE é normalmente empregado para avaliar a estrutura de comunidades microbianas em amostras ambientais sem cultivo (MUYZER *et al.*, 1993; MUYZER & SMALLA, 1998).

A técnica do DGGE consiste na realização de uma eletroforese em gel de gradiente desnaturante, que permite a separação de moléculas de DNA de mesmo tamanho, mas de distinta sequência de nucleotídeos ao longo de um gradiente de desnaturação química. A separação baseia-se na decrescente mobilidade eletroforética de moléculas de DNA, fita dupla, parcialmente desnaturada em géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturação (solução de ureia e formamida) (MUYZER & SMALLA, 1998). O ponto de desnaturação depende da estrutura primária de cada molécula de DNA, já que em uma dupla hélice, os enlaces de três pontes de hidrogênio entre guanina e citosina têm mais estabilidade, quando comparados aos enlaces de duas pontes entre timina e adenina. Em outras palavras, a separação eletroforética neste caso irá depender da quantidade de G+C presente em cada molécula de DNA (MUYZER *et al.*, 1993). Sendo assim, cada produto de PCR com uma sequência distinta desnatura em uma diferente posição. Uma vez alcançada a concentração ideal de desnaturação, ocorre a transição de fita dupla para uma molécula parcialmente desnaturada e esta para de migrar em uma determinada posição do gel. Para prevenir a completa dissociação das duas fitas de DNA, é comum a adição de uma sequência de

30-50 nucleotídeos GC na extremidade 5' de um dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR. O método foi desenvolvido por Fischer e Lerman (1979) e desde então sofreu muitas mudanças e adaptações para seu uso em diferentes campos de pesquisa. O uso da DGGE permitiu observar a evolução de comunidades microbianas ao longo do tempo, em resposta a mudanças de condições fisiológicas e/ou químicas e mudanças ambientais (TESKE *et al.*, 1994; MUYZER & SMALLA, 1998; ROWAN *et al.*, 2003).

As aplicações mais recentes desta técnica são destinadas a estudar a estrutura e evolução das comunidades microbianas do solo (NORRIS *et al.*, 2002; AVRAHAMI *et al.*, 2003; NICOL *et al.*, 2003); do mar (BANO & HOLLIBAUGH, 2002), dos rios (SEKIGUCHI *et al.*, 2002), dos lagos (CRUMP *et al.*, 2003); do trato gastrointestinal (ZOETENDAL *et al.*, 2002); de biorreatores de tratamento de águas residuais (GRAY *et al.*, 2002.; STAMPER *et al.*, 2003); de insetos (REESON *et al.*, 2003) e de amostras clínicas (BURTON *et al.*, 2003; DONSKEY *et al.*, 2003; MC BAIN *et al.*, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de desenvolvimento do trabalho

O trabalho foi realizado no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.2 Isolado de referência contendo endossimbionte e DNA controle positivo para reações da PCR

A cepa empregada como controle positivo neste trabalho foi *Acanthamoeba castellanii* Neff contendo *Protochlamydia amoebophila* UWE25 como simbiote. Para controle positivo da PCR para *Legionellaceae* utilizou-se DNA de *L. pneumophila philadelphia* 1, já para *Chlamydiales* foi utilizado DNA de *Chlamydia tracomatis* e para *Pseudomonas* spp. foi utilizado DNA da cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 278532.

3.3 Culturas Axênicas de *Acanthamoeba*

Acanthamoeba previamente isoladas de estojos de lentes de contato, foram identificadas como (*Acanthamoeba* 1 (A1), *Acanthamoeba* 6 (A6), *Acanthamoeba* 9 (A9), *Acanthamoeba* 11 (A11) e *Acanthamoeba* 12 (A12)) e de ar condicionado identificadas como (*Acanthamoeba* 2 (A2), *Acanthamoeba* 3 (A3), *Acanthamoeba* 4 (A4), *Acanthamoeba* 5 (A5), *Acanthamoeba* 7 (A7), *Acanthamoeba* 8 (A8) e *Acanthamoeba* 10 (A10)) foram mantidas em meio PYG (ANEXO) suplementado com penicilina G potássica (400µl/mL) e estreptomicina (400µl/mL) em temperatura constante de 30 °C.

3.4 Teste de Osmotolerância

Para analisar o efeito da osmolaridade no crescimento de trofozoítos de *Acanthamoeba*, placas de ágar não-nutriente 1,5 %, cobertas com suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 25922), contendo 0,5 M e 1,0 M de manitol foram utilizadas. Placas sob as mesmas condições, porém sem manitol foram usadas como controle do crescimento. Aproximadamente 1000 trofozoítos (inóculo de 25 µL com alcance de 5 mm do centro da placa) foram inoculados no centro das placas e incubadas a 30 °C por até 10 dias. O crescimento dos organismos foi determinado por contagem do número de cistos e trofozoítos a uma distância de aproximadamente 20 mm do ponto de inoculação. Para cada placa, cinco campos microscópicos foram quantificados (microscópio óptico, aumento de 100X). Todos os testes foram realizados em triplicata, com cada isolado de *Acanthamoeba* em uma placa individual. As contagens foram realizadas no décimo dia de incubação. Após as contagens,

áreas das placas dos isolados submetidos às concentrações de 0,5 M e 1,0 M de manitol, foram marcadas e transferidas para placas de ágar não-nutriente 1,5 % com sobrecamada de *E. coli* e incubadas a 30 °C para avaliação da viabilidade.

3.5 Teste de Termotolerância

Para os testes de tolerância à temperatura, placas de ágar não-nutriente 1,5 % cobertas com suspensão de *E.coli* (ATCC 25922) foram utilizadas. Aproximadamente 1000 trofozoítos (inoculo de 25 µL com alcance de 5 mm do centro da placa) foram inoculados no centro das placas e incubadas a 30, 37 e 42 °C por até 10 dias. As placas submetidas a 30 °C foram utilizadas como controle na avaliação do crescimento. O crescimento dos organismos foi determinado por contagem do número de cistos e trofozoítos a uma distância de aproximadamente 20 mm do ponto de inoculação. Para cada placa, cinco campos microscópicos foram quantificados (microscópio óptico, aumento de 100X). Todos os testes foram realizados em triplicata, com cada isolado de *Acanthamoeba* em uma placa individual. As contagens foram realizadas no décimo dia de incubação. Após as contagens, áreas das placas, dos isolados submetidos às temperaturas de 37 e 42 °C foram marcadas e transferidas para placas de ágar não-nutriente 1,5 % cobertas com suspensão de *E. coli* e incubadas a 30 °C para avaliação da viabilidade.

3.6 Extração de DNA total de *Acanthamoeba*

Para a extração de DNA total dos isolados de *Acanthamoeba* foi empregado protocolo descrito por Salah & Iciar (1997) com algumas modificações. Uma quantidade inicial de 10^6 trofozoítos/mL de isolados de *Acanthamoeba* obtidas de culturas axênicas no meio PYG foi centrifugada a $250 \times g$ durante 10 min. O sedimento foi submetido a três lavagens com 1 mL de PBS estéril e centrifugado por 3 min a $250 \times g$, para eliminar os restos de meio de cultivo. Posteriormente adicionou-se ao sedimento um volume de 400 μ L de tampão de extração (0,4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 2 mM EDTA pH 8,0) e agitou-se em vórtex por 10 a 15 s. Após foi adicionado 40 μ L de sódio dodecil sulfato 20 % (SDS) e 8 μ L de Proteinase K 20 mg/mL (concentração final 400 μ g/mL) (Invitrogen). As amostras foram então incubadas em banho-maria a 55 °C durante 1 hora e após, foi adicionado 300 μ L de NaCl 6 M em cada uma. As amostras novamente foram agitadas em vórtex por 30 s e centrifugadas por 10 min a $10.000 \times g$. Ao sobrenadante foram adicionados 700 μ L de álcool isopropílico, incubou-se a -20 °C por 1 hora e centrifugou-se por 20 min a $10.000 \times g$. O DNA foi lavado com etanol 70 % e centrifugado por 10 min a $10.000 \times g$. Depois de seco à temperatura ambiente, o DNA foi ressuspensão em 100 μ L de água ultra-pura esterilizada e armazenado a -20° C.

A quantificação do DNA dos isolados de *Acanthamoeba* foi realizada por comparação da intensidade das bandas, em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL. Como controle utilizou-se um padrão de

peso molecular de concentração conhecida (DNA ladder 50 pb, Ludwig biotecnologia).

3.7 Oligonucleotídeos utilizados no estudo para identificação de endossimbiontes através da PCR convencional

Oligonucleotídeos	Sequencia 5' – 3'	Tamanho do produto	Temperatura de anelamento	Referência
Domínio bactéria 16S	fD1 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG rP2 ACGGCTACCTTGTTACGACTT	1500 pb	55 °C	Weisburg <i>et al.</i> (1991); modificado.
<i>Legionellaceae</i>	LEG-225 AAGATTAGCCTGCGTCCGAT LEG-858 GTCAACTTATCGCGTTTGCT	654 pb	59 °C	Miyamoto <i>et al.</i> (1997); modificado.
<i>Pseudomonas</i> spp.	PA-GS-F GACGGGTGAGTAATGCCTA PA-GS-R CACTGGTGTTCCCTCCTATA	618 pb	58 °C	Spilker <i>et al.</i> (2004); Modificado.
<i>Chlamydiales</i>	16SIGF CGGCGTGGATGAGGCAT 16SIGR TCAGTCCCAGTGTGGC	298 pb	56 °C	Everett <i>et al.</i> (1999); modificado.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados no estudo de endossimbiontes.

Para as reações de amplificação, utilizamos 1U *Taq* DNA polimerase, 5 pmol de dNTP, 2,5 µL de PCR Buffer 10X, 0,75 µL de MgCl₂ (50mM), 1µL de cada primer (10 pmol/µL) e 1µL do DNA (30 ng) extraído para uma reação em 25µL. A amplificação foi realizada em termociclador “PTC 150 MiniCycler Hot Bonnet - MJ Research”.

3.8 PCR e Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A amplificação da região V3 do gene 16S rRNA por PCR foi realizada utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os oligonucleotídeos iniciadores universais BA 338F -GC (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') e UN518R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Øvreås, et al., 1997).

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada em solução tampão para DNA Taq Polimerase contendo 20ng. μl^{-1} de DNA molde, 1U Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 2,5 μl de tampão 10x, 1,5mM MgCl_2 ; 5 pmol de dNTP; 10pmol de cada primer, em um volume final de 25 μl . As condições de amplificação da PCR foram 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 58°C, 1 minuto a 72°C e extensão final a 72°C por 10 minutos. A amplificação foi conduzida em um termociclador TX96 Plus (AMPLITHERM). Os produtos gerados foram analisados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Posteriormente, os amplicons obtidos foram analisados em eletroforese em gel com gradiente desnaturante como descrito por Øvreås et al. (1997). Os géis continham 8% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1 m:m) e apresentavam um gradiente desnaturante de 15% a 55% de formamida e uréia (ØVREÅS, et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 200V, durante 5 horas e 30 minutos no DCode TM System (Bio-Rad Inc.,Hercules, USA) em tampão de corrida TAE 1X. O gel foi corado com Syber Safe (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A aquisição das imagens foi feita por fotodocumentador GL2200 (KODAK).

As bandas individuais observadas por DGGE foram excisadas, reamplificadas e sequenciadas.

As sequencias foram alinhadas com o MUSCLE, e as árvores foram construídas a partir das distâncias evolutivas utilizando *Neighbor-joining*, utilizando o software MEGA 5.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de *Acanthamoeba* spp.

O potencial patogênico dos isolados utilizados neste estudo foram determinados pelos testes de osmotolerância e termotolerância estabelecidos por Khan *et al.* (2001). Todos os isolados observados nesse estudo apresentaram crescimento a 37 °C bem como a 0,5 M. Apenas 3 isolados (A1, A2 e A10) apresentaram crescimento a 42 °C, enquanto nenhum dos isolados cresceram à concentração de 1,0 M (Tabela 3).

Isolado	Genótipo	Termotolerância		Osmotolerância	
		37 °C	42° C	0,5 M	1,0 M
A1	T5	+	+	+	-
A2	T4	+	+	+	-
A3	T4	+	-	+	-
A4	ND	+	-	+	-
A5	T11	+	-	+	-
A6	T5	+	-	+	-
A7	T3	+	-	+	-
A8	T5	+	-	+	-
A9	ND	+	-	+	-
A10	T5	+	+	+	-
A11	T5	+	-	+	-
A12	T5	+	-	+	-

Tabela 3: Grupo genotípico e características de termotolerância e osmotolerância dos isolados de *Acanthamoeba* spp. : + = apresentaram crescimento / - = não apresentaram crescimento. ND: Sequência com similaridade insuficiente para determinar genótipo.

Logo, através deste perfil, podemos considerar que os isolados A1, A2 e A10, possuem um potencial patogênico maior quando comparado aos demais aqui estudados. Alguns trabalhos têm mostrado que isolados patogênicos de *Acanthamoeba* exibem crescimento à temperatura e osmolaridade aumentadas (DE JONCKHEERE, 1983; KHAN *et al.*, 2002) sendo que esses testes fenotípicos podem ser usados na diferenciação e prévia caracterização de isolados clínicos e ambientais correlacionados também a testes de efeito citopático (KHAN *et al.*, 2001). Embora alguns isolados ambientais, tais como alguns dos isolados analisados neste trabalho, possam apresentar característica não patogênica, eles têm grande importância epidemiológica, uma vez que, podem ser veículos de bactérias patogênicas

como *Pseudomonas aeruginosa* e *Legionella pneumophila*, entre outros (BARKER & BROWN, 1994).

O aquecimento global tem causado preocupação em relação ao aumento de infecções e doenças parasitárias, incluindo as patologias causadas por amebas de vida livre (COOK, 1992; PATZ *et al.*, 2000). O aumento da temperatura do ambiente pode realçar o crescimento de espécies termotolerantes, que podem ser melhor adaptadas a infecções humanas e de outros mamíferos. Alguns trabalhos relatam que isolados de *Acanthamoeba* não-virulentos e não-patogênicos são incapazes de crescer a temperaturas superiores a 37°C (VISVESVARA, 1980; DE JONCKHEERE, 1991).

Entretanto, são também reportados casos de isolamento de amebas não-patogênicas, tolerantes a altas temperaturas, indicando que outros fatores além da tolerância à temperatura têm um importante papel na determinação da patogenicidade destas amebas (DE JONCKHEERE *et al.*, 1977; STEVENS *et al.*, 1980). Em estudo realizado por Hong *et al.* (2000), 60% dos isolados de água de torneira foram osmotolerantes e termotolerantes, mas somente 20% mostraram a expressão de serino-protease que é indicativo de virulência.

Quanto a característica genotípica, dos 12 isolados estudados, seis pertencem ao genótipo T5, dois pertencem ao genótipo T4, um pertence ao genótipo T3 e um ao genótipo T11, sendo que 2 isolados não apresentaram similaridade suficiente para determinar seu grupo genotípico. A partir dessa caracterização, 10 isolados podem ser considerados patogênicos.

Estudos realizados por Caumo & Rott (2011) observaram que 13 isolados de *Acanthamoeba* oriundas de água de piscinas, onde 9 pertenciam

ao genótipo T5, 3 pertenciam ao genótipo T4 e 1 genótipo T3. Carlesso *et al.* (2010) isolou 31 amebas de vida livre (AVL) do gênero *Acanthamoeba* spp., todas de ambiente hospitalar, sendo que 3 isolados pertenciam ao grupo T4, duas ao genótipo T5 e uma ao genótipo T3, entretanto 25 isolados não apresentaram similaridade suficiente para determinar o grupo genotípico. Em trabalho realizado por Winck *et al.* (2011), de um total de 136 amostras de água de torneira avaliadas, 13 apresentaram positividade para o gênero *Acanthamoeba* spp. , sendo que nove destas apresentaram similaridade suficiente para caracteriza-lás como pertencente ao genótipo T2.

Todos os trabalhos anteriormente citados relatam características de isolados de *Acanthamoeba* spp. oriundas do estado do Rio Grande do Sul, porém de diferentes fontes, e demonstram a grande distribuição deste protozoário bem como sua diversidade genotípica.

4.2 Identificação de endossimbiontes nos isolados de *Acanthamoeba*

Para a caracterização prévia dos isolados, quanto à presença ou ausência de endossimbiontes, foram utilizados oligonucleotídeos que amplificam a região 16S rRNA do domínio Bacteria. A partir deste critério, encontramos em nosso estudo uma prevalência de endossimbiontes em 100% das amostras estudadas (Figura 6).

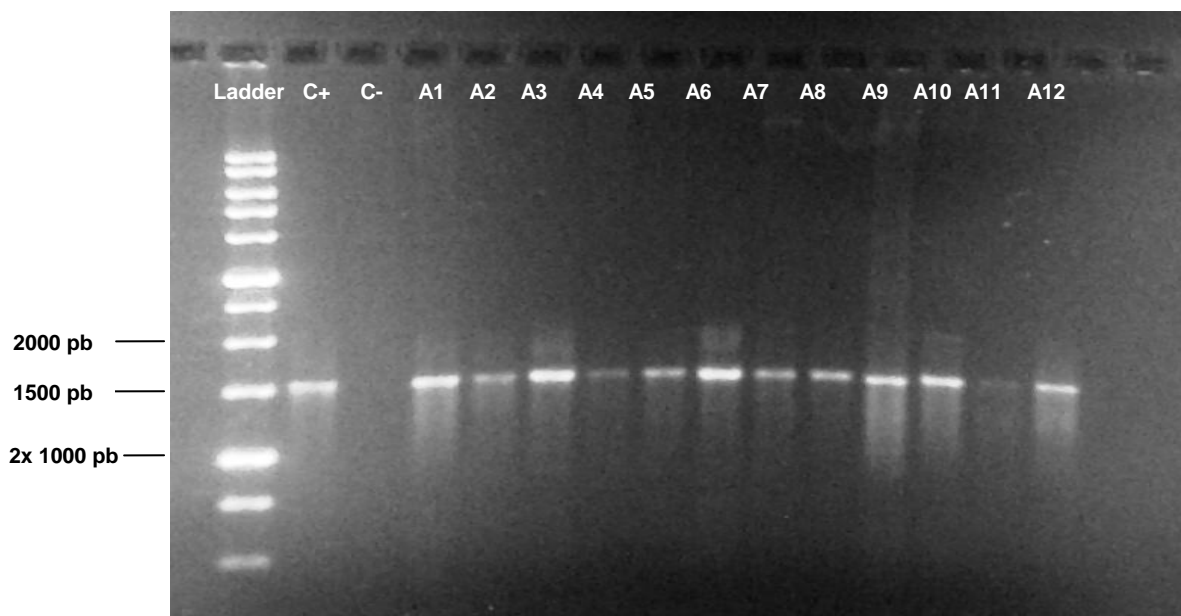


Figura 6: Análise molecular através da PCR do gene 16S rRNA para identificação de isolados de *Acanthamoeba* spp. portadores de endossimbiontes. Fonte: O autor.

Em contraste com inter-relações transitórias, o que resulta em lise das amebas infectadas, a presença de forma estável infectante de endossimbiontes bacterianos tem sido relatada em cerca de 25% de todos os isolados de *Acanthamoeba*, sendo muito comum a presença de microorganismos incultiváveis (HORN & WAGNER, 2004; FRITSCHÉ *et al.* 1993).

Choi *et al.* (2009) apresentou uma prevalência de 29,4% de endossimbiontes em isolados de *Acanthamoeba* provenientes de água de torneira. Em estudo realizado por Iovieno *et al.* (2010) utilizando a técnica da PCR, para a identificação de endossimbiontes em amostras clínicas, foi observada uma prevalência de 59,4% dentre os isolados estudados. Fritsche *et al.* (1993) em estudos com isolados clínicos e ambientais observaram a presença de endossimbiontes em 24% das amostras. Já Schmitz-Esser *et al.* (2008) avaliando 10 isolados de *Acanthamoeba* spp. de origem ambiental observaram a presença de bactérias endossimbiontes em 80% de seus isolados,

sendo todas bactérias, da ordem *Chlamydiales*. Xuan *et al.* (2007) avaliaram 4 cepas de *Acanthamoeba*, provenientes de lesões oculares, onde verificaram a presença de endossimbiontes em todos os isolados.

No presente trabalho, em que foram utilizados oligonucleotídeos que amplificam o domínio Bacteria, todos os isolados apresentaram endossimbiontes, resultado que está de acordo com alguns achados da literatura. A utilização destes oligonucleotídeos como “screening”, que amplificam regiões comuns a todos os procaríotos, possibilitam identificar inclusive microorganismos incultiváveis e taxonomicamente não caracterizados. Muitos estudos se utilizam de iniciadores para regiões espécie-específica, logo, a identificação de bactérias intracelulares obrigatórias e muitas vezes incultiváveis fica comprometida e subestimada.

Alguns microorganismos têm evoluído para se tornar resistentes à digestão por *Acanthamoeba* e esses microrganismos já estabelecidos como resistentes a amebas incluem agentes patogênicos bacterianos, tais como *Legionella* spp., *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Campylobacter jejuni*, além de agentes patogênicos emergentes, tais como *Simkania negevensis*, *Parachlamydia acanthamoebae* (FRITSCHÉ *et al.* 1993; GREUB & RAOULT, 2004).

4.3 Identificação de *Legionellaceae*, *Chlamidiales* e *Pseudomonas* spp. através da PCR

Após a confirmação de endossimbiontes nos isolados de *Acanthamoeba*, oligonucleotídeos específicos para os principais grupos bacterianos simbiotes foram utilizados para sua possível identificação.

Ambos os oligonucleotídeos para *Legionellaceae* e *Chlamidiales* sintetizados e utilizados neste estudo não apresentaram viabilidade para a identificação de endossimbiontes nos isolados estudados. Apesar de os controles utilizados apresentarem os resultados esperados, as amostras estudadas, apresentaram grande quantidade de bandas inespecíficas. Alguns isolados apresentaram bandas quase imperceptíveis correspondentes ao tamanho esperado, de modo que quando comparadas às demais bandas inespecíficas, as mesmas eram praticamente inexistentes.

Huang *et al.* (2011) identificaram *Legionella* a partir de culturas de *Acanthamoeba* utilizando-se da técnica de Semi-Nested PCR (SN-PCR) utilizando inicialmente os oligonucleotídeos LEG225 e LEG858 e em seguida os primers LEG448 e LEG858. No presente estudo utilizou-se apenas oligonucleotídeos LEG225 e LEG858, em uma reação de PCR convencional, fator esse que pode ter limitado a caracterização de possíveis endossimbiontes da família *Legionellaceae*.

Do mesmo modo, a identificação de microorganismos da ordem *Chlamydiales* ficou comprometida. Tanto o controle positivo como o negativo apresentaram o resultado esperado, entretanto os isolados apresentaram uma grande quantidade de bandas inespecíficas, como descrito anteriormente.

Microorganismos desta ordem são bactérias intracelulares obrigatórias (EVERETT *et al.* 1999). No entanto, com exceção dos simbioses relacionados às *Chlamydias*, o conhecimento sobre simbioses intracelulares obrigatórias presentes em amebas ainda é escasso (SCHMITZ-ESSER *et al.*, 2008). Esse fato pode explicar o grande número de bandas inespecíficas, visto que microorganismos incultiváveis e com característica intracelular são comuns em isolados de *Acanthamoeba* e a amplificação do gene 16S rRNA, presente em todos os procariontes, pode não ser tão específica em amostras ambientais quando comparadas com amostras clínicas (WEBLEY *et al.*, 2005).

Em contrapartida, quando foram utilizados oligonucleotídeos específicos para *Pseudomonas* spp. todos os isolados apresentaram este gênero como simbiote (Figura 7), sendo que o sequenciamento de 6 produtos da PCR apresentou similaridade para o gênero em questão (Tabela 4).

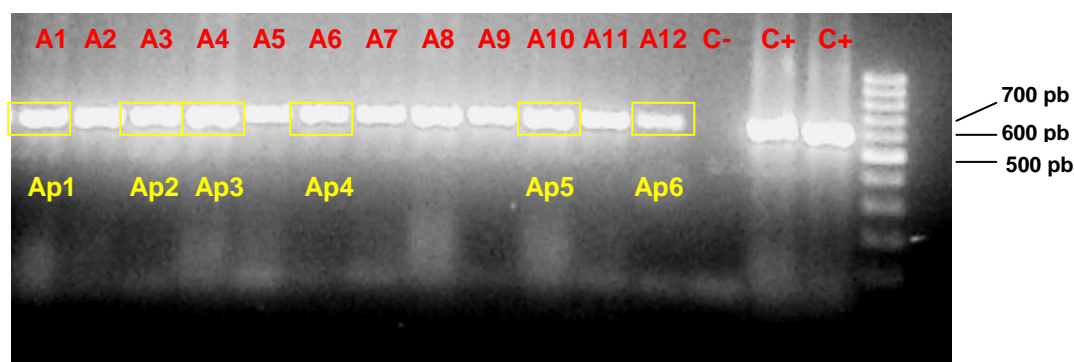


Figura 7: Análise molecular através da PCR para identificação de *Pseudomonas* nos isolados de *Acanthamoeba* spp. Fonte: O autor.

Isolados	Endossimbonte	Similaridade BLAST	Acesso GenBank (número para acesso)
A1	Ap1	97%	Pseudomonas sp. c145(2012) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JQ781629.1); Uncultured bacterium clone nbw210e07c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (GQ073598.1)
A3	Ap2	96%	Uncultured Pseudomonas sp. clone 3F10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (HM438578.1); Uncultured bacterium clone CT0C1AG01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JQ425947.1)
A4	Ap3	99%	Pseudomonas sp. c145(2012) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JQ781629.1) Uncultured bacterium clone Len173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JX855632.1);
A6	Ap4	99%	Pseudomonas sp. c145(2012) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JQ781629.1) Uncultured bacterium clone Len173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JX855632.1)
A10	Ap5	99%	Pseudomonas sp. c145(2012) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JQ781629.1); Uncultured bacterium clone Len173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JX855632.1)
A12	Ap6	96%	Pseudomonas sp. c145(2012) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JQ781629.1) Uncultured bacterium clone nbw210e07c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (GQ073598.1)

Tabela 4: Máxima porcentagem de similaridade encontrada entre sequências obtidas através da PCR para o gênero *Pseudomonas* spp. e sequências publicadas no *Genbank* (banco de sequências nucleotídicas do NCBI).

Em estudo realizado por Iovieno *et al.* (2010), foram isolados 37 cepas de *Acanthamoeba* oriundas de material clínico, sendo identificados um total de 22 endossimbiontes, sendo 13 pertenciam ao gênero *Pseudomonas*.

Na natureza, amebas de vida livre, também se alimentam de *Pseudomonas* spp., bactéria essa amplamente distribuída em água e muitas vezes estão presentes em baixas concentrações. O encontro pode ser facilitada por uma melhor aderência da *Pseudomonas* com *Acanthamoeba* nesses ambientes (BOTTONE *et al.*, 1994). No entanto, algumas espécies de *Pseudomonas* evoluíram para se tornar resistente à fagocitose por amebas, como demonstrado pelo isolamento de *Acanthamoeba* naturalmente infectada

com *P. aeruginosa* (MICHEL *et al.*, 1995). Assim, amebas de vida livre podem também desempenhar um papel como um reservatório para algumas estirpes resistentes de *Pseudomonas*, semelhante ao que tem sido mostrado por *Legionella* spp. Isto é importante, dado o papel do microorganismo *P. aeruginosa*, como um agente causal de patologias (GARAU & GOMEZ, 2003).

Entretanto se existe uma correlação entre a resistência da *Pseudomonas* à digestão pela *Acanthamoeba* e sua patogenicidade, isso permanece ainda por ser determinado (GREUB & RAOULT, 2004).

4.4 Utilização da técnica de DGGE para caracterização de populações bacterianas e identificação de endossimbiontes

Inúmeros trabalhos vêm apresentando diversas metodologias para a identificação e caracterização de endossimbiontes em isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba*, hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (IOVIENO *et al.*, 2010), reação em cadeia da polimerase (HEINZ *et al.*, 2007), semi-nested PCR (HUANG *et al.*, 2011) e microscopia eletrônica de transmissão (CHOI *et al.*, 2009), são algumas das alternativas apresentadas para a identificação e caracterização de bactérias simbiontes em amebas. Em nosso estudo apresentamos de forma pioneira, uma proposta para caracterizar e identificar essas populações utilizando a técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).

Após amplificação com os oligonucleotídeos BA 338F - GC e UN518R, e posterior migração do produto em gel desnaturante, todos os

isolados apresentaram diversidade na sua comunidade bacteriana, como pode ser visualizado na figura 8.

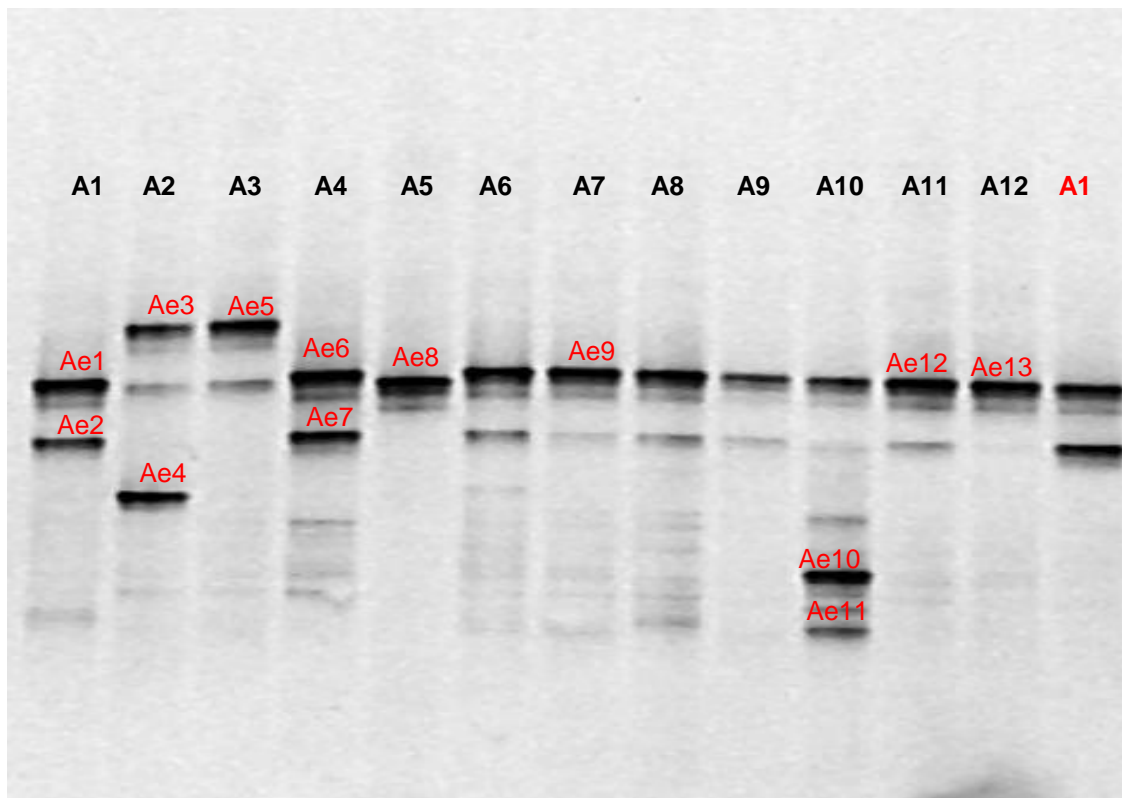


Figura 8: Avaliação da comunidade bacteriana através de DGGE.

Quanto à caracterização da diversidade de endossimbiontes nos isolados de *Acanthamoeba* utilizados no estudo, podemos observar que as amostras A1, A6, A9, A11 e A12 oriundas de estojos de lentes de contato apresentaram um padrão de bandas similares entre si, ou seja, existe uma comunidade bacteriana característica destes isolados com 2 bandas que se apresentam de forma predominante. Já os isolados originados de ar condicionado A2, A3, A4, e A10 apresentaram um maior número de bandas quando comparadas com outros isolados, até mesmo com A5, A7 e A8 que também tem a mesma origem, caracterizando assim uma comunidade bacteriana maior que os outros. Como nosso estudo é pioneiro na caracterização endossimbiontes pela técnica de DGGE em *Acanthamoeba*,

nossos resultados não podem ser comparados com outros autores quanto à diversidade bacteriana que pode ser observada no gel.

O uso de DGGE para análise de comunidades microbianas é uma ferramenta que permite verificar a estrutura da comunidade bem como, pode revelar as populações microbianas que são dominantes no ambiente, nesse caso, em *Acanthamoeba*. Uma das principais vantagens do DGGE é que esta técnica permite a detecção e análise de espécies não cultiváveis. No entanto, ela também apresenta algumas limitações que podem estar associadas a problemas na extração e amplificação do DNA, no gel desnaturante, na possível presença de produtos de PCR quiméricos, à produto de culturas mistas, e a possibilidade de não se diferenciar espécies muito próximas (TACCARI *et al.*, 2012; EVANS *et al.*, 2004). Em ambientes com grande diversidade microbiana, a co-migração de fragmentos de DNA de táxons diferentes pode ocorrer (MUYZER & SMALLA, 1998; GAFAN & SPRATT, 2005). Pode ocorrer até mesmo co-migração de fragmentos de DNA de táxons bacterianos muito distantes entre si, dentro de uma mesma banda em um gel de DGGE (SEKIGUCHI *et al.*, 2002). Uma das maiores limitações apresentadas pela DGGE é que somente fragmentos de até 500bp podem ser separados no gel de acrilamida o que limita a caracterização filogenética no posterior sequenciamento (MYERS *et al.*, 1985; CHANG *et al.*, 2000).

Isso pode explicar baixa similaridade de algumas bandas sequenciadas bem como a não identificação de espécies e nem mesmo de gêneros, no presente estudo. Estudos ainda mostram que muitas das sequências detectadas não apresentam homologia com sequências de

organismos conhecidos, ou com sequências depositadas no GenBank, representando dessa forma, novas espécies (SCHWIEGER; TEBBE, 1998). O DGGE apresenta limites de detecção, isto é, apenas espécies predominantes presentes na comunidade podem ser detectadas e muitas bandas não podem ser discriminadas umas das outras (NIKOLAUSZ *et al.*, 2005).

Apenas as bandas Ae4 e Ae12 (TABELA 5) obtiveram similaridade capaz de caracterizá-las como *Paenibacillus glucanolyticus* (99%) e *Candidatus Protochlamydia amoebophila* (96%) respectivamente, outras bandas não obtiveram a mesma possibilidade de caracterização sendo identificadas como bactérias incultiváveis. O gênero *Paenibacillus* compreende um grupo de organismos em forma de bastonete, aeróbios ou anaeróbios facultativos que produzem esporos elípticos (ASH *et al.* 1993). Espécies de *Paenibacillus* têm sido isoladas de uma grande variedade de ambientes, como solo (BERGE *et al.* 2002), água, rizosferas, materiais vegetais, alimentos, raízes de árvores, alimentos, forragem, fezes e larvas de insetos (DAANE *et al.* 2002), e uma espécie foi isolada de materiais clínicos (BOOSHARD *et al.*, 2002).

Candidatus Protochlamydia amoebophila, é um simbiote intracelular obrigatório de *Acanthamoeba* spp., cocóide gram negativo possuindo de 0,5 a 1,0 µm de diâmetro, apresenta-se envolto por membranas vacuolares e também disperso no citoplasma da célula hospedeira, muitas vezes de forma aglomerada (COLLINGRO *et al.*, 2005).

A banda Ae9 apresentou uma similaridade de 97% com Uncultured gamma proteobacterium. Nesse táxon, se encaixam alguns endossimbiontes, como *Legionella pneumophila* (ROWBOTHAM, 1986), *Pseudomonas*

aeruginosa (MICHEL *et al.* 1995) e *Coxiella burnetti* (LA SCOLA & RAOULT, 2001).

Isolados	Endossimbionte	Similaridade com BLAST	Acesso GenBank (número para acesso)
A1	Ae1	89%	Uncultured bacterium clone C-39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (EU709498.1)
	Ae2	96%	Uncultured bacterium clone A-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (EF579791.1)
A2	Ae3	97%	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band K2-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JX183833.1)
	Ae4	99%	Paenibacillus glucanolyticus strain LAMA 767 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JX860237.1)
A3	Ae5	97%	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone M17b (AJ851149.1)
	Ae6	94%	Uncultured bacterium clone C-39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (EU709498.1)
A4	Ae7	97%	Uncultured bacterium clone 5b-iP-Ac13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (HM470588.1)
A5	Ae8	99%	Uncultured bacterium clone 32-1-M13F(-47) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (GQ866161.1)
A7	Ae9	97%	Uncultured gamma proteobacterium clone QRSYY11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (EU919226.1)
A10	Ae10	-	ND
	Ae11	-	ND
A11	Ae12	96%	Candidatus Protochlamydia amoebophila strain UWE25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JQ346728.1)
A12	Ae13	90%	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone NY-R690 (FR877316.1)

Tabela 5: Máxima porcentagem de similaridade encontrada entre sequências obtidas através da PCR 16S domínio BACTERIA e sequências, publicadas no *Genbank* (banco de sequências nucleotídicas do NCBI). ND: Sequências com similaridade insuficiente para determinar espécie ou gênero.

A partir dos sequenciamentos, foi construído um dendrograma (Figura 9), onde a partir dele podemos avaliar a similaridade das nossas

amostras sequenciadas bem como de sequências externas obtidas no Genbank. O dendrograma apresenta-se dividido em 4 grupos (G1, G2, G3 e G4). Onde podemos observar no G1: Ae1, Ae3, Ae5, Ae6, Ae7 e Ae8. No G2, Ae10 e Ae11, as quais não apresentaram possibilidade de identificação pelo sequenciamento, apresentaram semelhança entre si com observado no dendrograma, diferenciando-se dos demais, assim como observado no gel de DGGE (Figura 8). Já no G3, observamos a presença de duas amostras, Ae9 e Ae2, e G4, onde observamos a presença de três amostras, Ae4, Ae 12 e Ae13.

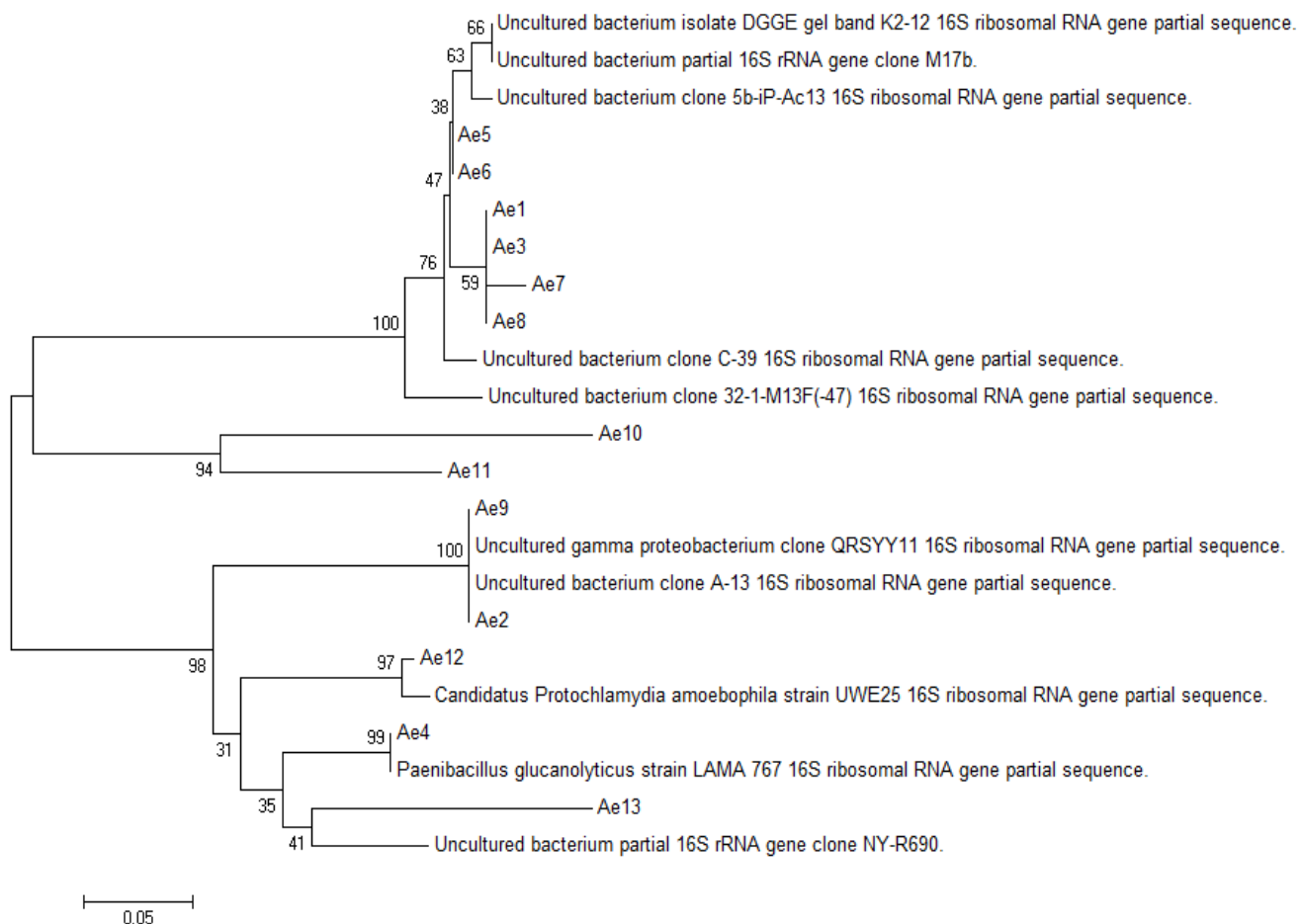


Figura 9: Dendrograma de proximidade genética pelo método de Neighbor-joining entre as amostras sequenciadas e sequências externas utilizando o programa MEGA 5.1. A barra de escala indica a distância evolutiva.

Apesar de apresentarem similaridade no dendrograma, isolados apresentam diferentes padrões de migração no gel de DGGE (Figura 8), isso pode ser explicado pelo fato da separação dos fragmentos no DGGE, ser realizada pela diferença de bases que a sequências apresentam, sendo essa diferenciação, feita a partir de uma única base (MUYZER & SMALLA, 1998).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Amebas de vida livre (AVL) pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* spp. estão distribuídas mundialmente e habitam uma ampla variedade de nichos ambientais. *Acanthamoeba* spp. pode ser considerada um importante veículo de patógenos humanos por abrigar bactérias endossimbiontes. Assim, esse estudo objetivou investigar a presença destes endossimbiontes em isolados de *Acanthamoeba* spp., bem como caracterizá-los quanto sua espécie e gênero.

Na caracterização molecular, 10 isolados apresentaram padrão genótipo que os caracterizam entre os mais associados as patologias que acometem seres humanos. Os marcadores fenotípicos de patogenicidade utilizados para a caracterização dos isolados de *Acanthamoeba* spp. (osmotolerância e termotolerância), demonstraram a presença de 3 isolados potencialmente patogênicos, entretanto testes *in vivo* e *in vitro* deverão ser utilizados para a confirmação desta hipótese.

Nesse trabalho, utilizamos 2 técnicas de biologia molecular, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), bem como lançamos mão de uma metodologia ainda não descrita para a identificação de endossimbiontes em isolados de *Acanthamoeba* spp., a Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE).

A utilização da PCR, metodologia essa já descrita por diversos autores como uma ferramenta adequada para a identificação de endossimbiontes, apresentou limitações para a identificação de microorganismos da família Legionellaceae bem como para a ordem Chlamydiales, sendo que para a caracterização destes grupos de microorganismos, metodologias como Nested-PCR ou ainda Hibridização Fluorescente *In-Situ* (FISH) podem ser utilizadas. Para a identificação do gênero *Pseudomonas* spp. nos isolados, utilizamos também a técnica de PCR, sendo que todos os isolados apresentaram positividade para esse endossimbionte de forma clara e conclusiva.

Quanto à utilização da DGGE, observamos que essa ferramenta apresentou-se de forma positiva para a avaliação da comunidade bacteriana internalizada, entretanto a caracterização a nível de espécie e gênero limitou-se a apenas 2 sequenciamentos. Por ser o primeiro estudo utilizando DGGE para a investigação de endossimbiontes em *Acanthamoeba* spp. não podemos ter uma posição conclusiva quanto a utilização ou não desta metodologia para a caracterização destes microorganismos, pois outras variáveis da técnica deverão analisadas para uma conclusão mais clara e fidedigna.

Identificar microorganismos simbiotes de *Acanthamoeba* vem sendo alvo de estudo para inúmeros pesquisadores visto o impacto que isso implica. Além disso, compreender essa interação simbiótica entre *Acanthamoeba* spp. com vários gêneros bacterianos vem apresentando-se como uma nova tendência na área da pesquisa seja de âmbito clínico e/ou ambiental.

6. BIBLIOGRÁFIA

ADÉKAMBI, T; SALAH, SB; KHLIF, M; RAOULT, D; DRANCOURT, M. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. **Applied and Environmental Microbiology**. 72:5974-5981; 2006.

AKSOZEK, A., MCCLELLAN, K., HOWARD, K., NIEDERKORN, J.Y.; ALIZADEH, H.. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. **Journal of Parasitology**. 88, 621–623. 2002.

ALVES, J. M.P. Caracterização e filogenia moleculares de *Acanthamoeba*. Tese de Doutorado. **Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Universidade de São Paulo**. São Paulo, 2001.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 59, p. 143-169, 1995.

ASH, C.; PRIEST, F.G. e COLLINS, M.C. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 64, p. 253-260, 1993.

AVRAHAMI, S., LIESACK, W., CONRAD, R. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. **Environmental Microbiology**. 5, 691– 705. 2003.

BANO, N., HOLLIBAUGH, J.T. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Artic Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**. 68, 505–518. 2002.

BARKER, J.; BROWN, M.R. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. **Microbiology**. v. 140, p. 1253-1259, jun. 1994.

BAUD, D; GOY, G; GERBER, S; VIAL, Y; HOHLFELD, P; GREUB, G. Evidence of Maternal–Fetal Transmission of *Parachlamydia acanthamoebae*. **Emerging Infectious Diseases**. www.cdc.gov/eid. Vol. 15, No. 1, January 2009.

BERGE O, GUINEBRETIERE MH, ACHOUAK W, NORMAND P, HEULIN T. *Paenibacillus graminis* sp. nov., and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 607-616, 2002.

- BOSSHARD, P.P.; ZBINDEN, R. e ALTWEGG, M. *Paenibacillus turicensis* sp. nov., a novel bacterium harbouring heterogeneities between 16s rRNA genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2241-2249, 2002.
- BOTTONE, E. J., A.; PEREZ, R. E.; GORDON, M.; QURESHI, N. Differential binding capacity and internalisation of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. **Journal of Medical Microbiology**. 40:148–154. 1994.
- BURTON, J.P.; CADIEUX, P.A.; REID, G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. **Applied and Environmental Microbiology**. 69, 97–101. 2003.
- CARLESSO, A. M.; ARTUSO, G. L.; CAUMO, K. Potentially Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from a Hospital in Brazil. **Current Microbiology**. 60:185–190. 2010.
- CASTELLANI, A. An amoeba found in cultures of yeast: preliminary note. **Journal of Tropical Medicine**. 33:160. 1930.
- CAUMO K; FRASSON A. P.; PENS C. J.; ROTT, M. B. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 103:477–485. 2009.
- CAUMO, K.; ROTT, M. B. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. **Acta Tropica**. 117. 233–235. 2011.
- CHANG, Y. J.; STEPHEN, J. R.; RICHER, A. P.; VENOSA, A. D.; BRÜGGERMANN, J.; MACNAUGHTON, S. J.; KOWALCHUK, G. A.; HAINES, J. R.; KLINE, E.; WHITE, D. C. Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 19-31, 2000.
- CHOI, S. H.; CHO, M. K.; AHN, S. C.; LEE, J. E.; LEE, J. S.; KIM, D; XUAN, Y.; HONG, Y. C.; KONG, H. H.; CHUNG, D.; YU, H. S. Endosymbionts of *Acanthamoeba* Isolated from Domestic Tap Water in Korea. **Korean Journal of Parasitology**. Vol. 47, No. 4: 337-344, December 2009.
- COLLINGRO, A.; TOENSHOFF, E. R.; TAYLOR, M. W.; FRITSCHKE, T. R.; WAGNER, M.; HORN, M. '*Candidatus* Protochlamydia amoebophila', an endosymbiont of *Acanthamoeba* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 55, 1863–1866. 2005.

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

COTE, M. A., J. A. IRVINE, N. A. RAO, M. D. TROUSDALE. Evaluation of the rabbit as a model of *Acanthamoeba* keratitis. **Reviews of Infectious Diseases**. 13 Suppl 5:S443-4. 1991.

COULON, C., COLLIGNON, A., MCDONNELL, G., THOMAS, V. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. **Journal of Clinical Microbiology**. 48, 2689–2697. 2010.

CRUMP, B.C.; KLING, G.W.; BAHAR, M.; HOBBI, J.E. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. **Applied and Environmental Microbiology**. 69, 2253– 2268. 2003.

DAANE L. L.; HARJONO I.; BARNES S. M.; LAUNEN L. A.; PALLERON N. J.; HÄGGBLUM M. M. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from rhizosphere of salt marsh plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 131-139, 2002.

DAGGETT, P. M. D.; LIPSCOMB, T.; SAWYER, K.; NERAD, T. A. A molecular approach to the phylogeny of *Acanthamoeba*. **Biosystems**. 18:399-405. 1985.

DE JONCKHEERE J.F. Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Laurence, v. 30, 701-706, 1983.

DE JONCKHEERE, J. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 33, p. 751-757, apr, 1977.

DE JONCKHEERE, J.F. Ecology of *Acanthamoeba*. **Reviews of infectious diseases**, Chicago, v. 13, p. 385-387, mar-apr. 1991.

DONSKEY, C.J., HUJER, A.M., DAS, S.M., PULTZ, N.J., BONOMO, R.A., RICE, L.B., Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. **Journal of Microbiological Methods**. 54, 249– 256. 2003.

EVANS, F.F.; ROSATO, A.S.; SEBASTIAN, G.V.; CASELA, R.; MACHADO, P.L.O.A.; HOLSTROM, C.; KJELLEBERG, S.; VAN ELSAS, J.D.; SELDIN, L. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosmos. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, 295-395, 2004.

EVERETT, K. D.; BUSH, R. M.; ANDERSEN, A. A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. **International journal of systematic bacteriology**. 49:415–440. 1999.

FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. **Cell**, 16:191-200, 1979.

FRITSCHKE, TR; HORN, M; WAGNER, M; HERWIG, RP; SCHLEIFER, KH; GAUTOM, RK. Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. **Applied and Environmental Microbiology**. 66:2613-2619; 2000.

FRITSCHKE, T.R.; GAUTOM, R.K.; SEYERDIRSHTI, S.; BERGERON, D.L.; LINDQUIST, D. Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. **Journal of Clinical Microbiology**. 31: 1122 - 1126. 1993.

GAFAN, G.P.; SPRATT, D.A. Denaturing gradient electrophoresis gel expansion (DGGE)- An attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. **FEMS Microbiology Letters**, v.253, 303-307, 2005.

GARAU, J.; GOMEZ, L. *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Current Opinion in Infectious Diseases**. 16:135–143. 2003.

GARDUÑO-VIEYRA, L.; GONZALEZ-SANCHEZ, C. R.; HERNANDEZ-DA MOTA, S. E. Ultraviolet-A Light and Riboflavin Therapy for *Acanthamoeba* Keratitis: A Case Report. **Case Reports in Ophthalmology**. 2:291–295. 2011.

GÓMEZ-COUSO, H.; PANIAGUA-CRESPO, E.; ARES-MAZÁS, E. *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of Cryptosporidium. **Parasitology Research**. 100:1151–1154. 2007.

GRAY, N.D.; MISKIN, I.P.; KORNILOVA, O.; CURTIS, T.P.; HEAD, I.M. Occurrence and activity of Archea in areated activated sludge wastewater treatment plants. **Environmental Microbiology**. 4, 158– 168. 2002.

GREUB G.. *Parachlamydia acanthamoebae*, an emerging agent of pneumonia. **Clinical Microbiology and Infection**. Jan;15(1):18-28. 2009.

GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. **Clinical Microbiology Reviews**. 17: 413–433. 2004.

HEINZ, E.; KOLAROV, I.; KÄSTNER, C.; TOENSHOFF, E. R.; WAGNER, M.; HORN, H. An *Acanthamoeba* sp. containing two phylogenetically different bacterial endosymbionts. **Environmental Microbiology**. 9(6), 1604–1609. 2007.

HONG, Y.C.; KONG, H.H.; OCK, M.S.; KIM, I.S.; CHUNG, D.I. Isolation and characterization of a cDNA encoding a subtilisin-like serine proteinase (AhSUB) from *Acanthamoeba healyi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 111, p. 441-446, dec. 2000.

HORN, M.; WAGNER, M. Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. **J Journal of Eukaryotic Microbiology**. 51:509 –14. 2004.

HUANG, S.; HSU, B.; CHEN, N.; HUANG, C.; HUANG, K.; CHEN, J.; KAO, P. Isolation and identification of *Legionella* and their host amoebae from weak alkaline carbonate spring water using a culture method combined with PCR. **Parasitology Research**. DOI 10.1007/s00436-011-2366-8. 2011.

IOVIENO, A.; LEDEE, D. R.; MILLER, D.; ALFONSO, E. C. Detection of Bacterial Endosymbionts in Clinical *Acanthamoeba* Isolates. **American Academy of Ophthalmology**. Volume 117, Number 3, March 2010.

JACOBSON L. M.; BAND R. N. Genetic heterogeneity in a natural population of *Acanthamoeba polyphaga* from soil, na isoenzyme analysis. **Journal of Protozoology**. 34: 83-86. 1987.

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

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

KHAN, N. A; JARROLL, E. L; PAGET, T. A. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. **Current Microbiology**, New York, v. 45, n. 3, p. 197-202, sep. 2002.

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

KILVINGTON, S.; PRICE, J. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. **Journal of Applied Bacteriology**. 68 (5), 519-525. 1990.

KIM, Y. H.; OCK, M. S.; YUN, H. C.; HWANG, M. Y.; YU, H. S.; KONG, H. H.; CHUNG, D. I. Close relatedness of *Acanthamoeba pustulosa* with

Acanthamoeba palestinensis based on isoenzyme profiles and rDNA PCR-RFLP patterns. **Korean Journal of Parasitology**. 34(4): 259 – 266. 1996.

KONG, H. H.; CHUNG, D. I. PCR and RFLP variation of conserved region of small subunit ribosomal DNA among *Acanthamoeba* isolates assigned to either *A. castellanii* or *A. polyphaga*. **Korean Journal of Parasitology**. 34(2):127-34. 1996.

LA SCOLA, B.; D. RAOULT. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. **Clinical Microbiology Infect.** 7: 75 – 79. 2001.

LARKIN, D. F. P.; KILVINTONG, S.; EASTY, L.. Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria. **British Journal of Ophthalmology**, v. 74, p. 133-135, 1990.

LEITSCH, D.; KÖHSLER, R.; MARCHETTI-DESCHMANN, M.; DEUTSCH, A.; ALLMAIER, G.; KÖNIG, L.; SIXT, B. S.; DUCHÊNE, M.; WALOCHNIK, J. Proteomic aspects of *Parachlamydia acanthamoebae* infection in *Acanthamoeba* spp.. **International Society for Microbial Ecology Journal** 4, 1366–1374. 2010.

MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. **Environment International**, Amsterdam, v. 34, p. 265-276, 2008.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 2, p. 273-307, apr. 2003.

MARTINEZ, A. J.; G. S. VISVESVARA. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathology**. 7: 583 - 598. 1997.

MARTINEZ, A.J., G.S. VISVESVARA. Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxida*. **Clinics and Laboratory Medicine**. 11: 861 – 872. 1991.

MARTINEZ, J. M., GUERRA. A. E., GARCIA-TAMAYO, J., CÉSPEDES, G., GONZÁLES-ALFONZO, J., VIVESVARA, G. Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of spontaneous case from Venezuela. **Acta Neuropathologica**’s. 87:430- 4. 1994.

MC BAIN, A.J.; BARTOLO, R.G.; CATRENICH, C.E.; CHARBONNEAU, D.; LEDDER, R.G.; GILBERT, P. Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms. **Journal of Applied Microbiology**. 94, 655– 664. 2003.

MICHEL, R.; BURGHARDT, H.; BERGMANN, H. Acanthamoeba, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. **Zentralbl Hyg Umweltmed.**196:532–544. 1995.

MIYAMOTO, H. H.; YAMAMOTO, K.; ARIMA, J.; FUJII, K.; MARUTA, K.; IZU, T.; SHIOMORI, A.; YOSHIDA, S.. Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water. **Applied and Environmental Microbiology.** 63:2489–2494. 1997.

MOLMERET, M.; HORN, M.; WAGNER, M.; SANTIC, M.; ABU KWAIK, Y. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. **Applied and Environmental Microbiology.** 71: 20–28. 2005.

MOREIRA D.; BROCHIER-ARMANET, C. Giant viruses, giant chimeras: the multiple evolutionary histories of Mimivirus genes. **BMC Evolutionary Biology.** 8:12. 2008.

MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G.. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology.** 59, 695– 700. 1993.

MUYZER, G; SMALLA, K.. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek.* **Microbiology.** v. 73, p. 127–141, 1998.

MYERS, R. M.; FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research,** v. 13, n. 9, p. 3131-3145, 1985.

NICOL, G.W., GLOVER, L.A., PROSSER, J.I. The impact grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. **Environmental Microbiology.** 5, 152– 162. 2003.

NIKOLAUSZ, M.; SIPOS, R.; RÉVESZ, S.; SZÉKELY, A.; MÁRIALIGETI, K. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. **FEMS Microbiology Letters,** v. 244, p. 385-390, 2005.

NORRIS, T.B.; WRAITH, J.M.; CASTENHOLZ, R.W.; MCDERMOTT, T.R.. Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. **Applied and Environmental Microbiology.** 68, 6300–6309. 2002.

OVREAS, L.; FORNEY, L.; DAE, F.L.; TORSVIK., V. Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Salenvannet, as determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified gene fragment coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63,3367-3373, 1997.

PAGE, F. C. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. **Journal of Protozoology**. 14:709-24. 1967.

PATZ, J.A.; GRACZYK, T.K.; GELLER, N.; VITTOR, A.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, p. 1395-1405, nov. 2000.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica** 13:557-610. 1977.

REESON, A.F.; JANCOVIC, T.; KASPER, M.L.; ROGERS, S.; AUSTIN, A.D.. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespa germanica*. **Insect Molecular Biology**. 12, 85– 91. 2003.

RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S. Ecology of free living amoebae. **Critical Reviews in Microbiology**. 20: 225–241. 1994.

ROWAN, A. K.; SNAPE, J. R.; FEARNSIDE, D.; BARER, M. R.; CURTIS, T. P.; HEAD, I.A. Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. **FEMS Microbiology Ecology**, 43:195-206, 2003.

ROWBOTHAM, T. J. Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. **Israel Journal of Medical. Sci.** 22:678–689. 1986.

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

SARAVANAN, C.; CAO, Z.; KUMAR, J.; QIU, J.; PLAUNT, A. G.; NEWBURG, D. S.; PANJWAI, N.. Milk Components Inhibit *Acanthamoeba*-Induced Cytopathic Effect. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** Invest, v.49, n 3, p.1010 –1015, 2008.

SCHAUMBERG, D. A.; SNOW, K. K.; DANA, M. R. The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: Where do we stand? **Cornea**. 17: 3 – 10. 1998.

SCHMITZ-ESSER, S; TOENSHOFF, ER; HAIDER, S; EVA HEINZ, E; HOENNINGER, VM; WAGNER, M; HORN, M.. Diversity of Bacterial Endosymbionts of Environmental *Acanthamoeba* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 74, No. 18 p. 5822–5831. Sept. 2008.

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

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. A new approach to utilize PCR-single-strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. 64: 4870–4876. 1998.

SEKIGUCHI, H., WATANABE, M., NAKAHARA, T., XU, B., UCHIYAMA, H. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. 68, 5142– 5150. 2002.

SHARMA P. P.; GUPTA, P.; MURALI, M. V.; RAMACHANDRAN, V. G.. Primary amebic meningoencephalitis caused by *Acanthamoeba*: successfully treated with cotrimoxazole. **Indian Pediatrics**. 30(10):1219-22. 1993.

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

SINGHAL, T. A.; BAJPAI, V.; KALRA, S. K.; KABRA, J. C.; SAMANTARAY, G.; SATPATHY, A. K.; GUPT. A.. Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. **Pediatric Infectious Disease Journal**. 20: 623 – 627. 2001.

SNELLING W. J.; MOORE J. E.; MCKENNA J. P; LECKY D. M.; DOOLEY J. S. G. Bacterial-protozoa interactions; an update on the role these phenomena play towards human illness. **Microbes and Infection**. 8:578–587. 2006.

SPIPKER, T.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; LI PUMA, J. J. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. **Journal Of Clinical Microbiology**. p. 2074–2079. May 2004.

STAMPER, D.M., WALCH, M., JACOBS, R.N. Bacterial population changes in a membrane bioreactor for gray water treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**. 69, 852–860. 2003.

STEENBERGEN J N, NOSANCHUK J D, MALLIARIS S D, CASADEVALL A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. **Infection and Immunity**. 72 : 3478–3488. 2004.

STEENBERGEN, J.N., SHUMAN, H. A.; CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence

and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Infection and Immunity**. p. 3478–3488. 2001.

STEVENS, A.R., WILLAERT E. Drug sensitivity and resistance of four *Acanthamoeba* species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 74, p. 806-808, 1980.

STRATFORD, M. P.; A. J. GRIFFITHS. Variations in the properties and morphology of cysts of *Acanthamoeba castellanii*. **Journal of general microbiology**.108:33. 1978.

TACCARI, M.; MILANOVIC, V.; COMETINI, F.; CASUCCI, C.; CIANI. Effects of bioestimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. **International Biodeterioration and Biodegradation**. v.66,39-46, 2012.

TANAKA, Y., SUGURI, S., HARADA, M., HAYABARA, T., SUZUMORI, K. & OHTA, N. *Acanthamoeba* specific human T-cell clones isolated from healthy individuals. **Parasitology Research**. 80: 549-553. 1994.

TESKE, A.; ALM, E.; REGAN, J.M.; TOZE, S.; RITTMANN, B.E.; STHAL, D.A. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. **Journal of Bacteriology**, 176:6623-6630, 1994.

TRNKOVÁ, K.; BIELIKOVÁ, A.; IZÁK, M.; KLEMENT, C. Diagnosing of *Acanthamoeba* keratitis. **Ceska a Slovenska Oftalmologie**. 65(5):155-60. 2009.

VISVESVARA G. S.; MOURA H.; SCHUSTER F. L.. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunol Med Microbiol**. 50:1-26. 2007.

VISVESVARA, G. S. Classification of *Acanthamoeba*. **Reviews of Infections Diseases**. 13 Suppl 5:S369-72. 1991.

VISVESVARA, G.S. Free-living pathogenic amoebae. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, p.704-708, 1980.

VISVESVARA, G.S.; SCHUSTER, F.L. Opportunistic Free-living Amebae, Part I. **Clinical Microbiology Newsletter**, Boston, v. 30, p. 151-158, oct. 2008.

VOLKONSKY, M. *Hartmannella castellanii* Douglas, et classification des hartmannelles. **Archives de Zoologie Expérimentale et Générale**. 72:378-385. 1931.

WALOCHNIK, J., A. HASSL, K. SIMON, G. BENYR, H. ASPOCK,. Isolation and identification by partial sequencing of the 18S ribosomal gene of free-living

amoebae from necrotic tissue of *Basilliscus plumifrons* (Sauria: Iguanidae). **Parasitology Research**. 85: 601 – 603. 1999.

WALOCHNIK, J.; DUCHENE, M.; SEIFERT, K.; OBWALLER, A.; HOTTKOWITZ, T.; WIEDERMANN, G.; EIBL, H.; ASPOCK, H. Citotoxic activities of alkyphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 46, n. 3, p. 695-701, 2002.

WEBLEY, W. C.; SALVA, P. S.; ANDRZEJEWSKI, C.; CIRINO, F.; WEST, C. A.; TILAHUN, Y.; STUART, E. S.. The Bronchial Lavage of Pediatric Patients with Asthma Contains Infectious *Chlamydia*. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**. Vol 171.

WEEKERS, P. H.; J. F. DE JONCKHEERE. Differences in isoenzyme patterns of axenically and monoxenically grown *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 71:231-7. 1997.

WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**. 173, 697–703. 1991.

WINCK, M. A. T.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. Prevalence of *Acanthamoeba* from Tap Water in Rio Grande do Sul, Brazil. **Current Microbiology**. 63:464–469, 2011.

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

XUAN, Y.; YU, H. S.; JEON, H. J.; SEOL, S.; CHUNG, D.; KONG, H.. Molecular characterization of bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* isolates from infected corneas of Korean patients. **Korean Journal of Parasitology**. Vol. 45, No. 1: 1-9, March 2007.

ZOETENDAL, E.G.; VON WRIGHT, A.; VILPPONEN-SALMELA, T.; BEN-AMOR, K.; AKKERMANS, A.D.; DE VOS, W.M. Mucosa associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. **Applied and Environmental Microbiology**. 68, 3401– 3407. 2002.

ANEXOS

Anexo A

Meio Proteose Peptona Extrato de Levedo e Glicose (PYG) pH 6,5 ± 0,2

7,5g de Proteose Peptona

0,75g de Extrato de levedo

0,98g de Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

0,059g de Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

1g de Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

0,02g de Sulfato ferroso amoniacal [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]

0,034g de Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)

0,355g de Hidrogenofosfato dissódico anidro

15g de Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)

Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do CaCl_2 que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121°C por 15 min).

Anexo B

Ágar não-nutriente (ANN)

100 mL de solução salina de Page (1X)

1,5g de ágar

Preparo: O ágar foi dissolvido em 100 mL da solução salina, aquecido até a completa dissolução e esterilizado por autoclavagem (121 °C por 15 min). A distribuição do ANN foi realizado em placas bacteriológicas estéreis.

Solução Salina de Page:

120 mg de cloreto de sódio (NaCl)

4 mg de sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)

142 mg de hidrogenofodfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)

136 mg de diidrogenofosfato de Potássio (KH_2PO_4)

4 mg de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes forma dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do CaCl_2 que foi dissolvido separadamente a adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121 °C por 15 min).