Ana Cristina Mansanaro Magliano

**Diversidade de *Acanthamoeba* spp no Brasil:
isolamento, aspectos fisiológicos, genotipagem e
relações filogenéticas entre isolados de ambiente e de
casos clínicos**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia da
Relação Patógeno-Hospedeiro do
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.**

**São Paulo
2011**

Ana Cristina Mansanaro Magliano

**Diversidade de *Acanthamoeba* spp no Brasil:
isolamento, aspectos fisiológicos, genotipagem e
relações filogenéticas entre isolados de ambiente e de
casos clínicos**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia da
Relação Patógeno-Hospedeiro do
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de
Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Biologia da
Relação Patógeno-Hospedeiro**

**Orientadora: Profa. Dra. Silvia
Celina Alfieri**

Versão original

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Magliano, Ana Cristina Mansanaro.

Diversidade de *Acanthamoeba* spp no Brasil: isolamento, aspectos fisiológicos, genotipagem e relações filogenéticas entre isolados de ambiente e de casos clínicos / Ana Cristina Mansanaro Magliano. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Silvia Celina Alfieri.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia celular e molecular e bioquímica de *Acanthamoeba*.

Versão do título para o inglês: Diversity of *Acanthamoeba* spp in Brazil: isolation, physiological features, genotyping and phylogenetic relationships among environmental and clinical isolates.

Descritores: 1. *Acanthamoeba* 2. SSU rRNA 3. Genotipagem 4. Relações filogenéticas 5. Serina peptidases 6. Efeito citopático I. Alfieri, Silvia Celina II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0134/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Cristina Mansanaro Magliano.

Título da Tese: Diversidade de *Acanthamoeba* spp no Brasil: isolamento, aspectos fisiológicos, genotipagem e relações filogenéticas entre isolados de ambiente e de casos clínicos.

Orientador(a): Silvia Celina Alfieri.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 115, referente ao projeto intitulado *“Amebas de vida livre em coleções de água de diferentes regiões do Brasil: isolamento, cultivo e caracterização morfológica, biológica e molecular”* sob a responsabilidade de **Ana Cristina Mansanaro Magliano**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 18 de outubro de 2005.

Profa. Dra. MARÍLIA C.L. SEELAENDER
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEPSh - ICB/USP

**Aos meus pais (Jano e Lucila) e
a minha irmã (Ana Carolina).**

**Ao meu marido (Daniel)
e a minha filha (Ana Beatriz).**

**Só consegui realizar este
trabalho graças a vocês!**

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Silvia Celina Alfieri, pela valiosa orientação e amizade por todos esses anos. Todo o meu aprendizado é muito do que sou hoje devo a sua orientação. Obrigada por tudo!

À Prof. Dra. Marta Maria Geraldine Teixeira, que foi muito mais do que uma co-orientadora; participou e contribuiu ativamente em todas as etapas do meu trabalho. Muito obrigada!

Ao Prof. Carlos Eduardo Winter pelos valiosos conhecimentos que me foram passados durante estes anos de convivência.

À Prof. Dra. Tânia Bijovski, por sempre me receber tão bem em seu laboratório.

À Carmem Takata, Marta Campaner, Marcio Yamamoto e Elizabeth M. F. Pral pela amizade e apoio técnico a este trabalho.

Aos meus grandes amigos do laboratório: Charlotte, Tarcilla, Omar, Flávia, Luciana, Adriana, Paola, Zuleima, Oneida, Carminha, André e Robson. Meus amigos de bancadas, de discussões científicas, de todas as horas. Agradeço em especial a Dra. Luciana e Tarcilla por ter me ajudado na montagem da minha tese.

Agradeço especialmente a Dra. Flávia Maia que sempre me ajudou durante o desenvolvimento deste trabalho e que com muita paciência, me passou todo o seu conhecimento e sabedoria; além da grande amiga que encontrei.

Aos grandes amigos do departamento: Alexandre Moura, André Franco, Fabiana Jordão e Emília Kimura, Manoel Peres. A convivência com vocês durante todos estes anos tornaram a minha rotina muito mais agradável.

Obrigada a todos do Departamento de Parasitologia!

PARA SÊR GRANDE, sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa.

Põe quanto és no mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porque alta vive

Fernando Pessoa

A ausência da evidência
não significa evidência da
ausência

Carl Sagan

PREFÁCIO

“Esta dissertação foi elaborada de acordo as normas da CPG/ICB relativas a outras formas de elaboração de tese de doutorado que permite a inclusão, como Anexo, de resultados já publicados ou submetidos em periódicos internacionais indexados em língua inglesa. Permite ainda que detalhes metodológicos e resultados obtidos sejam aqueles contido no artigo anexado ao corpo da tese”.

Artigo que compõe o corpo da tese:

ANEXO 1 - Genetic diversity among *Acanthamoeba* spp. isolated in Brazil: genotyping of clinical and environmental isolates, and phylogenetic inferences (manuscrito em preparação)

ANEXO 2 - Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba sp* isolated from tap water in Brazil.

ANEXO 3 - Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): characterisation of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences (manuscrito submetido)

Este trabalho contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

MAGLIANO, A. C. M. **Diversidade de *Acanthamoeba* spp no Brasil: isolamento, genotipagem, aspectos fisiológicos e relações filogenéticas entre isolados de ambiente e de casos clínicos.** 2011. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

Amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* são protozoários ubiquitários e frequentemente isolados do ambiente. Os trofozoítas são as formas de locomoção, nutrição e multiplicação que encistam quando as condições do meio são desfavoráveis. Os cistos resistem a dessecação e a vários agentes químicos e físicos, permanecendo viáveis durante muitos anos no ambiente. *Acanthamoeba* spp são agentes de infecções oportunistas geralmente fatais (encefalite granulomatosa, lesões cutâneas disseminadas) e também de ceratites (úlceras de córnea), que acometem indivíduos saudáveis, particularmente usuários de lentes de contato. Organismos do gênero *Acanthamoeba* foram inicialmente identificados com base em parâmetros morfológicos dos cistos e classificados em três grupos distintos (I, II e III). Atualmente, a identificação em nível de espécie é feita a partir do sequenciamento da subunidade menor do gene ribossômico (SSU rRNA); até o momento, 17 genótipos (T1-T17) albergam as espécies do gênero. Organismos do gênero *Acanthamoeba* são muito pouco investigados no Brasil, não se conhecendo a diversidade genética e o potencial patogênico das espécies prevalentes no país. No presente estudo, avaliamos 118 amostras de solo e água de diversas regiões do Brasil, o que resultou no estabelecimento de 38 culturas axênicas de *Acanthamoeba*, todas, atualmente, criopreservadas. A partir do sequenciamento parcial do SSU rRNA, foi possível genotipar e avaliar o polimorfismo genético entre os isolados de ambiente do Brasil, em análises que também incluíram sequências de 11 isolados de casos clínicos brasileiros. Filogenias baseadas em diferentes métodos de análises mostraram que 25 isolados de ambiente e 11 isolados de ceratite pertencem ao clado/genótipo T4, indicando, à semelhança das observações de outros países, alta prevalência de isolados T4 no Brasil e forte associação deste genótipo com espécies patogênicas. Em particular, um isolado de água de torneira (ACC01) se mostrou filogeneticamente bastante relacionado a *A. polyphaga* ATCC 30461 (~99% de similaridade), espécie originária de um caso de ceratite (Texas, USA). Semelhanças fisiológicas (termo- e osmotolerância) e

a secreção de níveis comparáveis de serina e cisteína peptidases também foram observadas entre os dois isolados, o que indicou o possível potencial patogênico do isolado Brasileiro ACC01. Dentre os isolados de ambiente do Brasil, cinco foram agrupados com espécies do clado T5, formando um grupo monofilético e bem suportado (~2,3% divergência interna), até o momento fortemente associado à espécie *A. lenticulata*. Um único isolado, ARO04, se mostrou relacionado aos poucos isolados que formam o genótipo T13. O presente estudo também mostrou que sete isolados de ambiente do Brasil apresentam características morfológicas típicas das espécies do grupo morfológico I: cistos grandes com endocisto estrelado. Neste grupo estão as espécies mais divergentes do gênero *Acanthamoeba*, atualmente distribuídas em 4 genótipos (T7, T8, T9 e T16). Dos sete isolados Brasileiros do grupo morfológico I, um (TSP07) se mostrou filogeneticamente mais relacionado à *A. comandonii* (T9), enquanto que os demais agruparam com dois isolados do genótipo T17, com eles formando um clado monofilético (2,0% de divergência entre sequências) que, provavelmente, representa uma nova espécie do gênero *Acanthamoeba*. Indicadores indiretos de virulência (termo- e osmotolerância, secreção de peptidases e efeito citopático) foram examinados nos isolados dos genótipos T9 e T17, verificando-se: crescimento a temperaturas de até 40 °C, resistência em meios hiper-osmolares, secreção importante de atividade principalmente associada a serina peptidases e capacidade de produzir efeito citopático em monocamadas de células HeLa e SIRC; estes resultados sugerem o potencial patogênico deste grupo de isolados. Considerando a provável participação da atividade de uma subtilisina-*simile* na patogenia causada por *Acanthamoeba* e a disponibilidade da sequência completa de uma subtilisina de *A. healyi* (AhSUB), oligonucleotídeos que flanqueiam o domínio catalítico da subtilisina foram desenhados e utilizados para amplificar um fragmento de aproximadamente 800 pb. Dados iniciais de filogenias moleculares, incluindo um pequeno repertório de isolados de *Acanthamoeba*, indicam congruência das análises baseadas nos genes de subtilisina e SSU rRNA.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*, SSU rRNA, genotipagem, relações filogenéticas, serina peptidases, efeito citopático

ABSTRACT

MAGLIANO, A. C. M. **Diversity of *Acanthamoeba* spp in Brazil: isolation, physiological features, genotyping and phylogenetic relationships among environmental and clinical isolates.** 2011. Ph. D. Thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

Free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba* are worldwide distributed, being frequently isolated from the environment. *Acanthamoeba* grow and multiply as trophozoites, and encyst when the conditions become adverse. Cysts are highly resistant stages that remain viable for several years in the environment. *Acanthamoeba* spp can cause severe opportunistic infections (granulomatous encephalitis, disseminated skin lesions) as well as keratitis, an infection that affects healthy individuals, particularly contact lenses wearers. At the genus level, *Acanthamoeba* can be identified by their characteristic morphology, and classified according to cyst size and morphology in three morphological groups (I, II, and II). Identification at species level is currently based on analyses of SSU rRNA gene sequences, and 17 genotypes (T1-T17) have been identified. *Acanthamoeba* remain scarcely investigated in Brazil, and almost nothing is known about the genetic diversity and the pathogenic potential of the species prevalent in our country. This study examined the presence of *Acanthamoeba* in 118 Brazilian environmental samples, and established 38 new axenic cultures that have been cryopreserved. Genotyping of these environmental isolates and of 11 *Acanthamoeba* isolates from Brazilian cases of keratitis was performed by analyses of partial SSU rRNA gene sequences. Phylogenetic analyses by different methods were used to infer the relationships among the Brazilian and other *Acanthamoeba* isolates. Analyses assigned 25 of the new environmental isolates, and 11 Brazilian keratitis isolates in genotype T4, indicating the high prevalence of this genotype in Brazil, and its high association with keratitis cases. In particular, *Acanthamoeba* ACC01, a T4, Brazilian isolate was closely related to the keratitis-causing isolate, *A. polyphaga* ATCC 30461 (~99% similarity); comparison of both isolates indicated that they are thermotolerant, osmotolerant, and secrete comparable amounts of proteolytic enzymes associated with similar serine- and cysteine peptidases. These results point to the pathogenic potential of *Acanthamoeba* ACC01. Five Brazilian environmental isolates were assigned to genotype T5, a monophyletic and robustly supported clade (~2.3 % internal divergence)

associated to the species *A. lenticulata*. One Brazilian environmental isolate (ARO04) was assigned to genotype T13. This study also identified seven Brazilian environmental *Acanthamoeba* isolates that form large, star-shaped cysts; this is the hallmark of the highly divergent species classified in the morphological group I, and currently assigned to genotypes T7, T8, T9, and T17. One of these isolates is closely related to *A. comandoni* (genotype T9), while the other six group with two isolates of genotype T17, forming a monophyletic clade (2.0% sequence divergence) that likely represents a new *Acanthamoeba* species. Further characterization of the T9 and T17 Brazilian isolates indicated their osmotic resistance, and ability to grow at temperatures up to 40°C; also suggesting their pathogenic potential, medium conditioned by trophozoites induced pronounced cytopathic effects on SIRC and HeLa cells *in vitro*. The T17, and T9 isolates were also shown to secrete important levels of proteolytic activities associated mainly to serinepeptidases. Serine peptidases play important roles in *Acanthamoeba* pathogenicity and a subtilisin gene from *A. healyi* has been cloned and sequenced (AhSUB). Degenerated primers targeting the catalytic domain of AhSUB gene were designed and used to amplify fragments of ~800 bp. Preliminary data from a small number of *Acanthamoeba* isolates suggest congruence between SSU rRNA- and AhSUB-based phylogenies.

Key-words: *Acanthamoeba*, SSU rRNA, genotyping, relationship phylogeny, serine peptidases, cytopathic effect

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Árvore dos eucariotos	31
Figura 2- Esquema do cistron ribossômico em <i>Acanthamoeba</i> spp	33
Figura 3- Representação esquemática do gene de subtilisina e localização dos oligonucleotídeos utilizados	47
Figura 4- Microscopia óptica de trofozoítas de <i>Acanthamoeba</i> de ambiente corados ou analisados a fresco	54
Figura 5- Características morfológicas de cistos de <i>Acanthamoeba</i> de ambiente encontrados neste estudo	55
Figura 6- Microscopia óptica de <i>Acanthamoeba</i> ACC01 e <i>A. polyphaga</i> ATCC 304	58
Figura 7- Microscopia de contraste de fase dos isolados brasileiros de <i>Acanthamoeba</i> do grupo morfológico I	62
Figura 8- Dependência do pH da atividade azocaseinolítica em meios condicionados por trofozoítas de <i>Acanthamoeba</i> do grupo morfológico I	66
Figura 9- Hidrólise de Azocoll em função do pH e efeito de inibidores classe-específicos	67
Figura 10- Detecção de peptidases em géis copolimerizados com gelatina a partir de meios condicionados por trofozoítas do grupo morfológico I	68
Figura 11- Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene de serina (subtilisina – <i>símile</i>) de espécies de <i>Acanthamoeba</i>	72
Figura 12- Árvore de máxima verossimilhança gerada pelo programa RaxML v7.0.4, baseada na sequência de aminoácido e nucleotídeo do gene de subtilisina	74
Figura 13- Árvore de máxima verossimilhança baseada na sequência de nucleotídeo do gene SSU gerada pelo programa RaxML v7.0.4	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação entre grupos morfológicos, genótipos e patologias associadas a humanos	35
Tabela 2- Composição da salina de Neff modificada	38
Tabela 3- Composição do meio PYG (ATCC 712)	40
Tabela 4- Isolados de <i>Acanthamoeba</i> sp utilizados neste estudo	41
Tabela 5- Meios de cultura utilizados para o cultivo de bactéria	49
Tabela 6- Matriz de divergência, em porcentagem, das sequências do gene de subtilisina	73

LISTA DE ABREVIATURAS

A.	<i>Acanthamoeba sp</i>
ATCC	American Type Culture Collection
AVL	Amebas de vida livre
B	Bayesiana
°C	graus celsius
DTT	ditiotreitol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	“Desoxiribonucleic acid”
DTU	“Discret Typing Units”
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
E-64	trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)-butano
g	grama
KCl	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio
h	hora
kDa	quilodalton
Kb	kilobases
LB	“Luria –Bertani Medium”
LDH	desidrogenase láctica
mA	miliampere
mU/ml	miliUnidades/millilitro de sobrenadante
M	molar
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	“Messenger ribonucleic acid”
MP	máxima parcimônia
MV	máxima verossimilhança
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo

NaCl	cloreto de sódio
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido hidreto
Na ₂ HPO ₄	fosfato disódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma
NJ	Neighbor joining
pb	pares de bases
Peps.	pepstatina
PBS	salina em tampão fosfato (sem sais de Ca ²⁺ e Mg ²⁺)
PMSF	fluoreto de fenil metil sulfonila
PHE	<i>orto</i> -fenantrolina; 1,10-fenantrolina
RAPD	“Random Amplified Polymorphic DNA”
rDNA	“Ribosomal desoxiribonucleic acid”
rRNA	“Ribosomal ribonucleic acid”
RNA	“Ribonucleic acid”
RNase	Ribonuclease
SE	Solução salina Tris-EDTA
Seg.	Segundos
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SDS	dodecil sulfato de sódio
SSU rRNA	“Small subunit ribosomal RNA genes”
TAE	tampão Tris acetato-EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TE	tampão tris-EDTA
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
U/E	USP/Escola Paulista de Medicina (isolado clínico)
U/Oft	USP/ Oft (isolado clínico)
UV	ultravioleta
v	volume
mg	micrograma
μl	microlitro

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	20
1.1 Amebas de vida livre potencialmente patogênicas.....	20
1.2 O Gênero <i>Acanthamoeba</i>	21
1.2.1 Morfologia geral e ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i>	21
1.2.2 Importância médica e epidemiológica de organismos do gênero <i>Acanthamoeba</i>	23
1.2.2.1 <i>Acanthamoeba</i> como reservatórios de patógenos encontrados no ambiente	23
1.2.2.2 Potencial patogênico de <i>Acanthamoeba</i>	24
1.3 Fisiopatologia das infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i>	27
1.4 Marcadores indiretos de virulência.....	29
1.5 Taxonomia e classificação de organismos do gênero <i>Acanthamoeba</i>	30
1.5.1 Classificação de organismos do gênero <i>Acanthamoeba</i> baseada em parâmetros morfológicos	32
1.5.2 Classificação de organismos do gênero <i>Acanthamoeba</i> baseada em sequências de SSU rDNA.....	32
1.5.2.1 O Gene ribossômico	33
1.5.2.2 Os diferentes genótipos de <i>Acanthamoeba</i> e sua associação com grupos morfológicos e doenças	34
2.0 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	36
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Isolamento de <i>Acanthamoeba</i> spp. de amostras de água e solo	38
3.2 Axenização, clonagem e manutenção das culturas.....	39
3.3 Isolados utilizados	40
3.4 Caracterização morfológica e biológica de isolados de <i>Acanthamoeba</i>	42
3.4.1 Estudo morfológico	42
3.4.2 Avaliação do crescimento em diferentes temperaturas (termotolerância).....	42
3.4.3 Crescimento em meio hiper-osmolar.....	42
3.5. Preparação de meios condicionados por trofozoítas.....	43
3.6 Meios condicionados por trofozoítas e efeito citopático	44
3.7 Determinação da atividade proteolítica em meios condicionados por trofozoítas	44
3.7.1 Determinação da atividade azocaseinolítica.....	44
3.7.2 Hidrólise de azocoll (azo dye impregnated collagen)	45
3.7.3 Detecção de peptidases em gel com substrato copolimerizado.....	45
3.8 Extração de DNA genômico.....	46

3.9 Amplificação parcial da subunidade menor (SSU) do gene ribossômico e do domínio catalítico de serina peptidases da família das subtilisinas por PCR.....	46
3.10 Eletroforese em gel de agarose.....	47
3.11 Purificação de fragmentos de DNA amplificados por PCR	48
3.12 Clonagem e sequenciamento dos produtos amplificados por PCR	48
3.13 Alinhamento de sequências de nucleotídeos e aminoácidos	49
3.14 Construção de árvores filogenéticas	50
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 A diversidade de <i>Acanthamoeba</i> spp no Brasil: do isolamento ao estabelecimento de culturas axênicas	52
4.2 Caracterização de isolados dos genótipos T4, T5 e T13 encontrados no Brasil ..	57
4.2.1 Anexo 1 - Diversidade entre espécies de <i>Acanthamoeba</i> do Brasil: genotipagem e inferências filogenéticas entre isolados de ambiente e de casos de ceratites	57
4.2.2 Anexo 2 - Genotipagem, caracterização biológica e bioquímica de <i>Acanthamoeba</i> sp ACC01 isolada de água de torneira, São Paulo, SP, Brasil.	58
4.3 Caracterização morfológica, fisiológica, bioquímica e molecular de <i>Acanthamoeba</i> spp. do grupo morfológico I (genótipos T7, T8, T9 e T17)	61
4.3.1 Anexo 3 - Revisitando as espécies de <i>Acanthamoeba</i> do grupo morfológico I (genótipos T7, T8, T9 e T17): caracterização de sete novos isolados de ambiente do Brasil e inferências filogenéticas.....	61
4.3.2 <i>Acanthamoeba</i> spp do grupo morfológico I e a secreção de proteases	64
4.3.2.1 Introdução.....	64
4.4 Amplificação, clonagem e sequenciamento do domínio catalítico de serina peptidases da subfamília das subtilisinas.....	70
REFERÊNCIAS	76

ANEXO 1 Genetic diversity among *Acanthamoeba* spp. isolated in Brazil: genotyping of clinical and environmental isolates, and phylogenetic inferences

ANEXO 2 - Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp isolated from tap water in Brazil

ANEXO 3 - Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): characterisation of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences (manuscrito submetido)

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Amebas de vida livre potencialmente patogênicas

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários amplamente dispersos na natureza. Foram isoladas pela primeira vez em 1913 (PUSHKAREW, 1913), mas seu envolvimento em patologia humana só foi reconhecido em meados da década de 1960, quando casos fatais de meningoencefalite foram descritos na Austrália. (FOWLER E CARTER, 1965). Sabe-se atualmente que AVLs dos gêneros *Acanthamoeba* (focalizadas no presente estudo), *Balamuthia*, *Naegleria* e *Sappinia* são organismos aeróbios de ampla distribuição geográfica e que algumas espécies são patogênicas para o homem e vários outros animais (MARTINEZ, 1985; MARTINEZ E VISVESVARA, 1997; SCHUSTER E VISVESVARA, 2004; VISVESVARA E MAGUIRE, 2006). Pelo fato de terem o meio ambiente como “habitat” natural (existindo, portanto, como organismos de vida livre), ocasionalmente invadindo e colonizando um hospedeiro, essas AVLs são também chamadas de amebas anfitriãs (PAGE, 1988). A capacidade de sobreviver e proliferar às temperaturas do hospedeiro, de persistir nas mucosas do hospedeiro e também a dose infectante e fenômenos associados à imunidade da mucosa e à imunodeficiência do hospedeiro são fatores considerados importantes para o estabelecimento da infecção por AVLs (FERRANTE, 1991; KHAN 2006).

Espécies dos gêneros *Acanthamoeba* e a espécie *Balamuthia mandrillaris* são causadores de encefalite amebiana granulomatosa, de infecções pulmonares e de pele, que acometem principalmente indivíduos imunodeprimidos ou debilitados. *Acanthamoeba* também provoca uma grave doença que compromete a visão (ceratite), que incide principalmente em usuários de lente de contato. Entre as quarenta espécies descritas no gênero *Naegleria*, apenas *Naegleria fowleri* causa uma meningoencefalite aguda hemorrágica e fulminante, levando à morte indivíduos saudáveis com história de contato recente com água contaminada (MARTINEZ E VISVESVARA, 1997; SCHUSTER E VISVESVARA, 2004; VISVESVARA E MAGUIRE, 2006). Recentemente, *Sappinia diploidea*, uma AVL normalmente encontrada em solo contaminado com fezes de alces, bisões e gado, foi identificada como a espécie causadora de encefalite em um homem jovem e saudável (GELMAN et al., 2001).

Provavelmente, outras amebas capazes de causar doenças em humanos serão futuramente descritas.

Como a maioria das infecções causadas por AVLs é fatal, o diagnóstico é, muitas vezes, feito *postmortem*, mesmo em países desenvolvidos, onde sofisticados métodos diagnósticos estão disponíveis.

1.2 O Gênero *Acanthamoeba*

Em 1913, Pushkarew isolou uma ameba de poeira e a nomeou *Amoeba polyphagus*. Em 1930, Castellani isolou um contaminante de uma placa de cultura de leveduras, uma ameba hoje designada *Acanthamoeba castellanii*. Atualmente, existem mais de 24 espécies de *Acanthamoeba* identificadas com base em critérios morfológicos.

Acanthamoeba spp. são, provavelmente, os protozoários de vida livre mais abundantes no ambiente (PAGE, 1988; MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003); apresentam ampla distribuição geográfica, sendo frequentemente isoladas de solo, coleções de água, esgoto, amostras de ar atmosférico, poeira, sistemas centrais de ar condicionado e equipamentos hospitalares, bem como de uma grande variedade de organismos, incluindo peixes, répteis, pássaros, mamíferos (gorilas, cangurus, cachorro etc.) e seres humanos (SCHUSTER E VISVESVARA, 2004, KHAN, 2006, VISVESVARA et al., 2007, SRIRAM, et al., 2008). Já foi demonstrado que mais de 80% de indivíduos norte-americanos saudáveis possuem anticorpos contra *Acanthamoeba*, o que indica ser muito frequente a exposição humana a este protozoário (CURSONS et al., 1980, BRINDLEY et al., 2009).

1.2.1 Morfologia geral e ciclo de vida de *Acanthamoeba*

Acanthamoeba spp apresentam duas formas evolutivas: trofozoítos, formas multiplicativas, de locomoção e nutrição (que se dá principalmente pela fagocitose de microrganismos), e cistos, formas de resistência que favorecem a perpetuação e a dispersão dos organismos no ambiente.

As formas trofozoítas apresentam único núcleo, com nucléolo centralizado bem evidente, e grande número de vacúolos no citoplasma, entre os quais um, de natureza

contrátil, é responsável pela regulação osmótica; os demais vacúolos são de natureza digestiva (BOWERS E KORN, 1968, PAGE, 1988). A locomoção de trofozoítas ocorre de forma semelhante, independentemente da superfície de contato (se interface água-ar ou substrato sólido). O trofozoíta é impulsionado por projeções de pequeno diâmetro (contatos focais), disso resultando a emissão de expansões finas do citoplasma (os acantopódios), também utilizadas para a captura de alimentos (PRESTON et al., 2001).

O encistamento, parte natural do ciclo de *Acanthamoeba*, ocorre normalmente quando as condições do ambiente tornam-se adversas, por exemplo, com a redução das fontes de carbono e outros nutrientes ou mudanças bruscas de temperatura e pH (NEFF E NEFF, 1969, PAGE, 1988). Em cultura, o encistamento pode ser induzido pelo empobrecimento do meio ou com a transferência de trofozoítas para soluções hiperosmolares (NEFF et al., 1964). Durante o processo, que requer oxigênio, cálcio e magnésio, modifica-se o metabolismo celular, ocorrendo, concomitantemente, diminuição da massa citoplasmática, gradual desidratação do organismo e síntese da dupla parede do cisto: primeiramente, há formação da parede externa (ectocisto - composto principalmente por proteínas) e, em seguida, da parede interna (endocisto - que contem celulose) (BOWERS E KORN, 1969, WEISMAN 1976). Cistos de *Acanthamoeba* spp. têm a capacidade de tolerar uma variedade de agentes físicos (altas temperaturas, congelamento, radiação ultravioleta) e químicos (desinfetantes, antimicrobianos e poluição ambiental, incluindo metais pesados, herbicidas e pesticidas) que possam existir em seu “habitat” natural (MAZUR et al., 1995, AKSOZEK et al., 2002, HEASELGRAVE et al., 2006). Além disso, já foi mostrado que os cistos de *Acanthamoeba* podem resistir a dessecação por mais de 20 anos, permanecendo viáveis e infectantes (SRIRAM et al., 2008). A grande resistência das formas císticas provavelmente explica a abundância e o isolamento frequente de *Acanthamoeba* das mais variadas coleções de água (de torneira, piscina, mar), solo, poeira etc. (CULBERTSON, 1971, SCHUSTER E VISVESVARA, 2004, IBRAHIM et al., 2007, GIANINAZZI et al., 2009, MAGLIANO et al., 2009).

Os cistos são compostos por diversas proteínas e celulose (que representa 10% de seu peso). Apresentam um opérculo, estrutura tida como ponto de saída do trofozoíta ao desencistar, o que ocorre quando as condições são favoráveis (SCHUSTER E VISVESVARA, 2004, KHAN, 2006). Diversas moléculas que fazem parte do complexo processo gradual de encistamento já foram identificadas, entre as quais duas serinas peptidases: (EMSP) e uma proteína específica do processo de encistamento (CSP21)

além de celulose sintase I e II (CSI e CSII) e glicogênio fosforilase (GP) (HIRUKAWA et al. 1998, MOON et al. 2008, POTTER E WEISMAN 1971, LORENZO-MORALES et al. 2008)

Recentemente, foi demonstrado que a exposição de *Acanthamoeba* a concentrações relativamente baixas de solventes orgânicos induz uma resposta celular imediata que leva a formação de um revestimento simples na superfície do trofozoíta, chamado de pseudocisto. À primeira vista, a formação desse revestimento pode parecer um processo mais acelerado de encistamento, mas que, entretanto, difere em vários aspectos de um cisto propriamente dito. A expressão do gene CSP21 não foi detectada em nenhum momento durante a formação de pseudocistos, os quais, por outro lado, se mostram menos resistentes ao calor, dessecação e a baixos valores de pH. Além disso, análises de ultraestrutura indicam ausência da parede interna (endocisto), característica marcante e sempre presente em um cisto de *Acanthamoeba*, sugerindo, portanto, que a formação do pseudocisto e o encistamento propriamente dito são dois fenômenos distintos que podem ser ativados sob condições externas específicas (KLIESCIKOVA et al., 2011a e b).

1.2.2 Importância médica e epidemiológica de organismos do gênero *Acanthamoeba*

1.2.2.1 *Acanthamoeba* como reservatórios de patógenos encontrados no ambiente

Embora acantamebas sejam facilmente cultivadas em meios axênicos há 50 anos ou mais (NEFF, 1957 e 1958), na natureza, a fagotrofia é a principal forma de nutrição desses protozoários. Mast e Doyle (1934) foram os primeiros a mostrar que a fagocitose é o modo normal de alimentação das amebas e que a pinocitose é observada em resposta a uma dieta líquida. A nutrição por fagocitose é desencadeada pelo reconhecimento e adesão, seguida da internalização e destruição de microorganismos, mecanismos que ainda permanecem pouco explorados em *Acanthamoeba*. Sabe-se que trofozoítas fagocitam de forma seletiva, havendo, portanto, preferência por certas partículas (RABINOVITCH E DE STEFANO, 1971) e substratos bacterianos (BOTTONE et al., 1994). Estudos de interação acantameba-bactéria apontam para *Stenotrophomonas maltophilia*, *E. coli* K-12 e *Enterobacter aerogenes* como as melhores fontes de

nutrientes (WEEKERS et al., 1995; BOTTONE et al., 1994; WANG E AHEARN, 1997; DE MORAES E ALFIERI, 2008).

A interação *Acanthamoeba*-bactéria ganhou importância em anos mais recentes com a observação de que vários patógenos resistem e sobrevivem no interior de trofozoítas e cistos (BROWN E BARKER, 1999; WINIECKA-KRUSNELL E LINDER, 1999, 2001; HUWS et al., 2008). A descoberta de que *Legionella pneumophila*, bactéria responsável por pneumonites humanas, podia ser isolada da água de condicionadores de ar levou à demonstração de que a bactéria sobrevive e prolifera em *Acanthamoeba* sp (RODRIGUEZ-ZARAGOZA, 1994; ADELEKE et al., 1996). Além disso, é fato hoje bem documentado que a virulência de bactérias, como *L. pneumophila* e *Mycobacterium avium*, aumenta após o ciclo intracelular (CIRILLO et al., 1994; 1997; 1999; GREUB E RAOULT, 2004). Culturas de *Acanthamoeba* podem também ser infectadas por patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *Vibrio cholera*, *Salmonella tryphimurium*, *Burkholderia cepacia* (revisões: GREUB E RAOULT, 2004, THOMAS et al., 2010).

As mesmas bactérias presentes em trofozoítas podem ser encontradas em cistos (KILVINGTON E PRICE, 1990; YAGITA et al., 1995). Steinert et al. (1998) descreveram a presença de bactérias viáveis na parede (*Mycobacterium avium*) e em vacúolos (*Legionella pneumophila*) de cistos de *A. polyphaga*. A localização de microorganismos em cistos é de extrema relevância devido à resistência de cistos a agentes desinfetantes, o que protege as bactérias alojadas em seu interior (DE JONCKHEERE E VAN DE VOORDE, 1976; DE JONCKHEERE 1991; CHANG et al., 1985).

1.2.2.2 Potencial patogênico de *Acanthamoeba*

Além de atuarem como reservatórios de patógenos no ambiente, várias espécies de *Acanthamoeba* adquiriram importância médica, como agentes de infecções em humanos.

A patogenicidade de *Acanthamoeba* para camundongos foi descrita por Culbertson em 1958, que observou a morte em 3 a 4 dias de animais inoculados experimentalmente com uma cultura de células acidentalmente contaminada por trofozoítas. Os animais rapidamente desenvolveram um processo infeccioso do sistema

nervoso central, consequência de uma invasão disseminada de trofozoítas. Os primeiros casos humanos de infecção por *Acanthamoeba* (encefalites e ceratites) foram claramente diagnosticados nos anos 1970 (MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003; NAGINGTON et al., 1974). Em anos mais recentes, ceratites causadas por outras amebas de vida livre, como *Vahlkampfia*, *Hartmannella* e *Vannella* foram também descritas (AITKEN et al., 1996, SCHUSTER E VISVESVARA, 2004). Casos de acantamebíase disseminada em pacientes com AIDS (sinusites, rinites, pneumonias e infecções cutâneas envolvendo ou não o sistema nervoso central) adquiriram importância mais recentemente (MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003, KHAN, 2006, VISVESVARA, 2010, SIDIQI, 2011).

A encefalite granulomatosa causada por *Acanthamoeba* (AGE) é uma infecção de curso lento e progressivo, levando, na grande maioria dos casos, ao óbito dos pacientes. Trata-se de infecção oportunista que acomete indivíduos imunologicamente comprometidos, submetidos à terapia imunossupressora ou infectados pelo vírus HIV (MARTINEZ, 1982, 1985; FERRANTE, 1991; SISON et al., 1995; MARCIANO-CABRAL et al., 2000, VISVESVARA, 2010, SIDIQI, 2011). Os sinais e sintomas da infecção incluem dores de cabeça, convulsões, alterações comportamentais, náusea, febre, vômito, rigidez de nuca, letargia e aumento da pressão intracraniana. Autópsias revelam edema cerebral, áreas corticais e gânglios basais edemaciados e múltiplas áreas de necrose hemorrágica nos tecidos do SNC. O tronco cerebral, hemisférios cerebrais e cerebelo podem apresentar áreas de infartos hemorrágicos. Exames histológicos revelam a presença de células gigantes multinucleadas nos hemisférios cerebrais, tronco cerebral, mesencéfalo, cerebelo e gânglio basal. Tecido necrótico com lipídios contendo macrófagos e neovascularização sugerindo um tumor é muitas vezes visto. Trofozoítos e cistos são geralmente encontrados no tecido (VISVESVARA, 2007, 2010).

Ao contrário da encefalite, a ceratite por *Acanthamoeba* (AK – *Acanthamoeba keratitis*) ocorre em indivíduos imunologicamente competentes, particularmente, mas não exclusivamente, em usuários de lentes de contato (SCHUSTER E VISVESVARA, 2004). Apesar de vários casos terem sido relatados no Brasil (SOUSA et al., 2008; CARVALHO et al, 2009, 2010), não há estatísticas que permitam concluir sobre a incidência de ceratites por *Acanthamoeba* no país. Alguns estudos associam a maior incidência de AK em alguns países aos seguintes fatores: utilização de lentes de contato (mais comum em países desenvolvidos); a presença de cepas mais virulentas de

Acanthamoeba; clima; tratamento e qualidade da água que abastece as regiões; a resistência e a ampla distribuição de cistos no ambiente (IBRAHIM et al., 2007).

A ceratite por *Acanthamoeba* é uma doença dolorosa que se caracteriza pela destruição progressiva dos tecidos da córnea. O quadro clínico pode, nos estágios iniciais, ser facilmente confundido com ceratites virais, bacterianas ou fúngicas. A característica clínica mais evidente de AK é a presença de um infiltrado em forma de anel, que pode conter células inflamatórias tais como neutrófilos (MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003). O diagnóstico de AK se dá a partir do isolamento de *Acanthamoeba*, tanto das lentes de contato quanto de material colhido por raspado de córnea. O uso da microscopia confocal já foi bastante útil no diagnóstico de ceratite por *Acanthamoeba* (WINCHESTER et al., 1995). Atualmente, os métodos baseados em PCR usando o gene SSU rRNA como alvo foram desenvolvidos para a detecção rápida de *Acanthamoeba*. Este método é altamente específico e sensível, podendo detectar menos de cinco trofozoítas/cistos por amostra (LEHMANN et al, 1998; KHAN et al, 2001; SCHROEDER et al, 2001).

Alguns fatores são cruciais e bem estabelecidos como riscos para o desenvolvimento da doença em usuários de lente de contato. O uso prolongado de uma mesma lente de contato ocasiona seu desgaste e, conseqüentemente, a deixa porosa; de fato, Beattie et al. (2003) mostraram maior adesão de *Acanthamoeba* a lentes de contato usadas, em comparação com lentes de contato novas. Testes realizados em lentes de contato usadas mostraram a presença de diversos sacarídeos (manose, glicose, galactose, fucose, N-acetil-D-glucosamina e N-acetil-D-galactosamina), ácido siálico, glicoproteínas, lipídios, mucinas, polissacarídeos, cálcio, ferro, silício, magnésio, sódio, lactoferrina, lisozima e imunoglobulina do tipo IgG, o que propicia maior adesão de trofozoítas (TRIPATHI E TRIPATHI, 1984; GUDMUNDSSON et al, 1985; KLOTZ et al, 1987).

Existem alguns estudos que demonstraram que o trauma da córnea é uma condição que facilita a infecção por *Acanthamoeba*. Animais com córneas intactas aparentemente não desenvolvem a infecção (CHANG E SOONG, 1991 NIEDERKORN et al., 1999). Por outro lado, a falta de higiene e/ou limpeza inadequada das lentes propicia a formação de biofilmes bacterianos (fonte de nutrientes para *Acanthamoeba*), enquanto que a exposição a águas contaminadas certamente aumenta o risco de infecção (IBRAHIM et al., 2007).

Dada a resistência a vários quimioterápicos e agentes utilizados na higienização de lentes de contatos, a presença de cistos na lesão claramente dificulta o tratamento das ceratites (MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003). Recentemente, Kliescikova (2011a) descreveu a formação de um pseudocisto (já discutido no item 1.2.1) de *Acanthamoeba* durante a exposição ao polipropileno glicol, uma substância que atua como lubrificante e controlador osmótico que é amplamente utilizada por diversas indústrias farmacêuticas no preparo de soluções para higienização de lentes de contato.

Com relação ao tratamento, o prognóstico para a ceratite causada por *Acanthamoeba* melhorou consideravelmente nos últimos anos, provavelmente devido à melhora no diagnóstico e início mais precoce do tratamento. A grande problemática no que se refere a AK ainda continua sendo a resistência dos cistos ao tratamento, o que pode levar à recorrência da infecção. Os cistos, por causa de sua dupla parede e a presença de celulose na parede interna, são bastante resistentes às drogas atualmente recomendadas para o tratamento das ceratites por *Acanthamoeba*: polihexametileno biguanida (PHMB), clorohexidina, diamidinas, isotionato de propamidina (Brolene) e hexamidina (Desomedine). O tratamento da infecção ocular é difícil e de longo prazo. As drogas são utilizadas no início do tratamento de hora em hora por até 3 dias, seguindo-se um período de gradual redução e etapa de manutenção, quando uma mistura de drogas é utilizada apenas uma vez ao dia.

O tratamento das infecções disseminadas (oportunistas) é complicado e frequentemente mal sucedido, mesmo em esquemas de combinação de drogas (itraconazol, azitromicina, 5-fluorocitosina, rifampicina, anfotericina B). Alguma eficácia é conseguida quando o diagnóstico é precoce e a quimioterapia instituída antes que o parasita atinja o sistema nervoso central (MARCIANO-CABRAL E CABRAL 2003, BARETE et.al., 2007, LACKNER, et. al., 2010)

1.3 Fisiopatologia das infecções causadas por *Acanthamoeba*

Os mecanismos que determinam a patogenia de *Acanthamoeba* ainda não estão suficientemente esclarecidos, conhecendo-se ainda pouco sobre a progressão das lesões no sistema nervoso central (SNC) e mais sobre a infecção ocular.

A passagem nasal e o sangue são rotas possíveis da infecção cerebral, mas a ampla distribuição das lesões cerebrais, o grande número de parasitas encontrados no

espaço perivascular do parênquima cerebral bem como em vários outros órgãos indicam ser mais provável a disseminação via hematogênica, apesar de existirem relatos de indivíduos imunocomprometidos com infecções cutâneas disseminadas que não desenvolveram a infecção no SNC (KHAN, 2008, VISVESVARA E MAGUIRE, 2006). Acredita-se que a infecção humana possa ocorrer via trato respiratório, que conduz o parasita aos vasos sanguíneos alveolares e destes para vários órgãos/tecidos, e também por lesões cutâneas, a partir das quais o parasita pode atingir a circulação. Existem evidências de que a invasão do SNC se dê pela barreira hemato-encefálica (KHAN, 2008, VISVESVARA E MAGUIRE, 2006, VISVESVARA et al., 2007).

Algumas moléculas já identificadas desempenham um papel chave na patogênese da encefalite por *Acanthamoeba*. Entre elas estão uma proteína ligadora de manose (MBP), responsável pela adesão do trofozoíta a célula alvo, que aciona uma cascata de sinalização associada a proteínas Rho, e uma serina peptidase que atua na degradação de proteínas estruturais do cérebro contribuindo para a progressão da lesão no SNC (KHAN, 2008, VISVESVARA E MAGUIRE, 2006, SIDIQI, 2011).

No que se refere à infecção ocular, os estudos demonstram que a adesão de trofozoítas a glicoproteínas manosiladas do epitélio da córnea é mediada por uma proteína (136 kDa) ligadora de manose (GARATE et al., 2004, 2005) e que a adesão desencadeia a cascata patogênica da ceratite: destruição do epitélio da córnea; penetração da membrana de Bowman; e degradação de colágeno, a principal proteína estrutural do estroma (MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003; CLARKE E NIEDERKORN, 2006). A adesão de trofozoítas induz a secreção do fator de virulência MIP 133 (“manose induced protein” 133), uma serina peptidase de 133 kDa. A MIP 133 induz apoptose de queratócitos, de células da íris, epiteliais pigmentares da retina e epiteliais e endoteliais da córnea (CLARKE E NIEDERKORN, 2006). A ausência de MIP 133 em isolados de *Acanthamoeba* considerados não patogênicos reforça seu envolvimento na cascata patogênica da ceratite. Pelo menos um trabalho descreve secreção induzida de metalopeptidases (CAO et al., 1998), o que também sugere o envolvimento de outras proteases nos instantes iniciais da infecção.

Contribuem para a destruição dos tecidos e o processo de invasão a atividade fagocítica de *Acanthamoeba* e efeitos citopáticos produzidos por moléculas liberadas por trofozoítas, principalmente peptidases (MATTANA et al., 2002; ALSAM et al., 2005; MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003; CLARKE E NIEDERKORN, 2006; KHAN, 2006). Trofozoítas de várias espécies de *Acanthamoeba* secretam

constitutivamente enzimas proteolíticas, incluindo: um fator ativador de plasminogênio, que foi purificado a partir de sobrenadantes de cultura de *A. castellanii* (MITRA et al., 1995); serina peptidases (FERRANTE E BATES, 1988; HE et al., 1990; MITRO et al., 1994; ALFIERI et al., 2000; KONG et al., 2000; HONG et al., 2000; NA et al., 2001, 2002; KIM et al., 2003; CLARKE E NIEDERKORN, 2006; FERREIRA et al., 2009); cisteína peptidases (HADAS E MAZUR, 1993; MITRO et al., 1994; ALFIERI et al., 2000) e, possivelmente, metalopeptidases (MITRO et al., 1994; ALFIERI et al., 2000; FERREIRA et al., 2009, SISSONS et al. 2006; MAGLIANO et al., 2009)

Evidências experimentais indicam que serina peptidases constitutivamente secretadas contribuem diretamente para o dano celular (CAO et al., 1998; LEHER et al., 1998; KHAN et al., 2000; ALSAM et al., 2005; CLARKE E NIEDERKORN, 2006; KIM et al., 2006). Por degradarem uma variedade de substratos proteicos (imunoglobulinas, interleucinas, inibidores endógenos de serina peptidases, elastina, fibronectina, colágenos tipo I e IV), facilitam a invasão dos tecidos e a evasão da resposta imune do hospedeiro (CHO et al., 2000; KONG et al., 2000; NA et al., 2001; CLARKE E NIEDERKORN, 2006; KIM et al., 2006; ALIZADEH et al., 2008; FERREIRA et al., 2009). Para alguns autores, a degradação do colágeno, principal proteína estrutural da córnea, resulta da ação de várias collagenases não específicas (CLARKE E NIEDERKORN, 2006), incluindo serina peptidases da família das subtilisinas (~33 kDa), elastases, cisteína peptidases (65 kDa) e metalopeptidases.

1.4 Marcadores indiretos de virulência

O potencial patogênico de isolados de *Acanthamoeba* pode ser avaliado diretamente, mediante inoculação intranasal em camundongos (modelo de encefalite) ou aplicação em córnea de coelho previamente lesada (modelo de ceratite) (MARTÍNEZ 1985; HE et al., 1990). Por serem procedimentos de execução mais lenta que requerem a utilização de animais, muitos estudos utilizam indicadores indiretos de virulência previamente validados em experimentos simultaneamente realizados com modelos animais. Estes incluem:

A) Capacidade/facilidade de adaptação a condições de estresse. Isolados patogênicos normalmente crescem a temperaturas mais elevadas (34, 37 ou mesmo 40°C) e são osmotolerantes, isto é sobrevivem/proliferam quando transferidos para

meios hiperosmolares (KHAN 2000; KHAN E PAGET 2001; KHAN E TAREEN 2003, MAGLIANO et al., 2009).

B) Capacidade de produzir efeito citopático, isto é, destruição de monocamadas de células. Nestes ensaios, trofozoítas ou meios condicionados por trofozoítas são incubados com linhagens celulares (por exemplo, células SIRC – fibroblastos de córnea de coelho, células Vero ou LLC-MK2). Um isolado pode ser considerado não patogênico, pouco ou muito patogênico de acordo com a extensão da destruição observada em monocamadas celulares.

C) Secreção importante de atividade associada a serina peptidases. Apesar da diversidade de peptidases secretadas, a função de serina peptidases parece ser a mais relevante, pois contribuem para o efeito citopático (CAO et al. 1998; LEHER et al. 1999; HURT et al. 2003) e também são capazes de degradar proteínas do hospedeiro (KONG et al. 2000; NA et al. 2001). Embora se saiba que isolados patogênicos e não patogênicos secretam peptidases de forma constitutiva, isolados patogênicos caracterizam-se pela secreção aumentada de serina peptidases (KHAN, 2006), cuja atividade pode destruir monocamadas de células de várias linhagens, incluindo as de córnea de coelho e epiteliais da córnea humana (CAO et. al., 1998; LEHER et al., 1998; HURT et al., 2003; KIM et al., 2006; SISSONS et al., 2006).

1.5 Taxonomia e classificação de organismos do gênero *Acanthamoeba*

A classificação taxonômica clássica dividiu os protozoários em quatro grandes grupos: Sarcodina (amebas), Mastigóforos (flagelados), Sporozoa (a maioria dos protozoários parasitas) e Infusoria (ciliados). Esta taxonomia foi totalmente abandonada pela Sociedade Internacional de Protozoologistas que introduziu a nova classificação, baseada na abordagem contemporânea das filogenias moleculares (Adl et al., 2005). Com isso, os sistemas hierárquicos que agrupavam os organismos em reinos, filos, classes, subclasses, super-ordens e ordens cederam lugar a uma nova classificação, que agora agrupa os eucariontes em seis grandes grupos ou Super-Grupos: Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Plantae, Chromalveolata e Excavata (Figura 1). Os quatro gêneros de AVLs potencialmente patogênicas ao homem foram classificados em dois super grupos, Amoebozoa e Excavata, como segue: (a) *Acanthamoeba* e *Balamuthia* estão classificadas no super-grupo Amoebozoa, sub-divisão Acanthamoebidae; (b)

Sappinia no super-grupo Amoebozoa, sub-divisão Thecamoebidae: Flabellinea; e (c) *Naegleria fowleri* no super-grupo Excavata, Heterolobosia: Vahlkampfiidae. Importante salientar que este esquema foi proposto como base para as futuras (e necessárias)

revisões.

Figura 1. Árvores dos eucariotos baseadas na nova nomenclatura proposta pela Sociedade Internacional de Protozoologistas.

Fonte: KEELING, et. al., 2005.

1.5.1 Classificação de organismos do gênero *Acanthamoeba* baseada em parâmetros morfológicos

Durante muitos anos, a classificação de amebas do gênero *Acanthamoeba* esteve apoiada apenas em parâmetros morfológicos, que levavam principalmente em conta o tamanho e a morfologia de cistos. Isto certamente gerou atribuição de nomes distintos para organismos da mesma espécie ou de um mesmo nome a outros que, na realidade, podem corresponder a espécies distintas. A classificação morfológica proposta por Pussard E Pons (1977), subdividiu o gênero em três grupos morfológicos distintos (I, II, III). As espécies definidas no grupo morfológico I (*A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. tubiashi*) são as que apresentam cistos de maiores dimensões (diâmetro médio $>18\ \mu\text{m}$), sendo o endocisto caracteristicamente estrelado e o ectocisto liso. No grupo II, que abriga a maioria das espécies de *Acanthamoeba* (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. triangularis*, *A. divionensis* (= *A. paradivionensis*), *A. mauritaniensis*, *A. lugdunensis* e *A. quina*), os cistos (diâmetro médio $<18\ \mu\text{m}$) apresentam ectocisto irregular e o endocisto com forma variável, podendo ser poligonal, triangular ou oval. No grupo III estão as espécies cujos cistos têm diâmetro médio $<19\ \mu\text{m}$ (*A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. jacobsi*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa*, *A. royreba*), sendo o ectocisto liso e o endocisto em forma que varia de poligonal a oval (MARCIANO-CABRAL E CABRAL 2003).

1.5.2 Classificação de organismos do gênero *Acanthamoeba* baseada em sequências de SSU rDNA

Em anos mais recentes, a identificação e a taxonomia de *Acanthamoeba* spp. começou a ser revisada com base em filogenias moleculares que utilizam principalmente sequências da subunidade menor (SSU) do rRNA como marcadores moleculares. A abordagem molecular definiu, até o momento, 17 genótipos (T1 a T17) no gênero *Acanthamoeba* (STOTHARD et al., 1998, HORN et al., 1999; GAST, 2001; HEWETT et al., 2003, CORSARO E VENDITTI, 2010; NUPRASERT et al. 2010).

1.5.2.1 O Gene ribossômico

Os eucariotos compartilham um DNA ribossômico (rDNA) que apresenta uma estrutura complexa e distinta, frequentemente utilizada em inferências de relacionamento filogenético (HILLIS E DIXON, 1991).

As seqüências do gene ribossômico têm-se revelado úteis em análises filogenéticas e evolutivas uma vez que esta região é equivalente em todos os organismos conhecidos (SOGIN et al., 1986). Além disso, diferentes regiões do gene ribossômico exibem diferentes graus de variabilidade, sendo possível analisar regiões variáveis ou conservadas para inferências filogenéticas (HILLIS E DIXON, 1991). As regiões conservadas são úteis na construção de oligonucleotídeos que permitem amplificar por PCR o gene ribossômico de organismos distintos. A subunidade menor do gene ribossômico (SSU) tem sido utilizada com muita frequência em análises filogenéticas de protozoários devido à facilidade de amplificação por PCR e presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas, que são fundamentais para a obtenção de alinhamentos confiáveis. Estas características tornaram a utilização de seqüências do gene ribossômico uma excelente ferramenta em estudos filogenéticos e evolutivos.

Os genes nucleares de rDNA de *Acanthamoeba* (Fig. 2) possuem uma estrutura característica e já foi determinado que a unidade de repetição do cistron ribossômico é de cerca de 12.000 pares de base (pb). O número de unidades de repetição parece ser em torno de 600 cópias no genoma (BYERS et al.1990). A subunidade maior (LSU rDNA) está subdividida em dois segmentos de 2.400 pb (LSU a) e 2.000 pb (LSU b), separados por um espaçador interno transcrito (ITS) de cerca de 200 pb, que é removido do transcrito primário.

O RNA da subunidade menor de *Acanthamoeba* tem um tamanho de cerca de 2.300 a 2.700 pb dependendo da espécie.

Figura 2– Esquema do cistron ribossômico em *Acanthamoeba* spp

1.5.2.2. Os diferentes genótipos de *Acanthamoeba* e sua associação com grupos morfológicos e doenças

O desenvolvimento de ferramentas da biologia molecular, tais como análise do DNA mitocondrial (BOGLER et al., 1983), RNA ribossômico (GAST et al., 1996; STOTHARD et al., 1998), RADP (ALVES et al., 2000) e dot-blot reverso (GAST et al., 2001) contribuíram significativamente para a classificação em nível de espécies de *Acanthamoeba*. Dos métodos propostos, o adotado atualmente é a classificação/genotipagem feita pela análise do SSU rDNA. A técnica, inicialmente descrita por GAST et al. (1996), foi muito bem explorada no estudo pioneiro de Stothard et al. (1998), que culminou com a classificação de 53 isolados de *Acanthamoeba* em 12 tipos de sequências ou genótipos (T1 a T12), separados por divergência $> 5\%$ entre as sequências (divergência $\leq 5\%$ colocam os isolados em um mesmo genótipo). Posteriormente, diferentes pesquisadores estabeleceram outros cinco genótipos, totalizando, até o momento, 17 genótipos (T1 a T17) no gênero *Acanthamoeba* (STOTHARD et al., 1998, HORN et al., 1999; GAST, 2001; HEWETT et al., 2003, CORSARO E VENDITTI, 2010; NUPRASERT et al., 2010). A integração dos grupos morfológicos com os dados de sequência e a possível correlação entre genótipos e doença está relacionada na Tabela 1.

O número de sequências de SSU rRNA disponíveis aumentou significativamente nos últimos anos, revelando alta prevalência de organismos do genótipo T4 no ambiente e, também, uma forte associação de T4 com a imensa maioria (~90%) dos casos de ceratite (MAGSHOOD et al., 2005). Poucos casos de infecção ocular foram até o momento associados a outros genótipos (STOTHARD et al., 1998; WALOCHNIK et al., 2000; LEDEE et al., 1996, 2009; SPANAKOS et al., 2006). Se a associação de T4 com ceratite simplesmente decorre da alta prevalência de T4 no ambiente ou indica maior virulência das espécies desse genótipo é aspecto que ainda deverá ser esclarecido.

Tabela 1. Relação entre grupos morfológicos, genótipos e patologias associadas a humanos

Grupo morfológico	Genótipo	Patologia associada
II	T1	Encefalite
II	T2/T4	Encefalite e Ceratite
II	T3	Ceratite
III	T5/T10	Encefalite e Ceratite
III	T6/T15	Ceratite
I	T7/T8/T9/T17	NA ^b
II	T11	Ceratite
II	T12	Encefalite
ND ^a	T13	Ceratite
II	T14	Ceratite
ND ^a	T16	Ceratite

^a ND, grupo morfológico não definido

^b NA, genótipos não relacionados a infecção em humanos

2.0 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Além da importância ecológica, organismos do gênero *Acanthamoeba* assumiram, nas últimas décadas, relevância como reservatórios de patógenos importantes encontrados no ambiente e também como agentes de infecções oportunistas e não oportunistas que acometem o homem e animais. Estudos recentes salientam a necessidade de revisar a taxonomia das espécies do gênero *Acanthamoeba* com base em inferências filogenéticas (Stothard *et al.*, 1998; Maghsood 2005). Para tanto, torna-se fundamental analisar um número maior de isolados representativos dos diferentes grupos, ambientes e regiões geográficas, incluindo países/regiões onde tanto a presença quanto a diversidade de *Acanthamoeba* spp foram muito pouco exploradas. No Brasil, poucos são os casos de ceratite por *Acanthamoeba* descritos e são raros os estudos com isolados de casos clínicos (Alves, 2001, Tese de Doutorado; Alves *et al.*, 2000; Kashiwabuchi *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2008). Pelo menos um caso de meningoencefalite por ameba do gênero *Balamuthia*, foi descrito no Brasil (Silva-Vergara *et al.*, 2007). Não existe informação clara a respeito da prevalência de ceratites, tampouco há registros de infecções por *Acanthamoeba* em indivíduos imunossuprimidos em território Brasileiro. Da mesma forma, são raros os estudos de isolamento, cultivo axênico e genotipagem de *Acanthamoeba* spp de amostras de solo e água do Brasil (Caumo *et al.*, 2009), não sendo, portanto, ainda possível avaliar a diversidade e a prevalência de isolados no Brasil e, tampouco, o potencial risco de infecção humana. Portanto, este trabalho tem como objetivos específicos:

1º) Isolar, clonar e estabelecer o cultivo axênico de isolados que apresentem morfotipo característico do gênero *Acanthamoeba*;

2º) Caracterizar morfologicamente (por microscopia de luz) alguns isolados representativos da diversidade encontrada;

3º) Analisar o polimorfismo genético do gênero *Acanthamoeba*, inferindo relações filogenéticas baseadas em sequências do gene SSU rRNA dos isolados de ambiente e de casos clínicos do Brasil.

4º) Avaliar parâmetros biológicos e bioquímicos que possam indicar potencial patogênico: crescimento a temperaturas mais elevadas; crescimento/sobrevivência em meios hiperosmolares; presença de efeito citopático; e secreção de peptidases.

5º) Amplificar e sequenciar o domínio catalítico do gene de uma serina peptidase da família das subtilisinas para, por inferências filogenéticas, comparar filogenias baseadas nas sequências do gene de subtilisina com as obtidas a partir de sequências de SSU rRNA.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento de *Acanthamoeba* spp. de amostras de água e solo

As amostras de solo e água foram colhidas em tubos estéreis com capacidade de 50 ml e processadas de formas distintas. As amostras de água (50 ml) eram divididas em partes iguais, uma das quais era filtrada em membrana Millipore (porosidade de 0,45 µm) e a outra centrifugada (400 x g, 10 min), sendo o sedimento ressuspense em pequeno volume (~500 µl) de salina de Neff modificada (Tabela 2). O material ressuspense era semeado em placas de cultura (60 mm de diâmetro) contendo ágar-extrato de soja a 0,2 % e as membranas de filtração eram diretamente colocadas sobre o meio de cultura. As amostras de solo eram semeadas diretamente em meio ágar-extrato de soja. Para a coleta de amostras de sedimento, “swabs” estéreis eram passados sobre as superfícies de interesse, por exemplo, pedras situadas às margens de rios e lagos; os “swabs” eram em seguida mergulhados em tubos contendo salina de Neff modificada, sendo o material então incubado durante 24 horas a 28 °C. Após o período de incubação, a suspensão era centrifugada (400 x g, 10 min) e o sedimento semeado em placas contendo ágar-soja.

Após a semeadura, as placas eram incubadas a 28 °C ou a temperatura ambiente e examinadas diariamente, em microscópio invertido.

Tabela 2. Composição da salina de Neff modificada

Sais	Concentração (g/litro)
NaCl	0,12
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,004
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,004
Na ₂ HPO ₄	0,142
KH ₂ PO ₄	0,136

pH final ajustado para 6,5; solução autoclavada a 121°C por 25 minutos. A osmolaridade da solução, medida em osmômetro Osmette A (Precision Systems Inc) variou entre 0-1 mOsm/Kg H₂O em diferentes preparações.

3.2 Axenização, clonagem e manutenção das culturas

Com o objetivo de estabelecer o cultivo seriado das culturas positivas, os repiques foram inicialmente realizados recortando-se fragmentos de ágar mais ricos nas formas de interesse (e mais pobres em organismos contaminantes) que eram então transferidos para novas placas contendo ágar-soja. Para favorecer a nutrição e a multiplicação de trofozoítas, nos repiques subseqüentes procedeu-se também à adição de *Escherichia coli* morta ao meio de cultura.

O cultivo axênico foi estabelecido a partir de cistos, que eram retirados das placas mediante lavagens feitas com água destilada ou salina de Neff modificada gelada. A suspensão obtida era em seguida tratada com HCl (0,2 a 0,5 N, 15 a 20 minutos) para remoção de organismos contaminantes, lavada 3 vezes por centrifugação (400 x g, 10min) com salina de Neff e o sedimento final ressuspensão em meio PYG (Tabela 3). Após transferência das culturas para garrafas plásticas de cultivo de células (área de 25 cm²), as mesmas foram mantidas em estufa a 28 °C. Na maioria dos casos, os primeiros subcultivos em meio axênico foram feitos em presença de antibióticos (gentamicina 100 µg/ml e/ou cloranfenicol 20 µg/ml e/ou anfotericina B 1,0 µg/ml). Todas as culturas foram clonadas e re-clonadas pelo método de diluição seriada.

O crescimento de trofozoítas era monitorado ao microscópio invertido, sendo os repiques de manutenção realizados a intervalos de quatro a seis dias, dependendo do isolado. Para tanto, o sobrenadante das culturas era colhido e os trofozoítas aderidos eram lavados em PBS e então descolados pela adição de EDTA 5 mM em PBS (pH 6,5), em banho de gelo (ALFIERI et al., 2000). A suspensão celular era transferida para tubos de polipropileno, centrifugada a 400 x g (10 min) a temperatura ambiente e os organismos eram então ressuspensos em meio PYG (Tabela 3), contados em câmara de Fuchs-Rosenthal e utilizados em novos repiques ou para crescimento em maior escala. Neste último caso, as culturas eram preparadas em frascos Erlenmeyer e incubadas a 28 °C ou 37 °C em agitador orbital, a 80-100 rpm.

Tabela 3. Composição do meio PYG (ATCC 712)

Ingredientes	Concentração
Proteose peptona	20,0 g/litro
Extrato de levedura	1,0 g/litro
Glicose	100 mM
MgSO ₄	4 mM
CaCl ₂	0,5 mM
Citrato de sódio	3,4 mM
NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	0,05 mM
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,5 mM
KH ₂ PO ₄	2,5 mM

pH final ajustado para 6,5; meio autoclavado a 121°C por 25 minutos. A osmolaridade do PYG, medida em osmômetro Osmette A (Precision Systems Inc), variou entre 225-250 mOsm/Kg H₂O em diferentes preparações.

3.3 Isolados utilizados

Foram colhidas e analisadas no presente estudo 118 amostras (47 de solo e 71 de água) procedentes de diferentes regiões do Brasil. Apenas os organismos apresentando morfotipo acantopodial, característico do gênero *Acanthamoeba* (SMIRNOV E BROWN, 2004), foram selecionados para o cultivo, conseguindo-se, no decorrer deste estudo, estabelecer 38 culturas axênicas de isolados de ambiente do Brasil (Tabela 4).

Tabela 4. Isolados de *Acanthamoeba* sp utilizados neste estudo.

Isolado	Local de coleta	Origem geográfica
ACC01	água de torneira	São Paulo (SP)
TSP01	jardim	São Paulo (SP)
TRO01	solo	Monte Negro (RO)
ARO01	água	Monte Negro (RO)
ARO02	água	Monte Negro (RO)
ARO03	água	Monte Negro (RO)
ARO04	lago	Monte Negro (RO)
TRO02	solo	Monte Negro (RO)
TRO03	solo	Monte Negro (RO)
TMS01	solo	Miranda (MS)
AMS01	rio	Miranda (MS)
TSP02	solo	Cantareira (SP)
AMS02	rio	Miranda (MS)
ASP02	rio	São Paulo (SP)
TSP03	solo	Cantareira (SP)
TSP04	jardim	São Paulo (SP)
TSP05	jardim	São Paulo (SP)
TPE01	jardim	Recife (PE)
TPE 02	jardim	Recife (PE)
TPE 03	jardim	Recife (PE)
TPR01	solo	Quatro Barras (PR)
AMS03	rio	Miranda(MS)
TMS02	solo	Campo Grande (MS)
TGO01	solo	Goiania (GO)
TSC01	solo	Joinville (SC)
TSC02	solo	Joinville (SC)
ARS01	lagoa	Lagoa dos Quadros (RS)
TRS01	areia de praia	Imbé (RS)
TPE04	areia de praia	Recife (PE)
TRS02	solo	Sapucaia do Sul (RS)
ASP03	água de represa	Jurumirim(SP)
TSP06	água de represa	Guarapiranga(SP)
ASP04	água de represa	Billings- área poluída (SP)
TSP07	solo de represa	Billings- área poluída (SP)
TSP08	solo	São Paulo (SP)
TSP09	solo de represa	Billings– área poluída (SP)
ARS02	rio	Gravataí (RS)
ARS03	lagoa	Gravataí (RS)

3.4 Caracterização morfológica e biológica de isolados de *Acanthamoeba*

3.4.1 Estudo morfológico

As observações foram efetuadas em microscopia de fase, com o material a fresco entre lâmina/lâmina escavada e lamínula e com o material fixado em metanol ou Schaudinn (15 ml de ácido acético, 100 ml de álcool 100% e 200 ml de solução saturada (8 g/100 ml) de HgCl₂) e corado pelo método de Tricrômio de Mason ou panótico.

3.4.2 Avaliação do crescimento em diferentes temperaturas (termotolerância)

Trofozoítas cultivados em suspensão (incubação em “shaker”, 80-100 rpm) e em fase exponencial de crescimento foram colhidos, lavados em PBS e inoculados (1×10^4 ou 1×10^5 células/ml) em frascos tipo Erlenmeyer contendo meio PYG fresco. As culturas foram incubadas em agitador orbital a 28 °, a 37 ° e, em alguns casos, 40 °C, avaliando-se o crescimento durante 7 a 8 dias por contagens diárias efetuadas em câmara de Fuchs-Rosenthal. Curvas de crescimento obtidas em diferentes ocasiões permitiram determinar o tempo de geração.

3.4.3 Crescimento em meio hiper-osmolar

A osmotolerância foi examinada segundo protocolos pré-estabelecidos (KHAN et al., 2001; KHAN E TAREEN, 2003; MAGLIANO et al., 2009), que avaliam a proliferação e a migração de trofozoítas (a 28 °C, durante 96 h) em presença de *Escherichia coli* K-12 oferecida em ágar não nutriente preparado com diferentes concentrações de manitol (0-1,0 M). Alternativamente, alguns ensaios de osmotolerância foram realizados em meio líquido (PYG) acrescido de manitol. A vantagem de usar meio líquido é possibilitar a contagem de trofozoítas e cistos e, portanto, melhor avaliar o efeito do aumento da osmolaridade sobre a viabilidade dos organismos.

3.5. Preparação de meios condicionados por trofozoítas

Culturas em suspensão (crescimento a 28 °C ou a 37 °C, 100 rpm), em fase logarítmica de crescimento (densidade celular próxima a 6×10^5 organismos/ml), eram centrifugadas e os trofozoítas ressuspensos em meio novo à densidade de $1,0 \times 10^6$ /ml. Após 24-48 horas de incubação (28 °C ou 37 °C, 100 rpm), o sobrenadante era obtido por centrifugação (400 x g, 10 minutos), filtrado em membrana Durapore (Millipore) de baixa retenção (porosidade de 0.22 μ m), adicionando-se, em alguns casos, Triton-X para concentração final de 0.1%(v/v). O meio condicionado era dividido em alíquotas que eram mantidas em nitrogênio líquido até o momento do uso.

Como controle da integridade celular durante o período de condicionamento do meio, a atividade da enzima citossólica desidrogenase láctica (LDH) foi determinada nos sobrenadantes, utilizando-se o kit LDH UV da Labtest Diagnóstica S.A. (MG, Brasil). A reação consiste na conversão de piruvato a lactato em presença de NADH, na qual o decréscimo da absorbância a 340 nm indica a oxidação do NADH pela LDH. A reconstituição do kit foi feita pela adição de 3 ml de solução contendo tampão piruvato de sódio 50 nmol/l (pH 7,5) e azida sódica 1,5 nmol/l (frasco nº 1) ao NADH 0,18 nmol/l (conteúdo do frasco nº 2). O acompanhamento cinético foi realizado a 37 °C em cubetas de quartzo, contendo 0,9 ml do kit reconstituído e 0,1 ml do sobrenadante ou 0,01 ml de extratos totais. A temperatura foi mantida constante durante a leitura, com o auxílio de uma unidade controladora de temperatura acoplada ao espectrofotômetro. A atividade enzimática, em mUnidades/ml, foi calculada, multiplicando-se a variação da absorbância por minuto pelo fator calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{fator} = V_t \cdot 1000/E \cdot V_a \cdot d$$

Onde:

V_t = volume total da mistura;

E = absortividade milimolar do NADH, igual a 6,30;

V_a = volume da amostra dosada;

d = caminho óptico, igual a 1 cm.

3.6. Meios condicionados por trofozoítas e efeito citopático

Monocamadas de células SIRC - fibroblasto de córnea de coelho e HeLa - célula epitelial-adenocarcinoma, foram preparadas em microplacas de 96 poços e incubadas (atmosfera de 5% de CO₂, 37 °C, tempo aproximado de 16 horas) com meios previamente condicionados por *Acanthamoeba* (37 °C, 24-48 horas em meio DMEM sem soro), diluídos (1:3, 1:5 e 1:10) ou não. O sobrenadante era então retirado e os poços lavados uma vez com PBS. As células remanescentes eram fixadas com formalina 10% e coradas com cristal de violeta.

3.7 Determinação da atividade proteolítica em meios condicionados por trofozoítas

Foi determinada, utilizando meio condicionado durante 24 horas por trofozoítas, a hidrólise de azocaseína e de azocoll (colágeno tipo I) e o perfil de bandas em gel de SDS PAGE

3.7.1 Determinação da atividade azocaseinolítica

Foi utilizado o método de SARATH et al. (1989) modificado por ALFIERI et al. (2000). A mistura de reação, preparada em um volume final de 200 µl, continha: 10 mg/ml de azocaseína, solução tampão 50 mM (Mes/Tris/Glicina/ácido acético; 12,5 mM cada) e 40 µl de sobrenadante de cultura. A mistura de reação, contendo todos os componentes menos o substrato, era pré-incubada (10 min, 30 °C) e a reação em seguida iniciada com a adição da azocaseína pré-aquecida. Após o término da reação (1 hora a 30 °C), a mesma era interrompida mediante adição de 600 µl de TCA 10% (m/v) gelado e transferência dos tubos para banho de gelo (30 min).

Após centrifugação a 8000 x g (8 min), alíquotas de 500 µl dos sobrenadantes eram colhidas e misturadas a 700 µl de NaOH 1 M. As leituras de absorbância foram realizadas a 440 nm, em espectrofotômetro Hitachi 2001. Dois tipos de controles eram realizados paralelamente: tubos contendo todos os reagentes exceto fonte de enzima eram incubados pelo mesmo período de reação, adicionando-se enzima e TCA 10% ao término da reação e tubos que continham todos os reagentes e também TCA (tempo zero imediato) que eram mantidos em gelo até o término dos experimentos.

Para avaliar o efeito de inibidores, misturas de reação contendo solução tampão e meio condicionado eram incubadas durante 20 minutos (35 °C) em presença dos inibidores, sendo a reação então iniciada com a adição do substrato.

Foi também verificado a dependência do pH e o ótimo de temperatura da atividade azocaseinolítica em meios condicionados por trofozoítas.

3.7.2 Hidrólise de azocoll (azo dye impregnated collagen)

A mistura de reação, preparada em um volume final de 1 ml, continha: 3 mg de substrato, tampões para concentração final de 100 mM, 0.05% de azida sódica e 400 µl de meio condicionado. A reação era iniciada com a adição de fonte de enzima e incubada a 37 °C durante 5 horas. Alíquotas eram colhidas em diferentes tempos, centrifugadas a 10.000 x g (1 min) e a absorbância do sobrenadante era lida a 540 nm.

Para avaliar o efeito de inibidores, as amostras eram pré-incubadas com os inibidores (20 min a 37 °C), iniciando-se então a reação com a adição do substrato.

3.7.3 Detecção de peptidases em gel com substrato copolimerizado

As atividades proteolíticas presentes em meios condicionados durante 24 horas a 28° e 37 °C foram examinadas em gel de poliacrilamida-SDS 10 %, contendo 500 µg/ml de gelatina copolimerizada (ALFIERI et al., 1991). As amostras foram tratadas com tampão de amostra 4x sem β-mercaptoetanol e aplicadas no gel sem fervura. Após eletroforese de sobrenadantes de cultura (2-8 µl/canaleta, diluídas ou não conforme o isolado), a 5 °C e amperagem constante de 5 mA (corrida de aproximadamente 4 horas), os géis eram submetidos às seguintes etapas de incubação, todas realizadas à temperatura ambiente: duas vezes 30 minutos em Triton X-100 a 2,5 % (v/v) em tampão (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, para a detecção de serina e metalo - peptidases; tampão ácido acético-acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0, contendo DTT 2 mM, para a detecção de cisteína-peptidases e outras atividades); e incubação “overnight” apenas em tampão ou tampão acrescido de DTT 2 mM. Após fixação em TCA a 10 % (m/v) e coloração em azul de Coomassie R-350, as bandas claras, indicativas de atividade, eram visualizadas contra o fundo azul escuro.

O efeito de inibidores na detecção de peptidases em gel foi avaliado incubando-se os géis em presença dos inibidores ou, no caso de inibidores irreversíveis (por exemplo, PMSF, E-64 e 1,10 fenantrolina), incubando-se as amostras com os inibidores previamente à eletroforese.

3.8. Extração de DNA genômico

Os trofozoítas em fase logarítmica de crescimento foram lavados duas vezes com PBS (pH 6,5), centrifugados a 400 x g (10 minutos) e estocados a -20 °C ou processados imediatamente para a extração de DNA segundo Kilvington (1991). Os “pellets” de trofozoítas eram ressuspensos em SE (0,1 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM Tris-HCl), à proporção de 1×10^7 células/ml, em banho de gelo, adicionando-se, em seguida, SDS (concentração final de 1%), proteinase K (100 µg/ml) e RNase (300 µg/ml). Após incubação do material em banho-maria a 55-60 °C durante 1 a 2 horas, foi feita a extração do DNA pelo método de fenol/clorofórmio (uma vez fenol (1:1), uma vez fenol/clorofórmio (1:1) e uma vez clorofórmio). Após a última extração, o DNA foi precipitado com acetato de sódio 0,3 M (pH 5,2) e 0,6 volumes de isopropanol gelado, transferido para tubo Eppendorf e lavado em etanol gelado 70%. O DNA foi seco à temperatura ambiente, ressuspensão em TE (100 mM de Tris, 1 mM de EDTA) e mantido a 4 °C.

3.9 Amplificação parcial da subunidade menor (SSU) do gene ribossômico e do domínio catalítico de serina peptidases da família das subtilisinas por PCR

Para amplificação por PCR da subunidade SSU do gene ribossômico de *Acanthamoeba* foram utilizados os oligonucleotídeos JAP 1U- 5'CGGGGATGTATTTATTAG3' - e JAP 5 D- 5'GAAAACATCCTTGGC3' (Alves, JMP tese doutorado) que, dependendo da espécie/isolado de *Acanthamoeba*, permitem amplificar fragmentos de ~900 a 1.200 pb. As misturas de reação continham, em um volume final de 50 µl: aproximadamente 100 ng de DNA total de cada isolado, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Cenbiot) e respectivo tampão (na quantidade especificada pelo fabricante), 100 pM de cada oligonucleotídeo e 0,25 mM de cada DNTP. As reações foram feitas em 30 ciclos, sendo que os tempos e temperaturas utilizados foram:

desnaturação a 94 °C por 3 min, associação a 50 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 10 min. Ao final dos ciclos, o conteúdo total de cada reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% e o gel em seguida corado com 0,2 µg/ml de brometo de etídio para visualização de bandas em luz UV.

Para a amplificação do domínio catalítico de subtilisina foram utilizados oligonucleotídeos degenerados (2F 5'GCYATCTGGAACYTRCARAGG3' e 1R 5'CACYCCGCASACGTGGGG 3'), desenhados a partir da sequência determinada para a subtilisina de *A. healyi* (AhSUB). Estes permitiram amplificar, para alguns isolados de ambiente do Brasil e algumas espécies de referência de *Acanthamoeba*, fragmentos de ~800 pb que correspondem ao domínio catalítico da enzima. As reações foram feitas em 35 ciclos, sendo que os tempos e temperaturas utilizados foram: desnaturação a 94 °C por 3 min, associação a 60 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 10 min.

Figura 3. Representação esquemática do gene de subtilisina e localização dos oligonucleotídeos utilizados.

3.10 Eletroforese em gel de agarose

As preparações de DNA (DNA genômico e amplificado) foram acrescidas de tampão de amostra e submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5 a 2,0%) em tampão TAE, a 50V/100mA. Como marcadores de tamanhos moleculares foram utilizados DNA Leader Mix (MIB fermentas) e Lader 100 bp ou 1 Kb (MIB Fermentas). Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídeo (0.2 µg/ml) e fotografados em transiluminador de luz U.V.

3.11 Purificação de fragmentos de DNA amplificados por PCR

Fragmentos de DNA amplificados por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com 0,2 µg/ml brometo de etídio. Os fragmentos foram cortados dos géis e os DNAs purificados em coluna de Spin-X (Costar^R). Os produtos purificados foram clonados e sequenciados.

3.12 Clonagem e sequenciamento dos produtos amplificados por PCR

Fragmentos de DNA purificados e obtidos por PCR foram clonados em vetor pCR 2.1 do kit TA Cloning (Invitrogen) e utilizados para a transformação de células *dH5α*. A preparação das células competentes foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001), utilizando cloreto de cálcio. As células foram transformadas e ampliadas inicialmente em meio SOC (SOC= SOB + 0,02M de glicose + 0,01 MgCl₂) e em seguida transferidas para placas de meio LB-agar contendo ampicilina à concentração final de 100 µg/ml. Posteriormente, os clones positivos foram ampliados por cultivo durante 16h (37 °C, 120 rpm) em meio LB líquido contendo a mesma concentração de ampicilina das placas. A composição dos meios de cultura utilizados está descrita na Tabela 5. Finalmente, os clones foram purificados por minipreparações com o KIT Wizard Plus SV Minipreps (Promega) e digeridos a 37 °C/ 1-2 h com a enzima EcoRI para conferir a presença do inserto.

Os fragmentos de DNA clonados e purificados foram sequenciados em seqüenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer), utilizando-se o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer) de acordo com as especificações do fabricante. As reações de sequenciamento foram submetidas a 30 ciclos: 15 s, 96 °C; 15 s, 50 °C; 4 min, 60 °C; ciclo inicial de 1 min a 96 °C.

Tabela 5. Meios de cultura utilizados para o cultivo de bactéria

Meio de cultura	Composição	Quantidade/L
LB Agar (Luria-Bertani)	Bacto-triptona	10g
	Extrato de levedura	5g
	NaCl	10g
	Bacto-agar	15g
LB líquido (Luria-Bertani)	Bacto-triptona	10g
	Extrato de levedura	5g
	NaCl	5g
	Bacto-triptona	2g
SOB	Extrato de levedura	0,5g
	Solução de NaCl 1M	1 ml
	Solução de KCl 1M	0,25 ml

3.13 Alinhamento de sequências de nucleotídeos e aminoácidos

Para determinar o modelo evolutivo que melhor explica o alinhamento, utilizamos os programas PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 1998) e MODELTEST v.3.06 (POSADA E CRANDALL, 1998), de modo a escolher, dentre 56 diferentes modelos de evolução de sequências, o que melhor explicaria o alinhamento dos genes de SSU rRNA e subtilisina.

As sequências de SSU obtidas foram alinhadas com diversas sequências disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sequências de SSU rRNA determinadas neste estudo e as obtidas no GenBank foram alinhadas com o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997), alterando os parâmetros relativos à inserção de “indels” (peso de inserção = 1, Extensão = 1) e manualmente ajustados no programa GeneDoc v. 2.6.01 (NICHOLAS et al, 1997).

As sequências “forward” e “reverse” de todos os clones de subtilisina de *Acanthamoeba* foram examinadas pelo programa DNASTar SeqMan (DNASTar Inc.) e submetidas posteriormente no BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide) do GenBank, para confirmar se todas as sequências provenientes dos clones positivos correspondiam ao domínio catalítico de uma subtilisina. Sequências homólogas de outros gêneros de protozoários foram obtidas através de bancos de dados e utilizadas para comparação e análises posteriores. Utilizando o BLASTP (Basic Local

Alignment Search Tool Protein), foi estabelecido um conjunto de seqüências de aminoácidos correspondentes a subtilisina de outros gêneros para comparação e análises posteriores. As seqüências pertencentes ao mesmo conjunto de dados (Nucleotídeos ou Aminoácidos) foram alinhadas e ajustadas manualmente, utilizando o programa GeneDoc 2.6.002 (NICHOLAS E NICHOLAS, 1997)

3.14 Construção de árvores filogenéticas

Árvores filogenéticas foram inferidas pelos métodos de máxima verossimilhança (MV), análise bayesiana (B), máxima parcimônia (MP) e análise de distância.

As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 1998) via busca heurística com 100 replicatas de adição aleatória dos terminais. As análises de suporte por “bootstrap” foram feitas em 1.000 replicatas com os mesmos parâmetros empregados na busca.

Análises de distância também foram construídas utilizando o programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 1998) utilizando GTR como modelo de substituição e 4 categorias de gama. As análises de suporte por “bootstrap” foram feitas em 1.000 replicatas com os mesmos parâmetros empregados na busca.

As análises bayesianas foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2 (RONQUIST E HUELSENBECK, (2003). Foram empregadas 500.000 gerações, usando GTR como modelo de substituição e 4 categorias de gama mais proporções de sítios invariantes. Para a construção do dendograma final, utilizou-se apenas os diagramas obtidos nas últimas 75 replicatas. Para a verificação de suporte de ramos nas análises bayesianas, foram utilizados os valores de probabilidade a posteriori, obtidos com o programa MrBayes.

Análises de MV foram realizadas no programa RaxML v7.0.4 (STAMATAKIS, 2006). Foram empregadas 500 replicatas usando GTR como modelo de substituição, 4 categorias de gama e diagramas obtidos por parcimônia para o gene de SSU rRNA. Para o gene de subtilisina, foi utilizado o modelo HKY com 4 categorias de gama. Os parâmetros do modelo de substituição empregado foram estimados durante a busca. O suporte de ramos foi estimado com 500 replicatas de “bootstrap” no programa RaxML. As matrizes de similaridade/divergência (baseadas em distâncias p não corrigidas)

foram construídas utilizando o programa Point Replacer v.2.0 disponibilizado pelo autor (ALVES, J.M.) no endereço <http://www.geocities.com/alvesjmp/software.html>.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 A diversidade de *Acanthamoeba* spp no Brasil: do isolamento ao estabelecimento de culturas axênicas

Em seu “habitat” natural, *Acanthamoeba* alimenta-se principalmente por fagocitose de pequenos protozoários, leveduras, bactérias e partículas orgânicas, de forma que, para favorecer o crescimento de *Acanthamoeba* em laboratório, vários microorganismos podem ser utilizados com fonte de nutrientes (BOTTONNE et al., 1994, WEEKERS et al., 1993, DE MORAES E ALFIERI, 2008).

Alguns protocolos foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar a eficiência de isolamento de *Acanthamoeba*, tanto a partir de amostras de ambiente como de casos clínicos. O mais utilizado explora exatamente a fagotrofia de *Acanthamoeba* e consiste em semear as amostras em placas de ágar não nutriente, previamente semeadas com bactérias (vivas ou mortas), normalmente as Gran negativas e, frequentemente, *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes* (KHAN, 2006). Por serem substratos preferencialmente fagocitados e digeridos por *Acanthamoeba*, o crescimento de organismos contaminantes fica controlado.

Com o objetivo de estabelecer as melhores condições de isolamento e cultivo, foram examinadas inicialmente dezenove amostras de água de torneira da região metropolitana da cidade de São Paulo. Destas, somente duas, curiosamente colhidas de um mesmo local em ocasiões diferentes (junho de 2003 e maio de 2004), foram positivas para *Acanthamoeba*. Nas duas amostras, os cistos eram morfológicamente compatíveis com os das espécies do grupo morfológico II, que são as mais frequentemente isoladas do ambiente. O cultivo seriado, inicialmente em placas de ágar-soja em presença de *Escherichia coli* e, na sequência, em meio axênico, foi estabelecido a partir da amostra de junho de 2003. O sucesso do estabelecimento da cultura axênica de *Acanthamoeba* sp ACC01, o primeiro isolado a integrar nossa pequena coleção, claramente sinalizou que seria viável partir para um estudo mais abrangente, examinando a diversidade e, quando possível, o potencial patogênico de *Acanthamoeba* spp isoladas no Brasil.

Cento e dezoito amostras (água e solo procedentes de várias regiões do Brasil) foram examinadas neste trabalho. Após semeadura inicial em placas de ágar-soja, todas as amostras foram positivas para algum gênero de ameba de vida livre, entre o 3 ° e 7 °

dias de observação. Com base nos morfotipos descritos por Smirnov e Brown (2004), que permitem distinguir gêneros de amebas de acordo com as características de locomoção, os organismos apresentando morfotipo acantopodial, prováveis representantes do gênero *Acanthamoeba*, foram selecionados para a continuidade do projeto, do que resultou no estabelecimento de 38 culturas axênicas de isolados de ambiente do Brasil.

A axenização das culturas foi feita a partir de cistos obtidos mediante lavagem das placas, efetuada com PBS ou solução salina de Neff. Após centrifugação (400 g, 10 min), os cistos eram incubados em HCl 0,4-0,5 N (HITI et al., 2004), lavados 3 vezes por centrifugação em PBS ou salina de Neff (400g, 10 min), ressuspensos em meio líquido (PYG) contendo sulfato de gentamicina (100 µg/ml), distribuídos em garrafas de cultura (25 cm²) e colocados a 28 °C. Uma vez estabelecido o cultivo seriado, o antibiótico foi removido e as culturas foram então clonadas e reclonadas pela técnica de diluição limitante.

A caracterização morfológica dos isolados de ambiente (trofozoítas e cistos) foi feita por microscopia de luz. A observação era feita tanto a fresco quanto em material fixado e corado pelos métodos do Tricromo de Mason ou panótico, o que permitia visualizar trofozoítas com um único núcleo, com nucléolo central bastante evidente e denso, além de diversos vacúolos, de tamanhos variados, dispersos no citoplasma (Figura 4). A coloração pelo tricrômio ou panótico permitiu ainda visualizar com maior clareza o hialoplasma (região hialina periférica) e os acantopódios. Em contraste de fase, cistos maduros exibiram parede cística bem definida, diferenciando-se com clareza o endocisto do ectocisto (Figura 5).

O sequenciamento parcial do gene SSU rRNA (fragmentos de ~900-1200 pb) foi concluído para 37 isolados. O único isolado não sequenciado, *Acanthamoeba* sp. TRO03 (procedente de Monte Negro, Estado de Rondônia) tem características morfológicas do grupo I; sua propagação em cultura não pode ser restabelecida a partir do material criopreservado, mesmo reduzindo-se a osmolaridade do meio, modificando-se a temperatura de incubação ou adicionando-se isolada ou concomitantemente leveduras e bactérias Gran-negativas.

Figura 4. Microscopia óptica de trofozoítas de *Acanthamoeba* spp isoladas de ambiente, visualizados após coloração (A) ou a fresco (B). A1, A2, A3: trofozoítas de isolados do grupo morfológico I, corados pelo tricômio; A4, A5: isolados do grupo morfológico II corados pelo panótico. B: trofozoítas do grupo morfológico I, observados entre lâmina e lâminula. Acantopódios (setas), núcleo com nucléolo proeminente (N) e diversos vacúolos (V) estão indicados. Escala = 10 μ m

Figura 5. Características morfológicas dos cistos formados pelos isolados brasileiros de *Acanthamoeba*. Cistos maduros dos isolados indicados, exibindo o ectocisto (EC) e endocisto (ED). Barra = 10 μm.

As análises das sequências parciais de SSU rRNA dos 37 isolados de ambiente do Brasil posicionaram 24 (65%) no genótipo T4, cinco (13%) no genótipo T5, e um isolado no genótipo T13. Ainda, sete dos novos isolados (19%) foram classificados no mais raramente estudado grupo morfológico I, atualmente representado por poucas espécies dos genótipos T7, T8, T9 e T17; essas espécies formam cistos maiores e caracteristicamente estrelados. O presente trabalho analisou a diversidade e a relação evolutiva dos novos isolados de ambiente e de casos clínicos (ceratites) do Brasil, com base no agrupamento observado em árvores filogenéticas. Também buscou avaliar o potencial patogênico de alguns grupos de isolados, examinando os seguintes indicadores indiretos de virulência: crescimento a temperaturas mais elevadas, osmotolerância, secreção de peptidases e efeito citopático. Finalmente, considerando a provável participação da atividade subtilisina-*simile* (de 33 kDa) na patogenia por *Acanthamoeba* e a disponibilidade da sequência completa da enzima de *A. healyi* (AhSUB) e de sequências parciais de genes homólogos de *A. castellanii* e *A. hatchetti*, foram desenhados oligonucleotídeos que flanqueiam o domínio catalítico de serina peptidases da família das subtilisinas; para alguns isolados representativos, o domínio catalítico da subtilisina foi sequenciado e a sequência utilizada em inferências filogenéticas.

4.2 Caracterização de isolados dos genótipos T4, T5 e T13 encontrados no Brasil

4.2.1 Anexo 1 - Diversidade entre espécies de *Acanthamoeba* do Brasil: genotipagem e inferências filogenéticas entre isolados de ambiente e de casos de ceratites (trabalho em preparação) Genetic diversity among *Acanthamoeba* spp. isolated in Brazil: genotyping of clinical and environmental isolates, and phylogenetic inferences

No presente estudo, examinamos a diversidade de 29 isolados de *Acanthamoeba* de amostras de ambiente (solo e água), provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil. Incluímos também em nossas análises 11 isolados de casos de ceratite do Brasil, anteriormente caracterizados por RAPD por Alves et al. (2000).

As análises das árvores filogenéticas mostraram que 85% (trinta e quatro) dos isolados pertencem ao genótipo T4, 12% (cinco) ao genótipo T5 e 2% (um) pertence ao genótipo T13. *Acanthamoeba* spp do genótipo T4 são as mais frequentemente encontradas no ambiente e, também, as mais fortemente associadas com casos clínicos de ceratites em todo o mundo (BOOTON et.al., 2002, DI CAVE, et.al., 2009, MAGSHOOD, et.al., 2005). Nossos dados corroboram com tais dados da literatura, mostrando que a maioria dos isolados brasileiros (10 de casos clínicos e 23 de ambiente) agrupa com os isolados do clado T4. Dentre os representantes deste genótipo, alguns isolados apresentam 100% identidade de sequência (entre outros: *A. castellanii* 30868 e *A. polyphaga* 30873; TSP02 e TSP03, UE8L e UE8R), enquanto que outros são mais divergentes, com apenas 90% de similaridade (UE6 e *Ac. hatchetti* 2AX1; TPE04 e UE3).

Dos isolados de ambiente caracterizados neste estudo, as análises posicionam cinco no clado formado pelos organismos do genótipo T5, o segundo genótipo mais prevalente no ambiente e representado por uma única espécie, *A. lenticulata*. De acordo com as análises, todos os isolados T5 formam um clado monofilético, bastante homogêneo (divergência interna de 2,5%) e bem suportado por altos valores de “bootstrap”.

Outro representante da diversidade dos isolados brasileiros foi o isolado ARO04, genotipado como T13. O genótipo T13 foi estabelecido por Horn et al. (1999), quando do isolamento (solo, EUA) e caracterização de *Acanthamoeba* sp UWET39, abrigando um endossimbionte bacteriano.

4.2.2 Anexo 2 - Genotipagem, caracterização biológica e bioquímica de *Acanthamoeba* sp ACC01 isolada de água de torneira, São Paulo, SP, Brasil. (Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp isolated from tap water in Brazil).

Este trabalho é o primeiro a detalhar a caracterização biológica, molecular e bioquímica de um isolado de ambiente brasileiro (ACC01), filogeneticamente relacionado (99 % similaridade) a um isolado de referência do ATCC (*A. polyphaga* 30461), originário de um caso de ceratite (Texas, EUA).

Figura 6. Microscopia óptica de *Acanthamoeba* ACC01 (A e C) e *A. polyphaga* ATCC 30461 (B e D). A - B: trofozoítas corados pelo panótico exibindo acantopódios (setas) e núcleo com nucléolo proeminente (N). C - D: cistos característicos do gênero *Acanthamoeba* exibindo a dupla parede cística. Escala = 10 μ m.

As análises filogenéticas baseadas no gene SSU rRNA foram realizadas a fim de inferir relações filogenéticas entre *Acanthamoeba* sp ACC01 e outros isolados de *Acanthamoeba*, incluindo quatro de casos de ceratites assinalados no Brasil. Em árvores geradas pelos métodos de neighbor-joining, máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML), os isolados brasileiros segregaram em dois sub-clados principais, verificando-se forte relacionamento genético entre o isolado ACC01 e *A. polyphaga* 30461 (similaridade de 99%). Os isolados clínicos brasileiros U/E10 e U/8R (similaridade: ~98,5%) foram mais filogeneticamente relacionados ao isolado ACC01 (similaridade de ~95,5% e 97%, respectivamente), enquanto que dois outros isolados clínicos Brasileiros analisados neste estudo, U/E5 e U/E6 (95% e 95,5% de similaridade com ACC01), mostraram-se mais relacionados a *A. culbertsoni* Diamond.

Além da semelhança morfológica (Figura 6) e genética, também colocamos em evidência as semelhanças fisiológicas (termo- e osmotolerância) e bioquímicas

(secreção de peptidases) entre *Acanthamoeba* ACC01 e *A. polyphaga* 30461. Termotolerância e osmotolerância, adaptações fisiológicas associadas diretamente a patogenicidade de *Acanthamoeba*, são frequentemente utilizadas como marcadores indiretos de virulência (DE JONCKHEERE, 1980; KHAN et al., 2001, 2002). As taxas de crescimento a diferentes temperaturas (28 e 37 °C) foram avaliadas para os dois isolados. Ambos exibiram taxas de crescimento semelhantes à temperatura de 28 °C (tempos de geração de 20 e 21,5 horas, respectivamente para *A. polyphaga* 30461 e o isolado ACC01) e ambos foram facilmente cultivados a 37 °C, observando-se, nesta temperatura, melhor crescimento do isolado brasileiro (tempo de geração de 21,1 horas, contra 29 horas determinado para *A. polyphaga* 30461).

O comportamento biológico dos dois isolados quando incubados em meio hiperosmolar foi também analisado. O aumento da osmolaridade do meio foi conseguido mediante adição de manitol (monossacarídeo que encontra aplicação clínica como diurético osmótico) ao agar não nutriente, que foi aqui utilizado às concentrações finais variando de 0,1 a 1,0 M. Os dois isolados apresentaram comportamento semelhante nas diferentes concentrações analisadas (Fig. 2A – Anexo 2): claramente suportaram concentrações elevadas de manitol, mas a multiplicação de trofozoítas foi progressiva- e negativamente afetada pelo aumento da concentração de manitol.

Acanthamoeba secreta uma grande variedade de proteases e alguns trabalhos correlacionam a secreção de serina peptidases com a patogenicidade das diferentes espécies (KHAN et al. 2000, 2006). O presente estudo avaliou a secreção de proteases nos dois isolados de *Acanthamoeba* (ACC01 e ATCC 30461), comparando, em meios condicionados a 28 e a 37 °C por trofozoítas, as taxas de hidrólise de azocaseína e o perfil de atividade visualizada em géis com gelatina copolimerizada. Níveis equivalentes de atividade azocaseinolítica foram observados para ambos os isolados em ampla faixa de pH (5,0 a 10,0), verificando-se, nos dois casos, taxas de hidrólise mais elevadas em pH neutro/alcalino; a forte inibição da reação por PMSF 5 mM, observada em meios condicionados pelos dois isolados examinados, indicou secreção importante de atividade associada serina peptidases.

Corroborando os resultados com azocaseína, o estudo de detecção em gel revelou a semelhança entre *Acanthamoeba* ACC01 e *A. polyphaga* 30461, indicada pelo idêntico perfil de bandas com atividade atribuída a serina peptidases, detectadas entre 33 e 150 kDa e melhor visualizadas em géis incubados em pH 8,0. O bloqueio de serina peptidases com PMSF 10 mM previamente à eletroforese, permitiu ainda mostrar, em

géis incubados em pH 4,0, que os dois isolados aparentemente secretam as mesmas cisteína peptidases, entre as quais um dublê de 110-120 kDa e bandas com massa molecular aparente de 65, 45 e 37 kDa, todas fortemente inibidas por E-64 10 μ m, um inibidor específico e irreversível desta classe de peptidases.

4.3 Caracterização morfológica, fisiológica, bioquímica e molecular de *Acanthamoeba* spp. do grupo morfológico I (genótipos T7, T8, T9 e T17)

4.3.1 Anexo 3 - Revisitando as espécies de *Acanthamoeba* do grupo morfológico I (genótipos T7, T8, T9 e T17): caracterização de sete novos isolados de ambiente do Brasil e inferências filogenéticas – manuscrito submetido. (Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): characterisation of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences)

Há pouquíssima informação biológica, bioquímica e genética sobre as espécies classificadas no grupo morfológico I, grupo que até recentemente incluía *A. astronyxis* ATCC 30137 (genótipo T7), *A. tubiashi* ATCC 30867 (genótipo T8), *A. comandoni* ATCC 30135 (genótipo T9), além de alguns isolados de ambiente relacionados a *A. astronyxis* e *A. comandoni* (LEWIS E SAWYER, 1979, RAY E HAYES, 1954, PAGE, 1988). Recentemente, dois novos isolados de ambiente da Tailândia, também do grupo morfológico I, foram posicionados em um novo genótipo, o genótipo T17 (NUPRASERT et al., 2010). Neste estudo, identificamos sete isolados brasileiros (TSP01, TSP07, TMS02, TSC01, ASP03, ARO01 e ARO03) exibindo características morfológicas compatíveis com as espécies do grupo morfológico I: trofozoítos grandes e cistos com endocisto em forma estrelada e ectocisto liso e circular (Figura 7). Com base em filogenia molecular acrescentamos seis novas sequências de SSU rRNA ao clado T17, formado por isolados de ambiente da Tailândia. O agrupamento consistente de seis isolados brasileiros (TSP01, TMS02, TSC01, ASP03, ARO01, ARO03) foi bastante homogêneo (divergência interna: ~1,9 %) e bem suportado por altos valores de suporte. O isolado TSP07 apresentou um polimorfismo molecular em relação aos demais isolados brasileiros do grupo I (~16,9 % de divergência), sendo filogeneticamente mais relacionado à *A. astronyxis* ATCC 30901 (1,0% de divergência), um isolado do genótipo T9.

Estes resultados corroboram estudos anteriores indicando não somente a heterogeneidade genética das espécies do grupo morfológico I bem como sua divergência em relação às espécies pertencentes aos demais genótipos (~40 % com *A. griffithii* - genótipo T3). A re-classificação das espécies do grupo I em um ou mais novos gêneros já foi proposta. O isolamento e o sequenciamento de novos representantes do

grupo morfológico I certamente contribuirão para o conhecimento da diversidade genética e do relacionamento filogenético dos isolados do grupo I em relação aos demais representantes do gênero *Acanthamoeba*.

Figura 7. Microscopia de contraste de fase dos isolados brasileiros de *Acanthamoeba* do grupo morfológico I. A e B: trofozoítas de *Acanthamoeba* TSP07 (A) e ARO01 (B) exibindo acantopódios proeminentes (setas) e núcleo com nucléolo centralizado (N). C – I: cistos maduros exibindo o ectocisto (EC) e endocisto (ED) em forma estrelada, característica do grupo (C, ARO01; D, ARO03; E, ASP03; F, TSP01; G, TSP07; H, TMS02; I, TSC01). Escala = 10 μm

Termotolerância, osmotolerância e efeito citopático produzido em monocamadas de células, características freqüentemente associadas ao potencial patogênico, foram também examinadas neste estudo. Os resultados indicaram que todos os sete isolados brasileiros crescem as temperaturas de 28, 37 e 40 °C. Para três isolados (TSP01, ARO01, ARO03), os tempos de geração foram significativamente menores a 37 °C, indicando a preferência por temperaturas mais elevadas. Crescimento de todos os isolados foi observado a 40 °C, verificando-se, porém, aumento significativo nos tempos de geração. Por outro lado, os experimentos realizados com meios hiperosmolares (isto é, suplementados com manitol) mostraram a proliferação de trofozoítas em presença de manitol até 0,5 M (663 mOsm/Kg H₂O), notando-se, porém, aumento dos tempos de geração, que ocorreu de forma dependente da concentração de manitol. Não houve crescimento das culturas em presença de manitol 1 M. Nesta condição, trofozoítas apresentaram modificações morfológicas significativas, incluindo desaparecimento de pseudópodes e aumento considerável de tamanho e número de vacúolos citoplasmáticos. Além disso, e sugerindo o potencial patogênico dos novos isolados do grupo morfológico I, meios condicionados por seis dos setes novos isolados de *Acanthamoeba* de ambiente produziram forte efeito citopático sobre monocamadas de células SIRC e HeLa. O isolado TSP07 (genótipo T9) produziu efeito citopático moderado, que foi comparável ao observado para *A. polyphaga* ATCC 30461, um isolado de ceratite de baixa virulência (VISVESVARA et al., 1975).

4.3.2 *Acanthamoeba* spp do grupo morfológico I e a secreção de proteases

4.3.2.1 Introdução

Sabe-se que tanto na encefalite quanto na ceratite causada por *Acanthamoeba* a colonização pela ameba requer a adesão de trofozoítas, um processo mediado por uma proteína ligadora de manose (GARATE et al., 2004, 2005). A lesão dos tecidos e a invasão dos parasitas ocorrem, então, por fenômenos fagocíticos e efeitos citopáticos desencadeados por moléculas liberadas por trofozoítas, entre as quais se destacam as enzimas proteolíticas (ALIZADEH et al., 1994, MATTANA et al., 2002, ALSAM et al., 2005; CLARKE E NIEDERKORN, 2006).

Além de estudos demonstrando a secreção induzida de determinadas serina e metalopeptidases (CAO et al., 1998; LEHER et al., 1998; HURT et al., 2003), *Acanthamoeba* secreta constitutivamente serina-, cisteína- e metalopeptidases peptidases (He et al., 1990; MITRA et al., 1995; ALFIERI et al., 2000; FERREIRA et al., 2009; KONG et al., 2000; CHO et al., 2000; NA et al., 2001; SISSONS et al., 2006; ALSAM et al., 2005). Estudos com serina peptidases purificadas ou meios condicionados por *Acanthamoeba* (ACM) mostram que tais enzimas contribuem diretamente para a destruição das células do hospedeiro (CAO et al, 1998;. LEHER et al, 1998;. KHAN et al, 2000;. ALSAM et al. , 2005; CLARKE E NIEDERKORN, 2006; KIM et al, 2006) e que exibem pouca especificidade em relação aos substratos proteicos. Por sua capacidade de degradar várias proteínas do hospedeiro (imunoglobulinas, interleucinas, inibidores endógenos de serina peptidase, colágeno tipos I e IV e fibronectina), serina peptidases facilitam a progressão da lesão e a evasão da resposta imune do hospedeiro (CHO et al., 2000; KONG et al, 2000;. NA et al, 2001;. CLARKE E NIEDERKORN, 2006; KIM et al, 2006;. ALIZADEH et al, 2008). Atividades tipo elastases também já foram evidenciadas em *Acanthamoeba* (FERRANTE E BATES, 1988; SISSONS et al, 2006;. FERREIRA et al, 2009).

Serina peptidases de diferentes massas moleculares foram descritas em *Acanthamoeba*. Algumas foram purificadas (em geral, a partir de sobrenadantes de cultura) e melhor caracterizadas bioquimicamente, entre as quais uma quimotripsina-*simile* de 12 kDa (NA et al., 2001) e outra, de 33 kDa, purificada de *A. healyi* que foi

posteriormente clonada, sequenciada e identificada como uma subtilisina (KONG et al., 2000; HONG et al., 2000).

Ao contrário de *A. castellanii* e *A. polyphaga* (ambas do grupo morfológico II), espécies muito estudadas, existe pouquíssima informação biológica e principalmente bioquímica sobre as espécies do grupo morfológico I. Até o momento, dois trabalhos mostraram o padrão de distribuição de bandas em géis de SDS PAGE de *A. astronyxis* ATCC 30137, uma espécie caracterizada como não patogênica (Khan, 2000). Dada a escassez de dados sobre atividades proteolíticas em isolados de *Acanthamoeba* do grupo I e também considerando que meios condicionados pelos sete novos isolados brasileiros produzem efeito citopático, iniciamos estudos focalizando a secreção de proteases nos isolados brasileiros do genótipo T17. Ensaio de dosagem enzimática com azocaseína (um substrato protéico de especificidade geral), azocoll (colágeno tipo I) e de detecção de peptidases em gel de poliacrilamida-SDS com substrato copolimerizado foram utilizados para monitorar as atividades proteolíticas em meios condicionados por trofozoítas de *Acanthamoeba* ARO01, ARO03, TSP01, ASP01, TMS02, TSC01 e TSP07.

Alguns trabalhos examinaram comparativamente isolados de *Acanthamoeba* originários de casos clínicos (patogênicos) e de ambiente (*a priori* considerados não patogênicos) e correlacionaram níveis elevados de atividade proteolítica com a patogenia. Assim, peptidases de *Acanthamoeba* têm sido propostas como marcadores de patogenia. Por exemplo, Khan et al. (2000, 2001), utilizando azocaseína e albumina como substratos, descrevem níveis significativamente mais elevados de atividade em isolados clínicos. Em nosso estudo, atividade azocaseinolítica importante foi detectada em meios condicionados a 28 °C e a 37 °C por trofozoítas dos seis isolados brasileiros do genótipo T17 (Figura 8), sendo que para um dos isolados (*Acanthamoeba* TSC01), maiores taxas de hidrólise foram determinadas em meios condicionados a 37 °C (Figura 8 A). Quando analisada em função do pH (5,0 a 9,5), a atividade foi maior em pH neutro/alcalino. A forte inibição da reação por PMSF 10 mM, observada em amostras de todos os isolados examinados, indicou secreção importante de serina peptidases (Figura 8). A incubação da reação a diferentes temperaturas (37, 40, 50, 55 e 60 °C) revelou maior atividade a 55 °C (resultados não mostrados).

Figura 8. Dependência do pH da atividade azocaseinolítica em meios condicionados por trofozoítas de *Acanthamoeba* spp do grupo morfológico I. As misturas de reação, preparadas nos pH indicados e contendo 40 µl de meios condicionados, foram incubadas por 1 hora a 30 °C. Quadrados: atividade determinada em meios condicionados a 28°C (■) e 37°C (□) em ausência de PMSF. Círculos: atividade determinada em meios condicionados a 28°C (●) e 37°C (○) em presença de PMSF 5 mM. Os pontos indicados são as médias de 3 experimentos independentes realizados com meios que foram condicionados em ocasiões diferentes. As barras indicam o desvio padrão da média.

Em experimentos com Azocoll (azo dye-impregnated collagen), realizados apenas com os isolados TSP01, TSC01 e ARO01, verificamos, utilizando como fonte de enzima meios condicionados a 28 °C e a 37 °C, significativa atividade hidrolítica em pH 6,0, 7,0 e 8,0, que foi maior em pH 8,0 (Figuras 9 A, 9 C e 9 E).

Figura 9. Hidrólise de Azocoll em função do pH (A, C e E) e efeito de inibidores classe-específicos (B, D e F). A, C e E: misturas de reação, preparadas em tampão Tris-HCl 0,1 M nos pH indicados e contendo 3 mg de substrato e 400 µl de meios condicionados a 28°C (■, ▲, ●) e a 37°C (□, △, ○), foram incubadas por 5 horas a 37 °C. B, D e F: reações incubadas em pH 8,0, em ausência (●) e em presença de PMSF 5 mM (ensaiado com e sem DTT 2mM), 1,10-fenantrolina 5 mM, E-64 10 µM e pepstatina 10 µM. Os pontos indicados são as médias de 3 experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão da média.

A maior atividade em pH 8,0 levou-nos a fixar o pH da reação em 8,0 para examinar o efeito de inibidores sobre a hidrólise do substrato. Tal como observado nos ensaios com azocaseína, e novamente apontando para a atividade de serina peptidases, a hidrólise de Azocoll foi fortemente inibida por PMSF 5 mM (98%), mesmo em presença de DTT 2 mM. A reação foi fracamente inibida por E-64 10 μ M ($12\% \pm 2\%$) e 1,10-fenantrolina 5 mM ($18\% \pm 3\%$) (Figuras 9 B, 9 D e 9 F).

A presença de serina peptidases em meios condicionados por trofozoítas foi claramente confirmada em géis com gelatina copolimerizada. Nesses experimentos, após a corrida eletroforética, os géis foram incubados à temperatura ambiente em tampão Tris-HCl pH 8,0 (aproximadamente 4 horas) e em seguida fixados em TCA 10 % e corados com azul de Coomassie R-350. Os resultados não revelaram diferenças entre os isolados. Bandas com atividade foram visualizadas em meios condicionados por todos os isolados examinados, notando-se, particularmente, 3 bandas de forte intensidade na região de ~90, 50 e 40 kDa (Figura 10). A incubação das amostras com PMSF 10 mM previamente a eletroforese e também durante a incubação dos géis inibiu forte e/ou completamente as atividades de 50 e 40 kDa (Figura 10 B2), sem contudo afetar a atividade de 90 kDa. Esta, por sua vez, foi completamente inibida por 1,10-fenantrolina (Figura 10 B3), resultado que sugere a atividade de metalopeptidase.

Figura 10. Detecção em gel de peptidases secretadas por trofozoítas dos isolados brasileiros do genótipo T17. A: meios condicionados a 28 °C pelos isolados indicados na figura foram submetidos a eletroforese em gel com gelatina e o gel foi, em seguida, incubado em pH 8,0. B: peptidases secretadas a 28 °C e as 37 °C por trofozoítas de *Acanthamoeba sp* TSC01 (1) e efeito inibitório de PMSF 10 mM (2) e de PMSF 10 mM + 1,10-fenantrolina 5 mM (3).

Os resultados até o momento obtidos indicam secreção constitutiva de serina e metalopeptidases nos isolados brasileiros do genótipo T17. Resta, entretanto, avaliar a possível relação entre as atividades secretadas e os efeitos citopáticos observados em monocamadas de células SIRC e HeLa. Nesse sentido, será importante estender as observações para o isolado brasileiro TSP07 (genótipo T9), para o qual se observou moderado efeito citopático, e também para *A. astronyxis* ATCC 30137, espécie considerada não patogênica. Peptidases de *Acanthamoeba* estão diretamente envolvidas nos mecanismos de patogenicidade, mas considerando a natureza fagotrófica de trofozoítas e a prevalência de *Acanthamoeba* no ambiente, a secreção constitutiva de peptidases em geral e de serina peptidases em particular devem ter a função primordial de degradar macromoléculas e de destruir microorganismos presentes no ambiente. A elucidação dos vários aspectos funcionais das enzimas de *Acanthamoeba* ainda depende da purificação e caracterização das diferentes atividades secretadas, bem como de estudos fisiológicos de secreção.

4.4 Amplificação, clonagem e sequenciamento do domínio catalítico de serina peptidases da subfamília das subtilisinas

Peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de macromoléculas protéicas, degradando-as ou então produzindo peptídeos menores. Essas enzimas têm sido identificadas em diversos sistemas biológicos que compreendem desde vírus até vertebrados. Com o avanço dos projetos de sequenciamento de genomas de vários organismos, foi demonstrado que cerca de 2% dos genes expressos codificam proteases. (SAJID E MCKERROW, 2002; RUDENSKAYA E PUPOV, 2008).

As proteases são geralmente sintetizadas como proformas, que posteriormente são processadas para dar origem às formas maduras ou enzimaticamente ativas. De acordo com o tipo de reação catalisada, as proteases podem ser subdivididas em: a) exopeptidases, que clivam as ligações peptídicas próximas das porções amino ou carboxi-terminal, sendo classificadas como aminopetidase ou carboxipeptidase respectivamente; ou b) endopeptidases, que clivam ligações peptídicas na região interna da cadeia polipeptídica. De acordo com o mecanismo catalítico, determinado pelos aminoácidos reativos do sítio catalítico, definem-se as classes principais de enzimas proteolíticas: serina-peptidases, aspártico-peptidases, metalo-peptidases e cisteína-peptidases (KLEMBE E GOLDBERG, 2002; SAJID E MCKERROW, 2002; DI CERA, 2009; RAWLINGS et al., 2010).

Serinas peptidases constituem o maior grupo de enzimas proteolíticas, formada por seis clãs (SA, SB, SC, SD, SE, SF), com 75 famílias (S1 a S75) descritas até o momento (RAWLINGS et al., 2010). A família S8, pertencente ao clã SB, também conhecida como a família subtilase, é a segunda maior família de serina peptidases, tanto em números de seqüências quanto de peptidases caracterizadas; é o grupo de peptidases mais numeroso e, também, o encontrado em todos os reinos da vida. A família é dividida em duas subfamílias: subtilisina (S8A), que é o tipo exemplo da subfamília, e Kexina (S8B). Integram a subfamília das subtilisinas (S8A) as endopeptidases contendo, na ordem, Asp, His e Ser na tríade catalítica; esses resíduos do sítio ativo ocorrem frequentemente nos motivos Asp-Thr/Ser-Gly (DI CERA, 2009; RAWLINGS et al., 2010). Subtilisinas atuam em diversos processos biológicos tais como a digestão, coagulação do sangue, fertilização, desenvolvimento, ativação do complemento, patogênese, apoptose, resposta imune, metabolismo secundário; exercem,

também, papel importante nos distúrbios causadores de doenças como artrite e alguns tipos de tumores (HEDSTROM, 2002; PLOW E HOOVER-PLOW, 2004). Assim, muitas serinas proteases e seus substratos são alvos atraentes para o desenvolvimento de drogas terapêuticas.

Dentre as serina peptidases descritas em *Acanthamoeba*, algumas foram purificadas e melhor caracterizadas bioquimicamente, entre as quais uma, de 33 kDa, purificada de *A. healyi* que foi posteriormente clonada, sequenciada e identificada como uma subtilisina (KONG et al., 2000; HONG et al., 2000). A maior expressão da subtilisina (AhSUB) em isolados patogênicos (KIM et al., 2003; BLASCHITZ et al., 2006; KIM et al., 2006) tem levado alguns autores a inferir o potencial patogênico de novos isolados de *Acanthamoeba* com base na amplificação por PCR de fragmentos do gene AhSUB (LORENZO-MORALES et al., 2006, 2007). Uma cobertura parcial do genoma de *A. castellanii* já identificou três genes de serina peptidases da família das subtilisinas (ANDERSON et al., 2005). Considerando o possível papel das subtilisinas na patogenia por *Acanthamoeba* e, também, que o estudo de moléculas funcionais pode gerar informações interessantes sobre a história evolutiva destas moléculas em *Acanthamoeba* (e sobre as relações filogenéticas dentro do super grupo Amebozoa), nossos objetivos nesta parte do trabalho foram amplificar, clonar e sequenciar o domínio catalítico de uma subtilisina, comparar as filogenias obtidas com as sequências de nucleotídeos e aminoácidos da protease com a filogenia baseada no gene SSU rRNA. Até o momento, não existem estudos filogenéticos em *Acanthamoeba* baseados em sequências de genes que codificam moléculas funcionais.

Utilizando oligonucleotídeos degenerados, desenhados a partir da sequência determinada para a subtilisina de *A. healyi* (AhSUB), foi possível amplificar, para 4 isolados de ambiente e um de caso clínico do Brasil, e uma espécie de referência de *Acanthamoeba*, fragmentos de ~800 pb correspondendo ao domínio catalítico da enzima, o que representa ~400 aminoácidos.

Os fragmentos amplificados e sequenciados do gene de subtilisina de *Acanthamoeba* analisados compreendem os resíduos envolvidos na tríade catalítica de subtilisina (Figura 11), Asp (158), His (190) e Ser (350), resíduos conservados na grande maioria das subtilisinas.

Figura 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene de serina (subtilisina – *símile*) de espécies de *Acanthamoeba*. Os resíduos da tríade catalítica de subtilisina Asp, His e Ser estão indicados (▼)

Alguns trabalhos tem mostrado que podem haver variações na tríade catalítica de subtilisina (de Ser / His / Asp para Ser / His / Glu, Ser / His / His, Ser/Glu/Asp), o que pode explicar a nossa dificuldade em amplificar, com os oligonucleotídeos desenhados, a região correspondente ao domínio catalítico dos isolados do grupo morfológico I (EKICI, et. al., 2008; POLGAR, 2005; SIEZEN et. al., 2007).

O alinhamento das sequências de nucleotídeo e de aminoácido do domínio catalítico do gene de subtilisina foi utilizado para a construção de matrizes de divergência (Tabela 6). O modelo evolutivo escolhido pelo programa MODELTEST (POSADA E CRANDALL, 1998) foi HKY com gama. A média de divergência entre os isolados do Brasil ARS02, AMS02, Karina e TRS01, que são bastante relacionados quando analisados com as sequências de SSU rRNA (~2,3%), se mostraram mais divergentes entre si (5,3%) com base nas sequências de aminoácido de subtilisina..

Tabela 6 Matriz de divergência, em porcentagem, das sequências do gene de subtilisina

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>A. castellanii</i> 50374		2.4	2.4	13.3	15.5	13.1	2.4	21.1	2.2	2.67	20.8	18.5
2 <i>A. castellanii</i> 30234*	5.9		0.0	13.1	15.5	13.4	0.7	20.6	2.2	0.24	20.3	17.3
3 <i>A. sp.</i> AMS02*	5.9	0.0		13.1	15.5	14.4	0.7	20.6	2.2	0.24	20.3	17.3
4 <i>A. hatchetti</i> 11DS	16.5	13.6	13.6		18.7	14.6	13.6	24.9	13.6	13.3	20.1	21.2
5 <i>A. healyi</i> 30866	20.8	21.8	21.8	24.2		17.0	15.5	25.2	15.7	15.7	21.0	24.6
6 <i>A. castellanii</i> 30010	21.8	20.8	20.8	19.5	20.1		13.6	26.5	13.4	13.6	20.5	24.7
7 <i>A. sp.</i> TRS01*	8.8	5.4	5.4	17.5	23.2	22.4		20.8	1.7	0.9	20.8	17.8
8 <i>A. sp.</i> TSP09*	36.3	34.9	34.9	38.4	39.9	40.1	31.7		21.1	20.8	26.8	16.1
9 <i>A. sp.</i> Karina*	6.8	4.9	4.9	16.5	22.2	20.9	2.9	32.2		2.43	21.8	18.5
10 <i>A. sp.</i> ARS02*	9.7	5.4	5.4	17.9	23.7	24.1	8.8	36.8	9.2		20.5	17.6
11 <i>A. lugdunensis</i> KAE2	45.6	45.6	45.5	48.3	47.9	50.9	46.0	52.8	45.6	46.0		25.8
12 <i>A. healyi</i> OC-3A	48.8	48.8	48.8	46.9	48.3	50.0	49.7	53.2	48.8	48.8	26.0	

Divergência das sequências de nucleotídeo na matriz acima e a direita e divergência de aminoácido na matriz abaixo e a esquerda. As sequências determinadas neste trabalho estão marcadas (*).

As análises filogenéticas inferidas pelos métodos de ML e MP, baseadas nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos do gene de subtilisina, revelaram topologias bastante similares entre si, com pelo menos três grupos bem definidos (Figura 12). O gene das serina peptidases CSP21 (enzima relacionada ao processo de encistamento) de *A. lugdunensis* KAE2 e *A. healyi* O3-A foram utilizados como grupo externo da análise, na qual o isolado AMS02 se mostrou bastante relacionado ao isolado referência *A. castellanii* 30234, com 100% de similaridade nos dois tipos de sequências analisadas (Tabela 6 e Figura 12). As árvores geradas a partir do gene de subtilisina se mostraram similares a árvore construída com base no gene SSU rRNA (Figura 13).

Figura 12. Árvore de máxima verossimilhança gerada pelo programa RaxML v7.0.4, baseada na sequência de aminoácido (A) e nucleotídeo (B) do gene de subtilisina. As sequências do gene de subtilisina determinadas neste trabalho estão em negrito. Os valores dos nós correspondem aos valores de suporte baseados em 500 replicatas. Genes de serina peptidases (CSP21) de *Ac. lugdunensis* KAE2 e *Ac. healyi* O3-A foram utilizados como grupo externo.

O resultado obtido com o isolado TSP09, único representante do genótipo T5 nas análises, que se posicionou em ramo separado na árvore filogenética com base no gene da subtilisina, foi similar a topologia encontrada com gene SSU rRNA (Figura 13). Aparentemente, nas análises geradas com o gene de subtilisina, os isolados do clado/genótipo T4 (TRS01, Karina, ARS02, AMS02 e *A. castellanii* 30234) se mostram polifiléticos, o que diverge das análises baseadas no gene SSU rRNA dos mesmos isolados. Como se trata de um gene mais polimórfico que o SSU rRNA, o gene de subtilisina poderá ser útil em análises intra-espécies; poderá, por exemplo, permitir a definição de grupos de isolados do genótipo T4, que não são tão evidentes nas análises baseadas no gene ribossômico. Entretanto, para confirmar se o gene de subtilisina apresenta sinal filogenético e é um bom alvo para analisar o relacionamento filogenético entre espécies de *Acanthamoeba*, há necessidade de aumentar consideravelmente o número de isolados analisados.

Figura 13. Árvore de máxima verossimilhança gerada pelo programa RaxML v7.0.4, baseada na sequência de nucleotídeo do gene SSU. Os valores dos nós correspondem aos valores de suporte baseadas em 500 replicatas.

REFERÊNCIAS¹

ADELEKE, A.; PRUCKLER, J.; BENSON, R.; ROWBOTHAM, T.; HALABLAB, M.; FIELDS, B. *Legionella*-like amoebal pathogens ± phylogenetic status and possible role in respiratory disease. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 2, p. 225-230, 1996.

ADL, S. M.; SIMPSON, A. G.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R. A.; ANDERSON, O. R.; BARTA, J. R.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R. A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T. Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C.E.; LEWIS, L. A.; LODGE, J.; LYNN, D. H.; MANN, D. G.; MCCOURT, R. M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, O.; MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; NERAD, T. A.; SHEARER, C. A.; SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. W.; TAYLOR, M. F. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 52, p. 399-451, 2005.

AITKEN, D.; HAY, J.; KINNEAR, F. B.; KIRKNESS, C. M.; LEE, W. R.; SEAL, D. V. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. **Ophthalmology**, v. 103, n. 3, p. 485-494, 1996.

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

ALFIERI, S. C.; CORREIA, C. E. B.; MOTEGI, S. A.; PRAL, E. M. F. Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **J. Parasitol.**, v. 86, p. 220-227, 2000.

ALFIERI, S. C.; PRAL, E. M. F.; SHAW, E.; RAMAZEILLES, C.; RABINOVITCH, M. *Leishmania amazonensis*: Specific labeling of amastigote cysteine proteinases by radioiodinated *N*-benzyloxycarbonyl-tyrosyl-alanyl diazomethane. **Exp. Parasitol.**, v. 73, p. 424-432, 1991.

ALIZADEH, H.; LI, H.; NEELAM, S.; NIEDERKORN, J. Y. Modulation of corneal and stromal matrix metalloproteinase by mannose-induced *Acanthamoeba* cytolytic protein. **Ex. Eye Res.**, v. 87, p. 286-291, 2008.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ALIZADEH, H.; PIDHERNEY, M .S.; MCCULLEY, J .P.; NIEDERKORN, J. Y. Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic free-living amoeba. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1298-1303, 1994.

ALSAM, S.; SISSONS, J.; JAYASEKERA, S.; KHAN, N. A. Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability in an *in vitro* model of the human blood-brain barrier. **J. Infect.**, v. 51, p. 150-156, 2005.

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

ALVES, J .M. P.; GUSMÃO, C. X.; TEIXEIRA, M. M. G.; FREITAS, D.; FORONDA, A. S.; AFFONSO, H.T. Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 19-26, 2000.

ANDERSON, I. J.; WATKINS, R. F.; SAMUELSON, J.; SPENCER, D. F.; MAJOROS, W. H.; GRAY, M. W.; LOFTUS, B. J. Gene discovery in the *Acanthamoeba castellanii* genome. **Protist**. v. 156, p. 203-14, 2005

BARETE, S.; COMBES, A.; DE JONCKHEERE, J. F.; DATRY, A.; VARNOUS, S.; MARTINEZ, V.; PTACEK, S. G.; CAUMES, E.; CAPRON, F.; FRANCÈS, C.; GIBERT, C.; CHOSIDOW, O. Fatal disseminated *Acanthamoeba lenticulata* infection in a heart transplant patient. **Emerg Infect Dis.**, v. 13, p. 736-768, 2007.

BEATTIE, T. K.; TOMLINSON, A.; MCFADYEN, A. K.; SEAL, D. V.; GRIMASON, A. M. Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection? **Ophthalmology**, v. 110, p. 765–771, 2003.

BLASCHITZ, M.; KÖHSLER, M.; ASPÖCK, H.; WALOCHNIK, J. Detection of a serine proteinase gene in *Acanthamoeba* genotype T6 (Amoebozoa: Lobosea). **Exp. Parasitol.**, v. 114, p. 26-33, 2006.

BOGLER, S. A.; ZARLEY, C. D.; BURIANEK, L. L.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. Interstrain mitochondrial DNA polymorphism detected in *Acanthamoeba* by restriction endonuclease analysis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 8, n. 2, p. 145-163, 1983.

BOOTON, G. C.; KELLY, D. J.; CHU, Y. W.; SEAL, D. V.; HOUANG, E.; LAM, D. S.; BYERS, T. J.; FUERST, P. A. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba keratitis* patients in Hong Kong. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1621-1625, 2002.

BOTTONE, E.J. ; PEREZ, A. A.; GORDON, R. E.; QURESHI, M. N. Differential binding capacity and internalisation of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. **J. Med. Microbiol.**, v. 40, p. 148-154, 1994.

BOWERS, B.; KORN, E. D. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. **J. Cell. Biol.**, v. 41, n 3, p. 786-805, 1969.

BOWERS, B.; KORN, E. D. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. **J. Cell. Biol.**, v. 39, p. 95–111, 1968.

BRINDLEY, N.; MATIN, A.; KHAN, N.A. *Acanthamoeba castellanii*: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. **Exp. Parasitol.**, v. 121, p. 254-256, 2009.

BROWN, M. R. W.; BARKER, J. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. **Trends. Microbiol.**, v. 7, p. 46–50, 1999.

BYERS, T. J.; HUGO, E. R.; STEWART, V. J. Genes of *Acanthamoeba*: DNA; RNA and protein sequences (a review). **J. Protozool.**, v. 37, p. 17S–25S, 1990.

CAO, Z.; JEFFERSON, D. M.; PANJWANI, N. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. **J. Biol. Chem.**, v. 25, p. 15838-15845, 1998.

CARVALHO, F. R. S.; CARRIJO-CARVALHO, L.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FORONDA, A. S.; DE FREITAS, D. Serine-like proteolytic enzymes correlated with differential pathogenicity in patients with acute *Acanthamoeba* keratitis. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 4, p. 603-609, 2010.

CARVALHO, F. R.; FORONDA, A. S.; MANNIS, M. J.; HÖFLING-LIMA, A. L.; BELFORT, R. J R; DE FREITAS, D. Twenty years of *Acanthamoeba keratitis*. **Cornea.**, v. 28, n. 5, p. 516-519, 2009.

CASTELLANI, A. An amoeba found in culture of yeast: preliminary note. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 33, p. 160, 1930.

CAUMO, K.; FRASSON, A.P.; PENS, C.J.; PANATIERI, L.F.; FRAZZON, A.P.; ROTT, M.B. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **An. Trop. Med. Parasitol.**, v. 103, p. 477-85, 2009.

CHANG, P. C.; SOONG, H. K. *Acanthamoeba keratitis* in noncontact lens wearers. **Arch. Ophthalmol.**, v. 109, p. 463-464, 1991.

CHANG, J. C.; OSSOFF, S. F.; LOBE, D. C.; DORFMAN, M. H.; DUMAIS, C. M.; QUALLS, R. G.; JOHNSON, J. D. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 49, n. 6, p. 1361-1365, 1985.

CHO, J. H.; NA, B. K.; KIM, T. S.; SONG, C. Y. Purification and characterization of extracellular serine proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. **IUBMB Life**, v. 50, p. 209-214, 2000.

CIRILLO, J. D.; CIRILLO, S. L.; YAN, L.; BERMUDEZ, L. E.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L. S. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 9, p. 4427-4434, 1999.

CIRILLO, J. D.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L. S.; BERMUDEZ, L. E. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 3759-3767, 1997.

CIRILLO, J. D.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L. S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 8, p. 3254-3261, 1994.

CLARKE, D. W.; NIEDERKORN, J. Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba keratitis*. **Trends Parasitol.**, v. 22, p. 175-180, 2006.

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

CULBERTSON, C. G. The pathogenicity of soil amoebas. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 25, p. 231-254, 1971.

CULBERTSON, C. G.; SMITH, J. W.; MINER, J. R. *Acanthamoeba* observation on animal pathogenicity. **Science**, v. 127, p.1506, 1958.

CURSONS, R. T.; BROWN, T. J.; KEYS, E. A.; MORIARTY, K. M.; TILL, D. Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. **Infect. Immun.**, v. 29, p. 401–407, 1980.

DE JONCKHEERE, J. F. Ecology of *Acanthamoeba*. **Ver. Infect. Dis.**, v. 13, p. 385-387, 1991.

DE JONCKHEERE, J. F. Growth characteristics; cytopathic effect in cell culture; and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 39, p. 681–685, 1980.

DE JONCKHEERE, J. F.; VAN DE VOORDE, H. Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 31, n. 2, p. 294-297, 1976.

DE MORAES, J.; ALFIERI, S. C. Growth; encystment; and survival of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 66, p. 221-229, 2008.

DI CAVE, D.; MONNO, R.; BOTTALICO, P.; GUERRIERO, S.; D'AMELIO, S.; D'ORAZI, C.; BERRILLI, F. *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 28, p. 607-612, 2009.

DI CERA, E. Serine proteases. **IUBMB Life**. v.61, p. 510-515, 2009.

EKICI, O. D.; PAETZEL, M.; DALBEY, R. E. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. **Protein Sci.**, v. 17, p. 2023-2037, 2008.

FERRANTE, A. Immunity to *Acanthamoeba*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. S403–S409, 1991.

FERRANTE, A.; BATES, E. J. Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 3320-3321, 1988.

FERREIRA, G. A.; MAGLIANO, A. C.; PRAL, E. M.; ALFIERI, S. C. Elastase secretion in *Acanthamoeba polyphaga*. **Acta Trop.**, v. 112, p. 156-163, 2009.

FOWLER, M.; CARTER, R. F. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. **Br. Med. J.**, v. 25, p. 740-742, 1965.

GARATE, M.; CUBILLOS, I.; MARCHANT, J.; PANJWANI, N. Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 5775-5781, 2005.

GARATE, M.; CAO, Z.; BATEMAN, E.; PANJWANI, N. Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. **J. Biol. Chemist.**, v. 279, p. 29849-29856, 2004.

GAST, R. J. Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 48, p. 609-615, 2001.

GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 43, p. 498-504, 1996.

GELMAN, B. B.; RAUF, S. J.; NADER, R.; POPOV, V.; BOKOWSKI, J.; CHALJUB, G.; NAUTA, H. W.; VISVESVARA, G. S. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. **JAMA**, v. 285, p. 2450-2451, 2001.

GIANINAZZI, C.; SCHILD, M.; WÜTHRICH, F.; MÜLLER, N.; SCHÜRCH, N.; GOTTSTEIN, B. Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. **Exp. Parasitol.**, v. 121, p. 180-186, 2009.

GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 413-433, 2004.

GUDMUNDSSON, O. G.; WOODWARD, D. F.; FOWLER, S. A.; ALLANSMITH, M. R. Identification of proteins in contact lens surface deposits by immunofluorescence microscopy. **Arch. Ophthalmol.**, v. 103, p. 196-197, 1985.

HADAS, E.; MAZUR, T. Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 44, p. 197-200, 1993.

HEASELGRAVE, W.; PATEL, N.; KILVINGTON, S.; KEHOE, S. C.; MCGUIGAN, K. G. Solar disinfection of poliovirus and *Acanthamoeba polyphaga* cysts in water—a laboratory study using simulated light. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 43, p. 125–130, 2006.

HE, Y.; NIEDERKORN, J. Y.; MCCULLEY, J. P.; STEWART, G. L.; MEYER, D. R.; SILVANY, R.; DOUGHERTY, J. *In vivo* and *in vitro* collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. **Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 31, p. 2235–2240, 1990.

HEDSTROM, L. An overview of serine proteases. **Curr. Protoc. Protein. Sci.**, Chapter 21, 2002.

HEWETT, M. K.; ROBINSON, B. S.; MONIS, P. T.; SAINT, C. P. Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type; corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer; (Lobosea: Acanthamoebidae). **Acta Protozool.**, v. 42, p. 325–329, 2003.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Q. Rev. Biol.**, v. 66, n. 4, p. 411–453, 1991.

HIRUKAWA, Y.; NAKATO, H.; IZUMI, S.; TSURUHARA, T.; TOMINO, S. Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 29, n. 1398, p. 47–56, 1998.

HITI, K.; WALOCHNIK, C.; FASCHINGER, C.; HALLER-SCHÖBER, E. M.; ASPÖCK, H.; One- and two-step hydrogen peroxide contact lens disinfection solutions against *Acanthamoeba*: how effective are they? **Eye**, v. 19, p. 1301–1305, 2004.

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*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 111, p. 441–446, 2000.

HORN, M. T.; FRITSCHKE, R. K.; GAUTOM, K. H.; SCHLEIFER, A.; WAGNER, M. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. **Environ. Microbiol.**, v. 4, p. 357–367, 1999.

HURT, M.; NEELAM, S.; NIEDERKORN, J.; ALIZADEH, H. Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6243–6255, 2003.

HUWS, S. A.; MORLEY, R. J.; JONES, M. V.; BROWN, M. R.; SMITH, A. W. Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 282, n. 2, p. 258-265, 2008

IBRAHIM, Y. W.; BOASE, D. L.; CREE, I. A. Factors affecting the epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Ophthalm. Epidemiol.**, v. 14, p. 53-60, 2007.

KASHIWABUCHI, R.T.; FREITAS, D.; ALVARENGA, L.S.; VIEIRA, L.; CONTARINI, P.; SATO, E.; FORONDA, A.; HOFLING-LIMA, A.L. Corneal graft survival after therapeutic keratoplasty for *Acanthamoeba* keratitis. **Act. Ophthalmol.**, v. 86, p. 666-669, 2008.

KEELING, P. J.; BURGER, G.; DURNFORD, D. G.; LANG, B. F.; LEE, R. W.; PEARLMAN, R. E.; ROGER, A. J.; GRAY, M. W. The tree of eukaryotes. **Trends. Ecol. Evol.**, v. 20, p. 670-676, 2005.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 1051-1057, 2008.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 30, p. 564-595, 2006.

KHAN, N. A.; TAREEN, N. K. Genotypic; phenotypic; biochemical; physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. **Folia Parasit. (Praha)**, v. 50, p. 97-104, 2003.

KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. **Curr. Microbiol.**, v. 45, p. 197-202, 2002.

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

KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PANJWANI, N.; CAO, Z.; PAGET, T.A. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2858-2861, 2000.

KILVINGTON, S. Moist-heat disinfection of *Acanthamoeba* cysts. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. S418, 1991.

KILVINGTON, S.; PRICE, J. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 68, n. 5, p. 519-525, 1990.

KIM, W. T.; KONG, H. H. H. A. Y. R.; HONG, Y. C.; JEONG, H. J.; YU, H. S.; CHUNG, D.I. Comparison of specific activity and cytophatic effects of purified 33 kDa serine proteinase from *Acanthamoeba* strains with different degree of virulence. **Kor. J. Parasitol.**, v. 44, p. 321-330, 2006.

KIM, H. K.; HA, Y. R.; YU, H. S., KONG, H. H., CHUNG, D. I. Purification and characterization of a 33 kDa serine protease from *Acanthamoeba lugdunensis* KA/E2 isolated from a Korean keratitis patient. **Korean J. Parasitol.**, v. 41, p. 189-196, 2003.
KLEMB, M.; GOLDBERG, D. E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 71, p. 275-305, 2002.
KLIESCIKOVA, J.; KULDA, J.; NOHYNKOVA, E. Stress-induced pseudocyst formation: a newly identified mechanism of protection against organic solvents in *acanthamoebae* of the T4 genotype. **Protist**, v.162, p. 58-69, 2011b.

KLIESCIKOVA, J.; KULDA, J. Nohynkova Propylene glycol and contact lens solutions containing this diol induce pseudocyst formation in *Acanthamoebae*. **Exp. Parasitol.**, v. 127, p. 326–328, 2011a.

KLOTZ, S. I.; MISRA, R. P.; BUTRUS, S. I. Carbohydrate deposits on the surfaces of worn extended-wear soft contact lenses. **Arch. Ophthalmol.**, v. 105, p. 974–977, 1987.

KONG, H. H.; KIM, T. H.; CHUNG, D. Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba healyi* isolated from GAE. **J. Parasitol.**, v. 86, p. 12-17, 2000.

LACKNER, P.; BEER, R.; BROESSNER, G.; HELBOK, R.; PFAUSLER, B.; BRENNEIS, C.; AUER, H.; WALOCHNIK, J.; SCHMUTZHARD, E. Acute granulomatous *acanthamoeba encephalitis* in an immunocompetent patient. **Neurocrit. Care.**, v. 12, p. 91-94, 2010.

LEDEE, D. R.; IOVIENO, A.; MILLER, D.; MANDAL, N.; DIAZ, M.; FELL, J.; FINI, M. E; ALFONSO, E. C. Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 1458-1462, 2009.

LEDEE, D. R.; HAY, J.; BYERS, T. J.; SEAL, D. V.; KIRKNESS, C. M. *Acanthamoeba griffini*. Molecular characterization of a new corneal pathogen. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 37, p. 544-550, 1996.

LEHMANN, O. J.; GREEN, S. M.; MORLET, N.; KILVINGTON, S.; KEYS, M. F.; MATHESON M. M.; DART, J. K.; MCGILL, J. I.; WATT, P. J. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba keratitis*. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 39, p. 1261–1265, 1998.

LEHER, H.; ZARAGOZA, F.; TAHERZADEH, S.; ALIZADEH, H.; NIEDERKORN, J. Y. Monoclonal IgA antibodies protect against *Acanthamoeba keratitis*. **Exp. Eye Res.**, v. 69, p. 75–84, 1999.

LEHER, H.; SILVANY, R.; ALIZADEH, H.; HUANG, J.; NIEDERKORN, J. Y. Mannose induces the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5-10, 1998.

LEWIS, E. J.; SAWYER, T. K. *Acanthamoeba tubiashi* n. sp., a new species of freshwater Amoebida (Acanthamoebida). **Trans. Am. Microsc. Soc.**, v. 98, p. 543-549, 1979.

LORENZO-MORALES, J.; KLIESCIKOVA, J.; MARTINEZ-CARRETERO, E.; DE PABLOS, L.M.; PROFOTOVA, B.; NOHYNKOVA, E.; OSUNA, A.; VALLADARES, B. Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. **Eukaryot. Cell.**, v. 7, n. 3, p. 509-517, 2008.

LORENZO-MORALES, J.; LÓPEZ-DARIAS, M.; MARTÍNEZ-CARRETERO, E.; VALLADARES, B. Isolation of potentially pathogenic strains of *Acanthamoeba* in wild squirrels from the Canary Islands and Morocco. **Exp. Parasitol.**, v. 117, p.74-79, 2007.

LORENZO-MORALES, J.; ORTEGA-RIVAS, A.; MARTÍNEZ, E.; KHOUBBANE, M.; ARTIGAS, P.; PERIAGO, M. V.; FORONDA, P.; ABREU-ACOSTA, N.; VALLADARES, B.; MAS-COMA, S. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. **Acta Trop.**, v. 100, p. 63-69, 2006.

MAGLIANO, A. C.; MAIA DA SILVA, F.; TEIXEIRA, M. M.; ALFIERI, S.C. Genotyping; physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp isolated from tap water in Brazil. **Exp. Parasitol.**, v. 123, p. 231-235, 2009.

MAGSHOOD, A. H.; SISSONS, J.; REZAIAN, M.; NOLDER, D.; WARHURST, D.; KHAN, N. A. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, p. 755–759, 2005.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 273-307, 2003.

MARCIANO-CABRAL, F.; PUFFENBARGER, R.; CABRAL, G.A. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 47, n. 1, p. 29-36, 2000.

MARTINEZ, A. J. **Free-living amebas**: natural history; prevention; diagnosis; pathology and treatment of disease. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 1-156.

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

MARTINEZ, A. J. Acanthamoebiasis and immunosuppression. Case report. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 41, n. 5, p. 548-557, 1982.

MAST, S. O.; DOYLE, W. L. Ingestion of fluids by *Amoeba*. **Protoplasma.**, v. 20, p. 555-560, 1934.

MATTANA, A.; CAPPAL, V.; ALBERTI, L.; SERRA, C.; FIORI, P.L.; CAPPUCINELLI, P. ADP and other metabolites released from *Acanthamoeba castellanii* lead to human monocytic cell death through apoptosis and stimulate the secretion of proinflammatory cytokines. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4424-4432, 2002.

MAZUR, T.; HADAS, E.; IWANICKA, L. The duration of the cyst stage and viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 46, p. 106-108, 1995.

MITRA, M. M.; ALIZADEH, H.; GERAD, R. D.; NIEDERKORN, J. Y. Characterization of a plasminogen activator produced by *Acanthamoeba castellanii*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 73, p. 157-164, 1995.

MITRO, K.; BHAGAVATHIAMMAI, A.; ZHOU, O. M.; BOBBETT, G.; MCKERROW, J.H.; CHOKSHI, R.; CHOKSHI, B.; JAMES, E.R. Partial characterization of the proteolytic secretions of *Acanthamoeba polyphaga*. **Exp. Parasitol.**, v. 78, p. 377-385, 1994.

MOON, E. K.; CHUNG, D. I.; HONG, Y. C.; KONG, H. H. Characterization of a serine proteinase mediating encystation of *Acanthamoeba*. **Eukaryot. Cell.**, v. 7, n. 9, p.1513-1517, 2008.

NA, B. K.; CHO, J. H.; SONG, C. Y.; KIM, T. S. Degradation of immunoglobulins, protease inhibitors and interleukin-1 by a secretory proteinase of *Acanthamoeba castellanii*. **Korean J. Parasitol.**, v. 40, p. 93-99, 2002.

NA, B. K.; KIM, J. C.; SONG, C. Y. Characterization and pathogenetic role of proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. **Microbial. Pathogenesis**, v. 30, p. 39-48, 2001.

NEFF, R. J.; NEFF, R. H. The biochemistry of amoebic encystment. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v. 23, p. 51-81, 1969.

NEFF, R. J. Detection of synchrony induction in amoebae; problems in cell counting *In*: Synchrony in cell division and growth, **New York Inter Science Publishers**, p. 509-520, 1964.

NEFF, R. J. Mechanisms of purifying amoebae by migration on agar surfaces. **J. Protozool.**, v. 5, p. 226-231, 1958.

NEFF, R. J. Purification, axenic cultivation and description of a soil amoeba, *Acanthamoeba* sp. **J. Protozool.**, v. 4, 176-182, 1957.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. J.; DEERFIELD, D. W. GeneDOC: Analysis and visualization of genetic variation. **EMBNEW News**. v.4, p. 14, 1997.

NAGINGTON, J.; WATSON, P. G.; PLAYFAIR, T. J.; MCGILL, J.; JONES, B. R.; STEELE, A. D. Amoebic infections of the eye. **Lancet**, v. 2, p. 1537-1540, 1974.

NIEDERKORN, J. Y.; ALIZADEH, H.; LEHER, H.; MCCULLEY, J. P. The pathogenesis of *Acanthamoeba keratitis*. **Microbes. Infect.**, v. 1, p. 437-443, 1999.

NUPRASERT, W.; PUTAPORNTIP, C.; PARIYAKANOK, L.; JONGWUTIWES, S. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 12, p. 4636-4640, 2010.

PAGE, F. C. **A new key to fresh water and soil gymnamoeba. (Culture Collection of Algae and Protozoa)**. Cumbria: England: Freshwater Biological Association, Ambleside, 1988.

PLOW, E. F.; HOOVER-PLOW, J. The functions of plasminogen in cardiovascular disease. **Trends. Cardiovasc. Med.**, v. 14, p. 180-186, 2004.

POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 62, p. 2161-2172, 2005.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, p. 817-818, 1998.

POTTER, J. L.; WEISMAN, R. A. Differentiation in *Acanthamoeba*: beta-glucan synthesis during encystment. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 20, n. 237, p. 65-74, 1971.

PRESTON, T. M.; RICHARD, H.; WOTTON, R. S. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. **FEMS Letters**, v. 194, p. 143-147, 2001.

PUSHKAREW, B. M. Über die Verbreitung der Susswasser-protozoen durch die Luft. **Arch. Protistent.**, v. 23, p. 323-362, 1913.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphology de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**, v. 8, p. 557-598, 1977.

RABINOVITCH, M.; DE STEFANO, M. J. Antibody and plant agglutinins stimulate phagocytosis of erythrocytes by *Acanthamoeba*. **Nature**, v. 17, n. 234, p. 414-415, 1971.

RAY, D. L.; HAYES, R. E. *Hartmannella astronyxis*: a new species of free-living amoeba. Cytology and life cycle. **J. Morphol.**, v. 95, p. 159-188, 1954.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 38, p. D227-33, 2010.

RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S. Ecology of free-living amoebae. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 20, p. 225-241, 1994.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**. 2003.

RUDENSKAYA, G. N.; PUPOV, D. V. Cysteine proteinases of microorganisms and viruses. **Biochemistry**. v. 73, p. 1-13, 2008.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, p. 1-21, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Rapid isolation of yeast DNA. In: Molecular cloning, a laboratory manual (Sambrook J and Russel DW, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2001.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. *In*. Proteolytic enzymes, a practical approach R.J. Beynon and J.S. Bond (eds.). Oxford University Press, Oxford, U.K., p. 25–55. 1989

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

SCHROEDER, J. M.; BOOTON, G. C.; HAY, J.; NISZL, I. A.; SEAL, D. V.; MARKUS, M. B.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 1903–1911, 2001.

SIDDIQUI, R.; EMES, R.; ELSHEIKHA, H.; KHAN, N. A. Area 51: How do *Acanthamoeba* invade the central nervous system? **Trends. Parasitol.**, v. 27, n. 5, p. 185-189, 2011.

SIEZEN, R. J.; RENCKENS, B.; BOEKHORST, J. Evolution of prokaryotic subtilases: genome-wide analysis reveals novel subfamilies with different catalytic residues. **Proteins.** v. 67, p. 681-694, 2007.

SILVA-VERGARA, M. L.; COLOMBO, E. R. C.; VISSOTTO, E. F.; SILVA, A. C. A. L.; CHICA, J. E. L.; ETCHEBEHERE, R. M.; ADAD, S. J. Disseminated *Balamuthia mandrillaris* amoeba infection in an AIDS patient from Brazil. **Am. J.Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p.1096-1098, 2007.

SMIRNOV, A. V.; BROWN, S. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. **Protistology**, v. 3, p. 148–190, 2004.

SISON, J. P.; KEMPER, C. A.; LOVELESS, M.; MCSHANE, D.; VISVESVARA, G. S.; DERESINSKI, S. C. Disseminated *Acanthamoeba* infection in patients with AIDS: case reports and review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, n. 5, p. 1207-1216, 1995.

SISSONS, J.; ALSAM, S.; GOLDSWORTHY, G.; LIGHTFOOT, M.; JARROLL, E. L.; KHAN, N. A. Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis. **BMC Microbiol.**, v. 6, p. 1-8, 2006.

SOGIN, M. L.; ELWOOD, H. J.; GUNDERSON, J. H. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 5, p. 1383-1387, 1986.

SOUSA, S. J. F.; DIAS, V. G.; MARCOMINI, L. A. G. Bilateral *Acanthamoeba* ulcer in a user of disposable soft contact lenses: a tragic incident or a consequence of the aggressive policy of soft contact lens trading? **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 71, p. 430-433, 2008.

SPANAKOS, G.; TZANETOU, K.; MILTSAKAKIS, D.; PATSOULA, E.; MALAMOU-LADA, E.; VAKALIS, N. C. Genotyping of pathogenic *Acanthamoebae* isolated from clinical samples in Greece: report of a clinical isolate presenting T5 genotype. **Parasitol. Int.**, v. 55, p. 147-149, 2006.

SRIRAM, R.; SHOFF, M.; BOOTON, G.; FUERST, P.; VISVESVARA, G. S. Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 4045-4048, 2008.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v.22, p. 2688-2690, 2006.

STEINERT, M.; BIRKNESS, K.K.; WHITE, E.; FIELDS, B.; QUINN, F. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 2256-2261, 1998.

STOTHARD, D. R.; SCHROEDER-DIEDRICH, J. M.; AWWAD, M. H.; GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S.; DEAN, C. L.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 45, p. 45-54, 1998.

SWOFFORD, JR. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4b6. Sinauer Associates, Sunderland, 1998.

THOMAS, V.; MCDONNELL, G.; DENYER, S. P.; MAILLARD, J. Y. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 34, p. 231-259, 2010.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

TRIPATHI, R. C.; TRIPATHI, B. J. Lens spoilage. contact lenses: the contact lens assoc. ophth. In: DIABEZIES, O. (Ed.). **Guide to basic science and clinical practice**. Orlando, FL: Grune and Stratton, 1984. p. 45.1–45.33.

VISVESVARA, G. S. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 23, n. 6, p. 590-594, 2010.

VISVESVARA, G. S.; BOOTON, G. C.; KELLEY, D. J.; FUERST, P.; SRIRAM, R.; FINKELSTEIN, A.; GARNER, M. M. In vitro culture; serologic and molecular analysis of *Acanthamoeba* isolated from the liver of a keel-billed toucan (*Ramphastos sulfuratus*). **Vet. Parasitol.**, v. 143, p. 74–78, 2007.

VISVESVARA, G. S.; MAGUIRE, J. H. Pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. **Trop. Infect. Dis.**, v. 2, p. 1114–1125, 2006.

VISVESVARA, G. S.; JONES, D. B.; ROBINSON, N. M. Isolation, identification, and biological characterization of *Acanthamoeba polyphaga* from a human eye. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 24, p. 784-790, 1975.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlations between morphological; molecular biological; and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4408–4413, 2000

WANG, X.; AHEARN, D. G. Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*. **Curr. Microbiol.**, v. 34, n. 4, p. 212-215, 1997.

WEEKERS, P. H.; ENGELBERTS, A. M.; VOGELS, G. D. Bacteriolytic activities of the free-living soil amoebae; *Acanthamoeba castellanii*; *Acanthamoeba polyphaga* and *Hartmannella vermiformis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 68, n. 3, p. 237-243, 1995.

WEEKERS, P. H.; BODELIER, P. L. E.; WIJEN, J. P. H.; VOGELS, G. D. Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*; *Acanthamoeba polyphaga*; and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 2317-2319, 1993.

WEISMAN, R.A. Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 189-219, 1976.

WINIECKA-KRUSNELL, J.; LINDER, E. Bacterial infections of free-living amoebae. **Res. Microbiol.**, v.152, p. 613-619, 2001.

WINIECKA-KRUSNELL, J.; LINDER, E. Free-living amoebae protecting *Legionella* in water: the tip of an iceberg? **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 31, p. 383-385, 1999.

WINCHESTER, K.; MATHERS, W. D.; SUTPHIN, J. E.; DALEY, T. E. Diagnosis of *Acanthamoeba keratitis* in vivo with confocal microscopy. **Cornea**, v. 14, p. 10-17, 1995.

YAGITA, K.; MATIAS, R. R.; YASUDA, T.; NATIVIDAD, F. F.; ENRIQUEZ, G. L.; ENDO, T. *Acanthamoeba* sp. from the Philippines: electron microscopy studies on naturally occurring bacterial symbionts. **Parasitol. Res.**, v. 81, n. 2, p. 98-102, 1995.

Genetic diversity of Brazilian *Acanthamoeba* spp.: genotyping of clinical and environmental isolates, and phylogenetic inferences

Ana C. M. Magliano, João M. Alves, Marta M. G. Teixeira, Silvia C. Alfieri*

Department of Parasitology, University of São Paulo, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil.

ABSTRACT

Free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba* are the causative agents of *Acanthamoeba* keratitis (AK) and granulomatous amoebic encephalitis. *Acanthamoeba* occur ubiquitously in the environment, which favors human contact and infection. In this study, 11 *Acanthamoeba* isolates from Brazilian AK patients and 29 from Brazilian environmental samples were classified at the genotype level by analysis of partial small subunit rRNA gene sequences. Ten Brazilian keratitis isolates and 23 from Brazilian environmental samples were assigned to genotype T4. Five environmental isolates were assigned to genotype T5, and only one was classified in genotype T13; to our knowledge, this is the first report of T13 genotype in Brazil. Overall, these results indicate the high prevalence of T4 *Acanthamoeba* isolates in Brazil and high association of genotype T4 with the Brazilian AK cases. Due to the increased number of reported cases of AK in Brazil and worldwide, further studies on the distribution of *Acanthamoeba* genotypes in both environmental and clinical samples should help to clarify whether particular genotypes (for instance, T4) are more closely linked to *Acanthamoeba* pathogenicity.

Keywords: *Acanthamoeba*, keratitis, isolation, genotyping, phylogenies

Introduction

Free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba* are ubiquitously distributed and are often isolated from the environment. The organisms multiply as phagotrophic trophozoites and encyst under unfavorable conditions. Several

species are known to infect humans, causing keratitis (AK, *Acanthamoeba* keratitis), an eye infection mainly associated with contact lenses wearing, and severe opportunistic infections such as *Acanthamoeba* granulomatous encephalitis (AGE), and disseminated cutaneous diseases (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Clarke and Niederkorn, 2006; Khan, 2006, 2008).

While *Acanthamoeba* identification at the genus level can be easily performed by

*Corresponding author: Department of Parasitology, University of São Paulo, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil. Tel: +55 11 30917417.

E-mail: salfieri@icb.usp.br

morphological parameters, classification at species level remains problematic and is currently based on phylogenetic analyzes of SSU rRNA gene sequences. Seventeen sequence types/genotypes (T1-T17) have been identified in the genus (Stothard *et al.* 1998, Horn *et al.* 1999; Gast, 2001; Hewett *et al.* 2003; Corsaro and Venditti, 2010; Nuprasert *et al.* 2010), some of which are linked to particular *Acanthamoeba* species (T5 and *A. lenticulata*; T3 and *A. griffini*), while others include differently named species. For example, strains of *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. palestinensis* and *A. polyphaga* are assigned to genotype T4 (Stothard *et al.*, 1998; Booton *et al.* 2002; Di Cave *et al.* 2009), the prevalent genotype in the environment and also the more frequently associated with AK (Stothard *et al.* 1998; Walochnik *et al.* 2000a; Schroeder *et al.* 2001; Booton *et al.* 2002, 2005; Ledee *et al.* 2009; De Jonckheere 2003). However, cases of AK have been also attributed to *Acanthamoeba* isolates of other genotypes (Magshood *et al.* 2005; Ledee *et al.* 1996; Stothard *et al.* 1998; Spanakos *et al.* 2006; Ledee *et al.* 2009; Walochnik *et al.* 2000a; Khan *et al.* 2002; Di Cave *et al.* 2009; Corsaro and Venditti, 2010).

The diversity and the pathogenic potential of *Acanthamoeba* spp. remain poorly investigated in Brazil where cases of keratitis have been reported (Sousa *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009, 2010) and few studies with clinical isolates performed (Alves *et al.*, 2000; Kashiwabuchi *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2008). *Acanthamoeba* have been identified in Brazilian hospitals and health care

units (Costa *et al.*, 2010), and the isolation of potentially pathogenic *Acanthamoeba* from tap water and swimming pools has been reported (Caumo *et al.*, 2009; Magliano *et al.*, 2009). We have examined Brazilian environmental samples (soil and water) taken from different geographic regions, and in the course of our study we successfully established axenic cultures of *Acanthamoeba* isolates. Here we report the genotyping of 29 new environmental isolates and of 11 Brazilian isolates associated with AK. We also perform SSU-based phylogenetic analyses to examine the genetic relationships among the environmental and clinical Brazilian isolates.

MATERIALS AND METHODS

1. *Acanthamoeba* isolation and culturing

The *Acanthamoeba* isolates examined in this study (29 from environmental samples, and 11 from keratitis cases) are listed in Table 1. Cultures of the environmental *Acanthamoeba* isolates originated from soil and water samples that were collected and processed using previously established procedures (Magliano *et al.*, 2009; Magliano *et al.*, submitted). The axenized amoebae were cloned twice by the method of limiting dilution and cultures are now kept at 28°C without antibiotics in ATCC 712 (PYG: proteose peptone, yeast extract, glucose; Alfieri *et al.*, 2000) growth medium. Aliquots were frozen and stored under liquid nitrogen. The Brazilian keratitis-derived *Acanthamoeba* isolates, all previously characterized by cyst morphology and RAPD

profiles (Alves *et al.*, 2000), were serially maintained at 28°C in ATCC 712 growth medium.

2. DNA extraction, PCR amplification and sequencing of SSU ribosomal genes

Log-phase trophozoites were washed two times by centrifugation in PBS (pH 6.5) and pellets were frozen at -20 °C or immediately processed for DNA extraction by phenol-chloroform (Kilvington *et al.*, 1991). Briefly, pellets of 1 x 10⁷ trophozoites kept in ice bath were sequentially treated with 1 ml SE (0.1 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0), 1.0 % SDS (from a 10 % stock solution), 100 µg/ml proteinase K, and 300 µg/ml RNase. After incubation at 55-60°C (1-2 h), DNA was extracted by phenol-chloroform, and precipitated with 0.3 M sodium acetate (pH 5.2) and 0.6 volumes of cold isopropanol. Purified DNA was washed with 70 % ethanol, allowed to dry at room temperature, dissolved in TE (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), and kept at 4 °C.

The oligonucleotides JAP1U (5'-CGGGGATGTATTTATTAG-3') and JAP5D (5'-GAAAACATCCTTGGC-3') were used to amplify fragments of ~900 bp under previously established conditions (Alves *et al.*, 2000; Magliano *et al.*, 2009). PCR products were purified in spin-X columns (Costar), cloned in *E. coli* DH5α (with TA cloning kit, Invitrogen) and at least three clones were automatically sequenced with the Big Dye Terminator kit. Nucleotide sequences determined in this study are available at GenBank; accession numbers are listed in Table 1.

3. Alignment of SSU ribosomal sequences and phylogenetic inferences

The SSU rDNA sequences obtained from cultures of Brazilian *Acanthamoeba* isolates were aligned with 45 available sequences of *Acanthamoeba* was obtained from GenBank.

We used *Balamuthia mandrillaris* (GenBank AF019071) as outgroup. Alignments were carried out using ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) and manually refined using GeneDoc v.2.6.01 (Nicholas *et al.*, 1997). Phylogenetic inferences were assessed by the Maximum-Likelihood (ML), Bayesian (B) and Neighbor joining (NJ) methods. ML analyses were performed using RAxML v.2.2.3 (Stamatakis, 2006). Tree searches employed GTRGAMMA with 1000 maximum parsimony-starting trees. Model parameters were estimated in RAxML over duration of the tree search and nodal support was estimated with 100 bootstrap replicates in RAxML. NJ (Saitou and Nei, 1987) was carried out using 1,000 replicates of bootstrap analyses in PAUP* v.4.0b10 (Swofford, 1998) with the GTRGAMMA model parameters, gamma shape parameter and proportion of invariable sites. Bayesian analysis was conducted using MrBayes v3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Tree searches employed GTR plus gamma and proportion of invariable sites. The first 25% of the trees from 1.000.000 generations were discarded as 'burnin'. A divergence matrix was generated with Point Replacer v.2.0.

Table 1. Environmental and clinical Brazilian *Acanthamoeba* isolates, their respective origin, genotypes and SSU rRNA sequences.

<i>Acanthamoeba</i> strain designation	Isolation source	Geographic origin	Genotype	Accession number SSU sequences
<i>Acanthamoeba</i> sp TSP09	Soil (polluted)	Billings reservoir, São Paulo (SP)	T5	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TRO01	Soil	Monte Negro (RO)	T5	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TRO02	Soil	Monte Negro (RO)	T5	*
<i>Acanthamoeba</i> sp ASP02	Water, river	São Paulo (SP)	T5	*
<i>Acanthamoeba</i> sp AMS03	Miranda River	Miranda (MS)	T5	*
<i>Acanthamoeba</i> sp UOf1	Keratitis	São Paul, (SP)	T4	AY026248
<i>Acanthamoeba</i> sp Karina	Keratitis	São Paulo (SP)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp UE4	Keratitis	São Paulo (SP)	T4	ND
<i>Acanthamoeba</i> sp UE6	Keratitis	São Paulo (SP)	T4	AY026246
<i>Acanthamoeba</i> sp UE5	Keratitis	São Paulo (SP)	T4	AY026748
<i>Acanthamoeba</i> sp UE7-1	Keratitis	São Paulo (SP)	T4	AY026247
<i>Acanthamoeba</i> sp TMS01	Soil	Miranda (MS)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TPE02	Soil, garden	Recife (PE)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TPE01	Soil, garden	Recife (PE)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp UE3	Keratitis	São Paulo (SP)	T4	AY026747
<i>Acanthamoeba</i> sp ARO02	Water	Monte Negro (RO)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp AMS01	Miranda River	Miranda (MS)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp AMS02	Miranda River	Miranda (MS)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TPE03	Soil, garden	Recife (PE)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TSP04	Soil, garden	São Paulo (SP)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TSP02	Soil	Cantareira (SP)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TSP03	Soil, garden	São Paulo (SP)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TPR01	Soil	Quatro Barras (PR)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TSP06	Water, Guarapiranga reservoir	São Paulo (SP)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TSP08	Soil	São Paulo (SP)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TSP05	Soil, garden	São Paulo (SP)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TPE04	Sand, beach	Recife (PE)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp ARS01	Pond	Lagoa dos Quadros(RS)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TRS02	Soil	Sapucaia do Sul (RS)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TSC02	Soil	Joinville (SC)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp ASP04	Water, Billings reservoir	São Paulo (SP)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp TGO01	Soil	Goiania (GO)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp UE8L	Keratitis	São Paulo (RS)	T4	ND
<i>Acanthamoeba</i> sp UE8X	Keratitis	São Paulo (RS)	T4	AY026250
<i>Acanthamoeba</i> sp TRS01	Sand, beach	Imbé (RS)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp ARS03	Pond	Gravataí,(RS)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp ARS02	Water, River	Gravataí, (RS)	T4	*
<i>Acanthamoeba</i> sp UE10	Keratitis	São Paulo, (SP)	T4	AY026749
<i>Acanthamoeba</i> sp UE2	Keratitis	São Paulo, (SP)	T4	ND
<i>Acanthamoeba</i> sp ARO04	Pond	Monte Negro (RO)	T13	*
<i>Acanthamoeba</i> sp HC1	Keratitis	São Paulo (SP)	T16	AY026245

*, Sequences determined in this study not yet deposited

ND, sequences not deposited by the author Alves et.al., (2000)

RESULTS AND DISCUSSION

Based on analyzes of SSU rRNA sequences, the genus *Acanthamoeba* encompasses seventeen genotypes (T1-T17). The genotype T4 is by far the most commonly found in the environment and the more frequently associated with AK (Stothard *et al.*, 1998; Walochnik *et al.*, 2000 a; Schroeder *et al.*, 2001; Booton *et al.*, 2002, 2004, 2005; Ledee *et al.*, 2003, 2009; De Jonckheere, 2003), but species of several other genotypes (T2, T3, T5, T6, T10, T11, T15, T16) have also been implicated in keratitis (Magshood *et al.* 2005; Ledee *et al.* 1996; Stothard *et al.* 1998; Spanakos *et al.* 2006; Ledee *et al.* 2009; Walochnik *et al.* 2000a; Nuprasert *et al.*, 2010; Khan *et al.* 2002; Di Cave *et al.* 2009; Nagyová *et al.*, 2010; Corsaro and Venditti 2010). Genotypes T1, T2, T4, T5, T10, and T12 have been associated with AGE (Walochnik *et al.*, 2008, Lackner *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2010), while T7, T8, T9, T13, T14, and T17 were not yet implicated in human diseases.

The genetic diversity of Brazilian *Acanthamoeba* species is yet to be disclosed, and here we performed a screening examining the presence of *Acanthamoeba* in 112 samples from different environmental sources. Soil and water samples were initially seeded on agar-soy plates, and identification of *Acanthamoeba* in the cultures was based on morphological features. Positive cultures were next serially cultivated in agar-soy plates, further axenized, and cloned. From this screening, 29 new cultures of environmental *Acanthamoeba* isolates were established (Table

1), thus indicating that likely in other Countries, *Acanthamoeba* occurs frequently and is widely distributed in Brazil. *Acanthamoeba* have been isolated from Brazilian patients suffering with keratitis, and from some of them cultures were successfully established (Alves *et al.*, 2000). Such clinical isolates have been previously characterized by morphology and RAPD profiles (Alves *et al.*, 2000), and despite for some SSU rRNA sequences have been made available in GenBank (J. M. Alves), the overall results are being reported here for the first time together with the genotyping of 29 new Brazilian environmental *Acanthamoeba* isolates (Table 1). Phylogenetic relationships among environmental and clinical isolates are also examined. To our knowledge, no such comprehensive study has been performed with Brazilian *Acanthamoeba* isolates.

Genotyping of the Brazilian *Acanthamoeba* isolates was performed by phylogenetic analyzes based on partial (fragments of ~900 bp) SSU rRNA gene sequences. Using alignments containing the sequences determined and 46 *Acanthamoeba* sequences available in Gene Bank (Fig. 1), phylogenetic analyzes positioned most of the Brazilian isolates (24 from environmental samples and 11 from keratitis cases) in genotype T4 (Fig. 1), results clearly indicating high prevalence of this sequence type in the environment and its high association with Brazilian keratitis cases. Only one clinical isolate (UHC1) was assigned to genotype T16, a genotype recently identified by Corsaro and Venditti (2010), and thus far represented by *Acanthamoeba* cvX and UHC1.

Fig 1. Phylogenetic tree inferred by neighbor joining analyze based on partial SSU rRNA sequences of 87 *Acanthamoeba* isolates. The numbers at the nodes correspond to bootstrap values derived from 1000 replicatas. The isolates characterized in this study are showed (*). The tree was rooted with *Balamuthia mandrillaris* V039.

In trees generated with MP, ML, and NJ (Fig. 1), the T4 *Acanthamoeba* isolates (overall sequence divergence: 4.3%; range: 0 to 5.2%) distributed in two main groups, here referred to as I, and II, within each the sequence divergence was 3.2%, and 2.8%, respectively (Figure 1). Thirteen Brazilian environmental isolates (3.8% divergence within their sequences), and one Brazilian keratitis isolate (*Acanthamoeba* sp. UE3) were placed in the group I, together with two environmental *Acanthamoeba* isolates (*A. hatchetti* 2AX1, and *A. polyphaga* 30871), and *Acanthamoeba* sp. 50369, a clinical isolate. In this group of *Acanthamoeba* isolates, analyses clustered together seven Brazilian environmental isolates (TSP04, TSP06, TSP08, TPE03, TPR01, TSP02, and TSP03; 1% divergence within their sequences) while *Acanthamoeba* TPE01 and TPE02 (0.3% divergent) grouped with two clinical isolates, *Acanthamoeba* UE3 (Brazilian keratitis case) and *Acanthamoeba* 50369. Isolates AMS01, AMS02 and ARO02 resolved together in a separate cluster; they were closely related to each other (0.2% sequence divergence), and 1.28% divergent (range: 0% ~2.8%) in relation to the other 11 isolates positioning in the same branch. In relation to the group I Brazilian isolates, *Acanthamoeba* TMS01 was the more divergent (overall 3.3 % sequence divergence); it was more closely related to *A. hatchetti* 2AX1 and *A. polyphaga* ATCC30871 (2.0 and 1.7% divergence respectively), and clustered with the latter two species.

Interestingly, analyses placed ten of the T4, Brazilian keratitis isolates (2.3% sequence divergence; range: 0% –3.6%), and 11 of the T4, Brazilian environmental isolates (2.5% sequence divergence; range: 0% ~4.1%) in the group II. This group of *Acanthamoeba* isolates distributed in a more complex branching-pattern, but at least four clusters could be identified: the first (overall sequence divergence: 2.8%; range: 0%~4.2%), formed by the reference species *A. rhyodes* ATCC 30973 (a soil isolate), *A. polyphaga* ATCC 30873 and *A. castellanii* ATCC 30868 (both from human cornea); the second, formed by 8 clinical (keratitis) isolates (~2,3% divergence; range: 0% ~4.2%), six of which (UOf1, Karina, UE4, UE6, UE5, and UE7.1) are from Brazilian cases of keratitis; the third, formed by two Brazilian keratitis isolates (UE10, and UE2), and *A. castellanii* ATCC 50374 (overall sequence divergence: 1.15%; range: 1.1% - 1.2%); and the fourth (overall sequence divergence: ~0.7%; range: 0% ~1.5%), formed by 11 Brazilian environmental isolates, 2 Brazilian keratitis isolates (UE8X, and UE8L) and 4 other keratitis isolates (*Acanthamoeba* sp ATCC 50496, *Acanthamoeba* sp ATCC 50497, *A. polyphaga* ATCC 30461, and *Acanthamoeba* sp KAE27). In this latter cluster, two Brazilian soil isolates (TPE04, and TPE05) were closely related to the keratitis isolate *A. polyphaga* 30461 (0.5 % divergence) and *Acanthamoeba* sp. ACC01 (0.4 % divergence), the latter a Brazilian tap water isolate that for sharing morphological, physiological and biochemical features to *A. polyphaga* 30461

(Visvesvara *et al.*, 1975) was characterized as potentially pathogenic (Magliano *et al.*, 2009). The sequences of the Brazilian isolates TSC02, ASP183 and TRS02 were 100 % identical; analyzes placed them together with the Brazilian environmental isolates TGO01, and ARS01, indicating an overall divergence of ~1.3%. Finally, seven *Acanthamoeba* isolates here including 5 Brazilian isolates resolved together in a separate branch. When compared to each other, the sequences of the Brazilian environmental isolates ARS02, ARS03, TRS01, of the Brazilian keratitis isolates UE8X, and UE8L, and of *Acanthamoeba* sp 50496 were 100% identical, being 0.22% divergent in relation to *Acanthamoeba* KAE27; probably, these group of *Acanthamoeba* isolates represent a same, potentially pathogenic *Acanthamoeba* species.

Genotype T5, which is commonly associated with the species *A. lenticulata* (Stothard *et al.*, 1998; Ledee *et al.* 2009; Spanakos *et al.* 2006), is the second most prevalent genotype in the environment and, perhaps, the prevalent genotype in Philippines (Booton *et al.*, 2005; Rivera and Adao, 2008). Interestingly, studies indicate that T5 isolates are more resistant than isolates of genotype T4 to multipurpose contact lens cleaning solutions (Horn *et al.*, 2002; Hiti *et al.*, 2002). Genotype T5 *Acanthamoeba* isolates have been detected in patients with AK (Spanakos *et al.*, 2006), AGE, and disseminated acanthamoebiasis (Barete *et al.*, 2007; Lackner *et al.*, 2010), and isolation of a potentially pathogenic T5 *Acanthamoeba* strain from a heated indoor

swimming pool has been reported (Gianinazzi *et al.*, 2009). In the present study, phylogenetic analyses assigned five Brazilian environmental isolates (3 from soil, and 2 from water) into genotype T5. All grouped in a homogeneous (~2.3 % internal sequence divergence), strongly supported (~100% bootstrap) clade formed by strains of *A. lenticulata* (ATCC 30841, 50427, and 50429) (Fig. 1). When compared to *A. lenticulata* 30841 (strain PD2S), isolates TSP09, AMS03, TRO09, TRO10 and ASP02 were, respectively, 3.8%, 1.0%, 2.7% and 3.0% , and 2.5% divergent.

As far as we know, no cases of human infection have been associated to genotype T13, and one of the Brazilian isolates (ARO04) was assigned to this genotype (Fig. 1). Genotype T13 was identified by Horn *et al.* (1999) during the characterization of *Acanthamoeba* UWET39, a soil isolate from Seattle (USA). Two other *Acanthamoeba* isolates (UWC9 and TUMK) were subsequently assigned to this genotype (Beier *et al.*, 2002; Hewett *et al.*, 2003; Booton *et al.*, 2005), and, more recently, T13 *Acanthamoeba* isolates were identified in Japan (Edagawa *et al.*, 2009); however, because of the region amplified and the smaller size of SSU rRNA sequences, the latter could not be included in our analyzes. When compared to *Acanthamoeba* isolates UWET39, UWC9, and TUMK, the sequence of the Brazilian isolate was, respectively, 0.5%, 0.6%, and 0.3% divergent.

We have here isolated *Acanthamoeba* spp. from Brazilian environmental samples, and have successfully established axenic cultures of 29 new

isolates. Genotyping of these new environmental isolates and of 11 *Acanthamoeba* isolates originating from Brazilian cases of keratitis highlight the high prevalence (85% of the cultures examined) of genotype T4 in Brazil and high association of this genotype with Brazilian keratitis cases. With the data set here analyzed, SSU-based phylogenetic inferences separated the T4 *Acanthamoeba* isolates in two groups (I, and II), and placed the vast majority of the Brazilian keratitis isolates and several other keratitis isolates in the group II. Whether this group is indeed represented by the more pathogenic T4 *Acanthamoeba* isolates is an interesting aspect that still needs to be investigated. In this regard, studies with new environmental, and clinical T4 isolates, and addition of new sequences will help to clarify this point.

Currently placed in genotype T4 are organisms formerly characterized by morphological features and identified as different species, for instance *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. hatchetti* and strains of *A. castellanii* and *A. polyphaga*. Since SSU-based genotyping is the reliable way to identify species, the complicate tasks of defining criteria and renaming species is the challenge that remains for the future. In this regard, renaming all T4 *Acanthamoeba* spp. as *A. castellanii*, a species whose type strain falls in genotype T4 (Ledee *et al.* 2009) has already been suggested (Stothard *et al.*, 1998); but considering the genetic heterogeneity among the T4 isolates, it is perhaps too premature to link this genotype to that species. On the other hand, we know very little about the genus

Acanthamoeba; new genotypes are being identified, and the overall diversity is yet to be disclosed.

References

- Alfieri, S. C., Correia, C. E. B., Motegi, S. A. and Pral, E. M. F. (2000). Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Journal of Parasitology* 86, 220-227.
- Alves, J. M. P., Gusmão, C. X., Teixeira, M. M. G., Freitas, D., Foronda, A. S. and Affonso, H. T. (2000). Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33, 19-26.
- Barete, S., Combes, A., de Jonckheere, J. F., Datry, A., Varnous, S., Martinez, V., Ptacek, S. G., Caumes, E., Capron, F., Francès, C., Gibert, C. and Olivier Chosidow, O. (2007). Fatal disseminated *Acanthamoeba lenticulata* infection in a heart transplant patient. *Emerging Infectious Diseases* 13, 736-738.
- Beier, C. L., Horn, M., Michel, R., Schweikert, M., Görtz, H.-D. and Wagner, M. (2002). The genus *Caedibacter* comprises endosymbionts of *Paramecium* spp. related to the *Rickettsiales* (Alphaproteobacteria) and to *Francisella tularensis* (Gammaproteobacteria). *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6043-6050. [doi: 10.1128/AEM.68.12.6043-6050.2002]
- Booton, G. C., Kelly, D. J., Chu, Y.-W., Seal, D. V., Houang, E., Lam, D. S. C., Byers, T. J. and Fuerst, P. A. (2002). 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1621-1625.
- Booton GC, Rogerson A, Bonilla TD, Seal DV, Kelly DJ, Beattie TK, Tomlinson A, Lares-Villa F, Fuerst PA, Byers TJ (2004) Molecular and physiological evaluation of subtypical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. *Journal Eukaryotic Microbiology*. 51, 192-200
- Booton, G. C., Visvesvara, G. S., Byers, T. J., Kelly, D. J. and Fuerst, P. A. (2005). Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with non keratitis infections. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 1689-1693. [doi:10.1128/JCM.43.4.1689-1693.2005]
- Carvalho, F. R. S., Foronda, A. S., Mannis, M. J., Höfling-Lima, A. L., Belfort Jr., R. and de Freitas, D. (2009). Twenty Years of *Acanthamoeba* Keratitis. *Cornea* 28, 516-519.
- Carvalho, F. R. S., Carrijo-Carvalho, L. C., Chudzinski-Tavassi, A. M., Foronda, A. S. and de Freitas, D. (2010). Serine-like proteolytic enzymes correlated with differential pathogenicity in patients with acute *Acanthamoeba* keratitis.

Clinical Microbiology Infection 17, 603-9 [doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03252.x]

Caumo, K., Frasson, A. P., Pens, C. J., Panatieri, L. F., Frazzon, A. P. G. and Rott, M. B. (2009). 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. [DOI: 10.1179/136485909X451825]

Clarke, D. W. and Niederkorn, J. Y. (2006). The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends in Parasitology* 22, 175–180.

Corsaro, D. and Venditti, D. (2010). Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitology Research* 107, 233–238.

Costa, A. O., Castro, E. A., Ferreira, G. A., Furst, C., Crozeta, M. A. and Thomaz-Soccol, V. (2010). Characterization of *Acanthamoeba* isolates from dust of a Public Hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 57, 70–75. [DOI: 10.1111/j.1550-7408.2009.00453.x]

Di Cave, D., Monno, R., Bottalico, P., Guerriero, S., D'Amelio, S., D'Orazi, C. and Berrilli, F. (2009). *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. *European Journal of Clinical and Microbiological Infectious Diseases* 28, 607–612.

De Jonckheere JF. (2003) Epidemiological typing of *Acanthamoeba* strains isolated from keratitis cases in Belgium. *Bulletin de la Société belge d'ophtalmologie* 287, :27-33.

Edagawa, A., Kimura, A., Kawabuchi-Kurata, T., Kusahara, Y. and Karanis, P. (2009). Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitology Research* 105,1109–1117.

Gast, R. J. (2001). Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 609–615.

Gianinazzi, C., Schild, M., Wüthrich, F., Müller, N., Schürch, N., Gottstein, B., (2009). Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. *Experimental Parasitology* 121, 180–186.

Harrison JL, Ferreira GA, Raborn ES, Lafrenaye AD, Marciano-Cabral F, Cabral GA (2010) *Acanthamoeba* culbertsoni elicits soluble factors that exert anti-microglial cell activity. *Infection and immunity*. 78, 4001-11.

Hewett, M. K., Robinson, B. S., Monis, P. T. and Saint, C. P. (2003). Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsoni* Sawyer, (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozoologica* 42, 325–329.

Hiti, K., J. Walochnik, E. M. Haller-Schober, C. Faschinger, and H. Aspöck. (2002). Viability of *Acanthamoeba* after exposure to a multipurpose disinfecting contact lens solution and two hydrogen peroxide systems. *Br. J. Ophthalmol.* 86:144–146.

Horn, M. T., Fritsche, R. K., Gautom, K. H., Schleifer, A. and Wagner, M. (1999). Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environmental Microbiology* 4, 357–367.

Horn, M. T. R. Fritsche, T. Linner, R. K. Gautom, M. D. Harzenetter, and M. Wagner. (2002) Obligate bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the beta-Proteobacteria: proposal of “Candidatus Procabacter *Acanthamoebae*” gen. nov., sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 52, 599–605.

Huelsenbeck, J. P., and Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.

Kashiwabuchi, R.T., Freitas, D., Alvarenga, L.S., Vieira, L., Contarini, P., Sato, E., Foronda, A., Hofling-Lima, A.L., (2008) Corneal graft survival after therapeutic keratoplasty for *Acanthamoeba* keratitis. *Acta Ophthalmologica* 86, 666–669.

Khan, N. A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 564–595.

Khan, N. A. (2008). *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. *Journal of Medical Microbiology* 57, 1051–1057.

Khan, N. A., Jarroll, E. L., and Paget, T. A. (2002). Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Current Microbiology* 45, 197–202.

Kilvington, S., Beeching, J. R., and White, D. G. (1991). Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 310–314.

Lackner, P., Beer, R., Broessner, G., Helbok, R., Pfausler, B., Brenneis, C., Auer, H., Julia Walochnik, J., Schmutzhard, E. (2010). Acute granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis in an immunocompetent patient. *Neurocritical Care* 12, 91–94. [DOI 10.1007/s12028-009-9291-z]

Ledee, D. R., Hay, J., Byers, T. J., Seal, D.V. and Kirkness, C. M. (1996). *Acanthamoeba griffini*: molecular characterization of a new corneal pathogen. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences* 37, 544–550.

Ledee, D. R., Iovieno, A., Miller, D., Mandal, N., Diaz, M., J. Fell, J., Fini, M. E. and Alfonso, E. C. (2009). Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 1458–1462. [doi:10.1128/JCM.02365-08]

Marciano-Cabral, F. and Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 273–307.

Magliano, A. C., Maia da Silva, F., Teixeira, M. M. and Alfieri, S. C. (2009). Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. *Experimental Parasitology* 12, 231–235.

- Magliano, A. C., Teixeira, M. M. and Alfieri, S. C. (submitted). Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): characterisation of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences.
- Magshood, A. H., Sissons, J., Rezaian, M., Nolder, D., Warhurst, D., Khan, N. A. (2005). *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology* 54, 755–759.
- Nagyová, V., Nagy, A. and Timko, J. (2010). Morphological, physiological and molecular biological characterisation of isolates from first cases of *Acanthamoeba* keratitis in Slovakia. *Parasitology Research* 106, 861–72. [DOI 10.1007/s00436-010-1731-3]
- Nicholas K. B, Nicholas H. B. Jr, Deerfield D. W. (1997) GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variability. *EMBNEW News*. 4, 14
- Nuprasert, W., Putaporntip, C., Pariyakanok, L. and Jongwutiwes, S. (2010). Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 4636–4640.
- Rivera, W. L. and Adao, D. E. V. (2008). Identification of the 18S-ribosomal-DNA genotypes of *Acanthamoeba* isolates from the Philippines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 102, 671–677.
- Ronquist, F and Huelsenbeck, J. P (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19, 1572–1574
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.
- Schroeder, J. M., Booton, G. C., Hay, J., Niszl, I. A., Seal, D. V., Markus, M. B., Fuerst, P. A., and Byers, T. J., (2001). Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1903–1911. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1903–1911.
- Sousa, S. J. F., Dias, V. G., Marcomini, L. A. G. (2008). Bilateral *Acanthamoeba* ulcer in a user of disposable soft contact lenses: a tragic incident or a consequence of the aggressive policy of soft contact lens trading? *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 71, 430–433.
- Spanakos, G., Tzanetou, K., Miltsakakis, D., Patsoula, E., Malamou-Lada, E., Vakalis, N.C. (2006). Genotyping of pathogenic *Acanthamoebae* isolated from clinical samples in Greece - Report of a clinical isolate presenting T5 genotype. *Parasitology International* 55, 147–149.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HP: maximum likelihood-based Phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688– 2690.
- Stothard, D. R., Schroeder-Diedrich, J. M., Awwad, M. H., Gast, R. J., Ledee, D. R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C. L., Fuerst, P. A. and Byers, T. J. (1998). The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45, 45–54.
- Swofford, D.L. (1998). *PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Version 4.0b10a. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.(1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 24, 4876–4882
- Visvesvara, G.S., Jones, D.B. and Robinson, N.M. (1975). Isolation, identification, and biological characterization of *Acanthamoeba polyphaga* from a human eye. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24, 784–790.
- Walochnik, J. Haller-Schober, E.-M. Kölli, H. Picher, O. Obwallner, A. and Aspöck, H. (2000a). Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens wearing keratitis patients in Austria. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3932–3936.
- Walochnik, J. Obwallner, A. Aspöck, H. (2000b). Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4408–4413.
- Walochnik J, Aichelburg A, Assadian O, Steuer A, Visvesvara G, Vetter N, Aspöck H (2008) Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 338–40.

Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil

Ana C.M. Magliano, Flávia Maia da Silva, Marta M.G. Teixeira, Silvia C. Alfieri *

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, CEP 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2009

Received in revised form 23 June 2009

Accepted 21 July 2009

Available online 29 July 2009

Keywords:

Acanthamoeba

Acanthamoeba polyphaga

SSU rRNA genotyping

Serine peptidases

Cysteine peptidases

Keratitis

Pathogenicity

ABSTRACT

Acanthamoeba spp., known to cause keratitis and granulomatous encephalitis in humans, are frequently isolated from a variety of water sources. Here we report for the first time the characterization of an *Acanthamoeba* sp. (ACC01) isolated from tap water in Brazil. This organism is currently being maintained in an axenic growth medium. Phylogenetic analysis based on SSU rRNA gene sequences positioned the new isolate in genotype T4, closest to the keratitis-causing isolate, *A. polyphaga* ATCC 30461 (~99% similarity). *Acanthamoeba* ACC01 and *A. polyphaga* 30461 both grew at 37 °C and were osmotically resistant, multiplying in hyperosmolar medium. Both isolates secreted comparable amounts of proteolytic enzymes, including serine peptidases that were optimally active at a near neutral/alkaline pH and resolved identically in gelatin gels. Incubation of gels at pH 4.0 with 2 mM DTT also indicated the secretion of similar cysteine peptidases. Altogether, the results point to the pathogenic potential of *Acanthamoeba* ACC01.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Small amoebas of the genus *Acanthamoeba* are distributed worldwide and are frequently isolated from soil and water samples (reviews: Khan, 2006; Marciano-Cabral and Cabral, 2003). The organisms grow and multiply as phagotrophic trophozoites, able to internalize and digest bacteria and other prey (Bottone et al., 1994; Weekers et al., 1993; De Moraes and Alfieri, 2008), and encyst when conditions become adverse. Cysts resist desiccation and a variety of chemical and physical agents (Mazur et al., 1995; Aksozek et al., 2002); these attributes facilitate perpetuation of *Acanthamoeba* in different types of water sources, including tap water and recreational water systems (De Jonckheere, 1991; Schuster and Visvesvara, 2004; Ibrahim et al., 2007; Gianinazzi et al., 2009).

Acanthamoeba species have gained importance in public health as the causative agents of granulomatous encephalitis, disseminated cutaneous diseases and keratitis (reviews: Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Khan, 2006, 2008; Clarke and Niederkorn, 2006). While *Acanthamoeba* granulomatous encephalitis (AGE) and disseminated cutaneous diseases are severe, often lethal infections that affect immunocompromised hosts, *Acanthamoeba* keratitis (AK) occurs in healthy individuals, particularly those wearing contact lenses. The high prevalence (50–100%) of specific antibodies

in healthy populations indicates that humans are frequently exposed to *Acanthamoeba* (Alizadeh et al., 2001; Chappell et al., 2001; Brindley et al., 2009).

Several *Acanthamoeba* species have been reported to infect humans (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Khan, 2006), and the list of clinical and environmental isolates is growing (Ibrahim et al., 2007). This highlights the importance of correctly identifying species and genotypes and of evaluating the pathogenic potential of new environmental isolates. Physiological and biochemical features associated with *Acanthamoeba* pathogenicity include temperature tolerance, osmotolerance and secretion of proteolytic enzymes (De Jonckheere, 1980; Khan et al., 2000, 2001, 2002; Khan and Tareen, 2003; Alsam et al., 2005; Clarke and Niederkorn, 2006).

For decades, the identification and taxonomy of organisms of the genus *Acanthamoeba* relied upon morphological criteria. Based on cyst size and morphology, three morphological groups (I, II and III) have been identified (Pussard and Pons, 1977). With the currently used SSU rRNA-derived phylogenies, 15 sequence types/genotypes (T1 to T15) separated by ~5.0% sequence divergence have been defined in the genus (Gast et al., 1996; Gast, 2001; Stothard et al., 1998; Horn et al., 1999; Hewett et al., 2003). Accumulating sequence data indicate that the vast majority (~90%) of *Acanthamoeba* species producing human keratitis belong to genotype T4 (Magshood et al., 2005; Khan, 2006). Whether these findings simply reflect the abundance of T4 species in the environment or indicate that T4 species are more virulent remains to be determined.

* Corresponding author. Fax: +55 11 30917417.

E-mail address: salfieri@icb.usp.br (S.C. Alfieri).

Human infections by *Acanthamoeba* remain poorly investigated in Brazil, but cases of keratitis and studies with clinical isolates have been reported (Alves et al., 2000; Kashiwabuchi et al., 2008; Sousa et al., 2008). The number of infections associated with *Acanthamoeba* may be underestimated in Brazil, as clinicians dealing with keratitis do not always publish their experiences and the absence of AGE cases may be due to misdiagnosis. Furthermore, the diversity and the pathogenic potential of *Acanthamoeba* spp. from Brazilian water supplies remain unknown. Here we report the isolation and the molecular, physiological and biochemical characterization of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from a tap water sample from São Paulo City, São Paulo State, Brazil.

2. Materials and methods

2.1. *Acanthamoeba* isolation and growth conditions

Water samples (~50 ml) collected in sterilized polypropylene tubes were filtered through 0.45-µm Millipore membranes, and the membranes were then placed on 60-mm diameter plates containing non-nutrient agar and 0.2% soy extract. Plates incubated at either room temperature or 28 °C were monitored daily under an inverted microscope, and those positive for *Acanthamoeba* were selected for further culturing. Cultures were initially maintained in agar-soy plates containing *Escherichia coli* K-12 and then transferred to axenic growth medium. For culture axenization, cysts washed out from agar-soy plates were treated with 0.4–0.5 N HCl (Hiti et al., 2004) and then placed in ATCC 712 (PYG: proteose peptone, yeast extract, glucose) medium (Alfieri et al., 2000) supplemented with 100 µg/ml gentamicin. The axenized amoebae were cloned twice by the limiting dilution technique. Aliquots were frozen and stored under liquid nitrogen.

Acanthamoeba polyphaga ATCC 30461 was cultivated at 28 °C, without antibiotics, in ATCC 712 liquid medium.

2.2. Growth parameters and osmotolerance assays

To determine the growth parameters, trophozoites from log-phase cultures were washed by centrifugation in PBS (400g, 10 min) and resuspended in ATCC 712 medium at a density of 1×10^5 to 2×10^5 cells/ml. Then, 20-mL cell suspension samples were distributed in 250-ml Erlenmeyer flasks and incubated at 28 or 37 °C, with shaking (80–100 rpm). Trophozoites and cysts were enumerated in a Fuchs-Rosenthal chamber.

The effect of osmolality on the trophozoites' growth was evaluated as described (Khan et al., 2001) in non-nutrient agar plates that contained mannitol and had been previously seeded with heat-killed *E. coli* K-12. Plates were incubated at 28 °C for up to 96 h. Plating assays were performed in duplicate.

2.3. *Acanthamoeba* conditioned medium (ACM)

Trophozoites were resuspended in fresh ATCC 712 medium (2.0×10^6 /ml) and incubated for 24 h at either 28 or 37 °C (80–100 rpm). Supernatants were collected and processed exactly as described (Alfieri et al., 2000). ACM was used as the enzyme source in azocasein assays and to assess proteolytic activities in gelatin-containing acrylamide gels. In the latter case, prior to electrophoresis, ACM was treated with 0.05% Triton X-100.

2.4. Azocasein assays

Assays with azocasein were performed as described (Alfieri et al., 2000). Reaction mixtures (200 µl final volume) contained 10 mg/ml azocasein, buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, or Mes-

Tris-glycine-acetate (12.5 mM each) for the pH-dependence experiments) and 80 µl of ACM. Reactions were incubated for 3 h at 30 °C.

2.5. Peptidase detection in SDS gels with copolymerized substrate

Peptidase activities were examined in 10% resolving SDS-polyacrylamide gels containing 500 µg/ml copolymerized gelatin (Alfieri et al., 2000). For the detection of serine peptidases, the ACM was treated with 5 µg/ml antipain (to prevent proteolysis) and mixed with 4× sample buffer, and then 2–3 µl were applied onto the gel lanes. After electrophoresis (5 °C, constant 5 mA), gels were incubated twice for 30 min (room temperature, under agitation) in 2.5% (v/v) Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) and then incubated overnight (18–24 h), with one change, in buffer alone. Gels were fixed with 10% (w/v) TCA and stained with Coomassie Blue R-350.

For the detection of cysteine peptidases, ACM was preincubated with 10 mM PMSF (30 min, room temperature) to block serine peptidase activity (Alfieri et al., 2000). Following the addition of 5 µg/ml antipain and sample buffer, 8–10 µl were applied onto the gel lanes. After being run, the gels were incubated at pH 4.0 in 0.1 M acetate buffer containing 2 mM DTT.

2.6. PCR amplification, sequencing and phylogenetic analyses of SSU ribosomal genes

Trophozoites were washed twice by centrifugation in PBS (pH 7.2), and the pellets were processed for DNA extraction (phenol-chloroform method) according to Kilvington et al. (1991). The oligonucleotides JAP1U (5'-CGGGGATGTTTATTAG-3') and JAP5D (5'-GAAAACATCCTTGGC-3'), complementary to conserved regions of *A. castellanii* (CDC:0981:V006) SSU rRNA gene (sequence positions: 218–235 and 1108–1122, respectively), were used to amplify fragments of ~900 bp, under previously established conditions (Alves et al., 2000). PCR products were purified in spin-X columns (Costar), cloned in *E. coli* DH5α (with a TA cloning kit, Invitrogen) and at least three clones were automatically sequenced with the Big Dye Terminator kit. The nucleotide sequence of *Acanthamoeba* ACC01 determined in this study is available in GenBank under the Accession No. FJ710616.

The partial SSU rRNA gene sequence of *Acanthamoeba* ACC01 was aligned (with GeneDoc Software and manual adjustment) with 25 sequences retrieved from GenBank (accession numbers are given in Fig. 1). Phylogenetic trees were inferred using maximum-parsimony (MP), maximum-likelihood (ML) and neighbor-joining (NJ) analyses. A distance matrix was calculated using neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) with parameters of the TN + I + G substitution model. A similarity matrix was calculated with Point Replacer v2.0. Bootstrap analyses with 1000 replicates were performed with PAUP 4.0b10.

3. Results and discussion

Acanthamoeba spp. are commonly found in soil and a variety of water sources, but their isolation from tap water and recreational water systems points to a risk of human infection (Schuster and Visvesvara, 2004; Gianinazzi et al., 2009). Cysts resist a variety of chemical agents, including chlorine, and the incidence of keratitis is generally high in countries where water is inadequately treated (Ibrahim et al., 2007). Another relevant risk factor is the use of stagnant water (Ibrahim et al., 2007); the storage of water in rooftop tanks facilitates not only the survival of *Acanthamoeba* but also its growth in biofilms.

Fig. 1. Neighbor-joining tree showing the evolutionary relationships of 26 *Acanthamoeba* spp. based on partial 18S rRNA sequences. Bootstrap values for NJ and MP (1000 replicates) are indicated at the tree nodes. The symbols (□), (○), (◆) and (*) identify the species associated with keratitis, associated with *Acanthamoeba* granulomatous encephalitis, isolated from the environment and isolated from cell culture, respectively. The five Brazilian isolates are in bold. The *Acanthamoeba* genotypes and the accession numbers of the sequences included in the analyses are indicated. The tree was rooted with morphological group I species (*A. comandonii*, *A. astronyxis* and *A. tubiashi*). The scale bar represents substitutions per nucleotide position.

As part of a more comprehensive study examining the presence of *Acanthamoeba* spp. in Brazilian water sources, we analyzed 19 tap water samples from the metropolitan area of São Paulo City (São Paulo State, Brazil), a region supplied with potable, treated water. *Acanthamoeba* was morphologically identified in two samples, collected on different occasions (June 2003 and May 2004) from the same school. *Acanthamoeba* ACC01 was isolated from one such sample and is currently being maintained without antibiotics in ATCC 712 medium. Morphological characterization by light microscopy revealed trophozoites of medium size (16–25 µm in diameter), with a nucleus displaying a prominent central nucleolus. Mature cysts (9–17 µm in diameter) exhibited a wrinkled ectocyst and a polygonal or round-to-ovoid endocyst (results not shown). These features are compatible with those of an *Acanthamoeba* species from morphological group II.

Acanthamoeba ACC01 was molecularly identified by SSU rRNA-based phylogenetic analysis. The sequence of *Acanthamoeba* ACC01 (~900 bp) was aligned with 25 *Acanthamoeba* sequences retrieved from GenBank and similar trees were generated using ML, MP and NJ (Fig. 1). In all, *Acanthamoeba* ACC01 was positioned together with the genotype T4 species (Fig. 1) and closest to *A. polyphaga* ATCC 30461 (~99% similarity). This position was strongly supported by high bootstrap values.

Here, SSU rRNA sequences from four Brazilian *Acanthamoeba* isolates associated with AK (U/E5, U/E6, U/E8R U/E10) were for the first time included in phylogenetic analyses. The results corroborated previous studies indicating a high polymorphism in

genotype T4 species (Gast et al., 1996; Gast, 2001; Stothard et al., 1998) and also revealed high variability among the Brazilian isolates. The T4 *Acanthamoeba* species analyzed formed a heterogeneous major clade (~3.5% internal divergence) and were distributed in two subclades, each containing both clinical and environmental isolates. Interestingly, isolates U/E10 and U/E8R grouped together with ACC01 (similarities of ~96.5% and 97%, respectively), while U/E5 and U/E6 (similarities of ~95% and 95.5%, respectively, when compared to ACC01) grouped together with *A. culbertsoni*, a species isolated in the USA from a patient with keratitis. *Acanthamoeba* sp. ACC01 also showed close phylogenetic relationships with *A. castellanii* ATCC 30868 and *A. polyphaga* 30873 (~96.5% similarity).

Acanthamoeba polyphaga 30461 was isolated 36 years ago in Texas (USA) from a patient suffering from chronic ulcerative keratitis; *in vitro* studies indicated that it was a low virulence strain (Visvesvara et al., 1975). Based on the strong genetic similarity between *Acanthamoeba* ACC01 and *A. polyphaga* 30461, we hypothesized that the tap water isolate was potentially pathogenic and, therefore, examined the temperature tolerance and osmotolerance of both isolates. Thermo- and osmotolerance are often used as indirect markers of *Acanthamoeba* virulence (De Jonckheere, 1980; Khan et al., 2001, 2002).

Acanthamoeba sp. ACC01 and *A. polyphaga* 30461 grew equally well at 28 °C, and in cultures inoculated with 1×10^5 /ml cells, doubling times for the two species were 21.5 ± 3.2 (N = 6) and 20.0 ± 1.4 (N = 4) h, respectively. As expected for potentially path-

ogenic amoebae, both species could be serially propagated at 37 °C with no prior adaptation. Interestingly, while cultures of *Acanthamoeba* ACC01 could easily be started at 37 °C with 1×10^5 trophozoites/ml (doubling time = 21.1 ± 0.9 h; average of six independent experiments), those of *A. polyphaga* required a higher initial cell density ($\sim 2 \times 10^5$ /ml). In addition, growth of *A. polyphaga* was significantly delayed at 37 °C (doubling time = 29.0 ± 2.5 h; average of four experiments).

Osmotolerance assays revealed identical behavior of isolates ACC01 and ATCC 30461 and the ability of both to proliferate in plates containing mannitol (Fig. 2A). Mannitol was used at 0.125, 0.25, 0.50, 0.75 and 1 M; such concentrations, as indicated by osmolality measurements of equivalent solutions prepared in water, increased osmolality by 104, 208, 417, 624 and 835 mOsm/KgH₂O, respectively. In agreement with previous observations (Khan et al., 2001, 2002; Khan and Tareen, 2003), trophozoite growth was negatively affected by mannitol in a concentration-dependent manner (Fig. 2A). Direct microscopic observations indicated not only lower numbers of trophozoites in plates containing 0.75 and 1 M mannitol but also that, for both isolates, encystment was impaired by 1 M mannitol. Although the experiments performed did not permit the precise determination of the extent to which mannitol affected the viability of the amoebae, cultures of *Acanthamoeba* ACC01 and *A. polyphaga* 30461 were easily restarted in liquid medium at 28 °C from organisms recovered on day 5 from 1 M mannitol–agar plates.

Although both pathogenic and non-pathogenic *Acanthamoeba* strains constitutively secrete proteolytic enzymes, research currently indicates that pathogenic strains secrete larger amounts of serine peptidases (Khan, 2006). Here we used azocasein assays and gelatin gels to compare the secretory activities of *Acanthamoeba* ACC01 and *A. polyphaga* 30461. Media conditioned by each of the isolates at either 28 or 37 °C had comparable levels of an activity that optimally hydrolyzed azocasein at near neutral/alkaline pH and was potently inhibited by PMSF but not by E-64 and pepstatin (Fig. 2B and C; results not shown). Thus, we assigned this activity to serine peptidases. The close resemblance of *Acanthamoeba* ACC01 and *A. polyphaga* 30461 was also indicated by the identical banding profiles of their serine peptidases in gelatin gels; the activities detected in the 80- to 150-kDa region, at 33 kDa and at 47 kDa were potently inhibited by PMSF but not by E-64 (Fig. 3A and B and results not shown). Prior blocking of serine peptidases with 10 mM PMSF additionally indicated that *Acanthamoeba* ACC01 and *A. polyphaga* 30461 secreted similar cysteine peptidases (Fig. 3C). In gels incubated at pH 4.0 with 2 mM DTT, activities were detected in the region of 110–120 kDa and at 65, 45 and 37 kDa; most were potently inhibited by 10 μ M E-64 (Fig. 3D).

Here, we report the isolation from tap water of a T4 *Acanthamoeba* sp. showing a close phylogenetic relationship with *A.*

Fig. 3. Banding profiles of secreted serine and cysteine peptidases in gelatin gels. (A) Media conditioned at 28 °C (lanes 1 and 2) and at 37 °C (lanes 3 and 4) by *Acanthamoeba* sp. ACC01 (lanes 1 and 3) and *A. polyphaga* ATCC 30461 (lanes 2 and 4) were electrophoresed in a 10% SDS–acrylamide gel containing gelatin; the gel was then incubated at pH 8.0. Arrows point to serine peptidase activities. (B) Conditioned media were treated with 10 mM PMSF prior to electrophoresis and the gel was incubated at pH 8.0 in the presence of PMSF. (C and D) Media conditioned at 28 °C (lanes 1 and 2) and at 37 °C (lanes 3 and 4) by *Acanthamoeba* sp. ACC01 (lanes 1 and 3) and *A. polyphaga* ATCC 30461 (lanes 2 and 4) were treated with 10 mM PMSF prior to electrophoresis. The gel was incubated at pH 4.0 with 2 mM DTT (C) or with 2 mM DTT and 10 μ M E-64 (D). Bands associated with cysteine peptidases (37, 45, 65 and 110–120 kDa) are indicated by arrows. In (A) and (C), the positions of molecular weight markers are indicated on the left.

polyphaga ATCC 30461, a keratitis-producing isolate. We demonstrated the temperature tolerance and osmotolerance of both isolates and showed that media conditioned by both contained comparable levels of azocasein-hydrolyzing activity and similar serine and cysteine peptidases. Altogether, these results point to the pathogenic potential of this Brazilian *Acanthamoeba* sp. Although finding a potentially pathogenic *Acanthamoeba* in high-quality tap water indicates a risk of human infection, we believe that water storage in rooftop tanks favored the survival of the *Acanthamoeba* species characterized in this study.

Fig. 2. Osmotolerance and secretory activity of *Acanthamoeba* sp. ACC01 and *A. polyphaga* ATCC 30461. (A) Growth and migration of trophozoites in agar plates containing mannitol and heat-killed *Escherichia coli* K-12. The sizes of clearing zones that indicate bacterial consumption were measured daily; values attained by 96 h are indicated (mean $\pm$ SD, four independent experiments). (B and C) Azocaseinolytic activity in *Acanthamoeba* conditioned medium. Media conditioned at 28 °C (B) and at 37 °C (C) by *Acanthamoeba* sp. ACC01 (circles) and *A. polyphaga* (triangles) were incubated with the substrate at the pH indicated (3 h, 30 °C), in the absence (closed symbols) or presence (open symbols) of 5 mM PMSF. Each data point indicates the mean ($\pm$ SD) of four separate experiments.

Acknowledgments

We thank Dr. João Marcelo Pereira Alves for providing us with the primers used in this study and also for making the SSU rRNA gene sequences of the Brazilian keratitis isolates available in GenBank. This work was supported with funds from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil) and CT Hidro-CNPq (Brazil). A.C.M.M. is a graduated fellow from CNPq, and F.M.S. is a PRODOC fellow from CAPES (Brazil).

References

- Askozeck, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J.Y., Alizadeh, H., 2002. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *Journal of Parasitology* 88, 621–623.
- Alfieri, S.C., Correia, C.E.B., Motegi, S.A., Pral, E.M.F., 2000. Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Journal of Parasitology* 86, 220–227.
- Alizadeh, H., Apte, S., El-Agha, M.S.H., Li, L., Hurt, M., Howard, K., Cavanagh, H.D., McCulley, J.P., Niederkorn, J.Y., 2001. Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* 20, 622–627.
- Alsam, S., Sissons, J., Jayasekera, S., Khan, N.A., 2005. Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability in an *in vitro* model of the human blood–brain barrier. *Journal of Infection* 51, 150–156.
- Alves, J.M.P., Gusmão, C.X., Teixeira, M.M.G., Freitas, D., Foronda, A.S., Affonso, H.T., 2000. Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33, 19–26.
- Bottone, E.J., Perez, A.A., Gordon, R.E., Qureshi, M.N., 1994. Differential binding capacity and internalisation of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. *Journal of Medical Microbiology* 40, 148–154.
- Brindley, N., Matin, A., Khan, N.A., 2009. *Acanthamoeba castellanii*: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. *Experimental Parasitology* 121, 254–256.
- Chappell, C.L., Wright, J.A., Coletta, M., Newsome, A.L., 2001. Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8, 724–730.
- Clarke, D.W., Niederkorn, J.Y., 2006. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends in Parasitology* 22, 175–180.
- De Jonckheere, J.F., 1980. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 681–685.
- De Jonckheere, J.F., 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases* 13, 385–387.
- De Moraes, J., Alfieri, S.C., 2008. Growth, encystment, and survival of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 66, 221–229.
- Gast, R.J., 2001. Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 609–615.
- Gast, R.J., Ledee, D.R., Fuerst, P.A., Byers, T.J., 1996. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43, 498–504.
- Gianinazzi, C., Schild, M., Wüthrich, F., Müller, N., Schürch, N., Gottstein, B., 2009. Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. *Experimental Parasitology* 121, 180–186.
- Hewett, M.K., Robinson, B.S., Monis, P.T., Saint, C.P., 2003. Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozoologica* 42, 325–329.
- Hiti, K., Walochnik, C., Faschinger, C., Haller-Schober, E.M., Aspöck, H., 2004. One- and two-step hydrogen peroxide contact lens disinfection solutions against *Acanthamoeba*: how effective are they? *Eye* 19, 1301–1305.
- Horn, M.T., Fritzsche, R.K., Gautom, K.H., Schleifer, A., Wagner, M., 1999. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environmental Microbiology* 4, 357–367.
- Ibrahim, Y.W., Boase, D.L., Cree, I.A., 2007. Factors affecting the epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmic Epidemiology* 14, 53–60.
- Kashiwabuchi, R.T., Freitas, D., Alvarenga, L.S., Vieira, L., Contarini, P., Sato, E., Foronda, A., Hofling-Lima, A.L., 2008. Corneal graft survival after therapeutic keratoplasty for *Acanthamoeba* keratitis. *Acta Ophthalmologica* 86, 666–669.
- Khan, N.A., 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 564–595.
- Khan, N.A., 2008. *Acanthamoeba* and the blood–brain barrier: the breakthrough. *Journal of Medical Microbiology* 57, 1051–1057.
- Khan, N.A., Jarroll, E.L., Panjwani, N., Cao, Z., Paget, T.A., 2000. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2858–2861.
- Khan, N.A., Jarroll, E.L., Paget, T.A., 2001. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Current Microbiology* 43, 204–208.
- Khan, N.A., Jarroll, E.L., Paget, T.A., 2002. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Current Microbiology* 45, 197–202.
- Khan, N.A., Tareen, N.K., 2003. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. *Folia Parasitologica (Praha)* 50, 97–104.
- Kilvington, S., Beeching, J.R., White, D.G., 1991. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 310–314.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G., 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 273–307.
- Magshood, A.H., Sissons, J., Rezaian, M., Nolder, D., Warhurst, D., Khan, N.A., 2005. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology* 54, 755–759.
- Mazur, T., Hadas, E., Iwanicka, L., 1995. The duration of the cyst stage and viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Tropical Medicine and Parasitology* 46, 106–108.
- Pussard, M., Pons, R., 1977. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebozoa). *Protistologica* 13, 557–610.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.
- Schuster, F.L., Visvesvara, G.S., 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology* 34, 1001–1027.
- Sousa, S.J.F., Dias, V.G., Marcomini, L.A.G., 2008. Bilateral *Acanthamoeba* ulcer in a user of disposable soft contact lenses: a tragic incident or a consequence of the aggressive policy of soft contact lens trading? *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 71, 430–433.
- Stothard, D.R., Schroeder-Diedrich, J.M., Awwad, M.H., Gast, R.J., Ledee, D.R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C.L., Fuerst, P.A., Byers, T.J., 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45, 45–54.
- Visvesvara, G.S., Jones, D.B., Robinson, N.M., 1975. Isolation, identification, and biological characterization of *Acanthamoeba polyphaga* from a human eye. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24, 784–790.
- Weekers, P.H., Bodelier, P.L.E., Wijen, J.P.H., Vogels, G.D., 1993. Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2317–2319.

Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): characterisation of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences

Ana C. M. Magliano, Marta M. G. Teixeira, Silvia C. Alfieri*

Department of Parasitology, University of São Paulo, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil.

SUMMARY

Free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba* are the agents of both opportunistic and non-opportunistic infections and are frequently isolated from the environment. Of the seventeen genotypes (T1-T17) identified thus far, four (T7, T8, T9, and T17) accommodate the rarely investigated species of morphological group I, those that form large, star-shaped cysts. We report the isolation and axenic culture of seven new Brazilian environmental *Acanthamoeba* isolates, all assigned to group I. Phylogenetic analyses based on partial (~1,200 bp) SSU rRNA gene sequences placed the new isolates in the robustly supported clade composed of the species of morphological group I. One of the Brazilian isolates is closely related to *A. comandoni* (genotype T9), while the other six, together with two isolates recently assigned to genotype T17, form a homogeneous, well-supported group (2.0% sequence divergence) that likely represents a new *Acanthamoeba* species. Thermotolerance, osmotolerance, and cytopathic effects, features often associated with pathogenic potential, were also examined. The results indicated that all seven Brazilian isolates grow at temperatures up to 40 °C, and resist under hyperosmotic conditions. Additionally, media conditioned by each of the new *Acanthamoeba* isolates induced the disruption of SIRC and HeLa cell monolayers.

Keywords: *Acanthamoeba*, *Acanthamoeba astronyxis*, *Acanthamoeba tubiashi*, *Acanthamoeba comandoni*, SSU rRNA genotyping, SSU rRNA-based phylogenies

Introduction

Free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba* are distributed worldwide and are frequently isolated from dust, air, soil, and a variety of water samples, including tap water and recreational water systems (reviews: Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Khan, 2006; Ibrahim *et al.* 2007; Thomas *et al.* 2010). *Acanthamoeba* can cause both opportunistic infections (e.g., *Acanthamoeba* granulomatous encephalitis, sinusitis, and disseminated cutaneous lesions) and

non-opportunistic infections such as keratitis, a disease principally associated with wearing contact lenses that may lead to severe corneal damage (reviews: Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Clarke and Niederkorn, 2006; Khan, 2006, 2008).

Acanthamoeba grow and multiply as phagotrophic trophozoites that avidly predate on a variety of bacterial species in the environment (Bottone *et al.* 1994; Weekers *et al.* 1993; De Moraes and Alfieri, 2008). Adverse conditions cause trophozoites to encyst; cysts are double-walled, resistant stages that remain viable (and infective) for several years (Mazur *et al.* 1995; Aksozek *et al.* 2002; Sriram *et al.* 2008).

*Corresponding author: Department of Parasitology, University of São Paulo, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil. Tel: +55 11 30917417.

E-mail: salfieri@icb.usp.br

Based on cyst size and morphology, the genus *Acanthamoeba* encompasses three morphological groups (Pussard and Pons, 1977). The species of morphological group I, thus far represented by *Acanthamoeba astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* (= *A. comandoni*), *A. tubiashi* (Ray and Hayes, 1954; Lewis and Sawyer, 1979; Page, 1988), and a small number of *A. astronyxis*- and *A. comandoni*-related isolates (Lorenzo-Morales *et al.* 2005a-c; Ertabaklar *et al.* 2007), form the largest cysts (mean diameter >18 µm), in which the endocyst (the internal cyst wall) meets the ectocyst at the ends of arms or rays, giving rise to a characteristic star shape. In morphological group III, cysts (diameter <19 µm) have a thin ectocyst and a more or less rounded endocyst that does not produce arms. The vast majority of *Acanthamoeba* species are classified in morphological group II and form cysts that are intermediate between the two extremes (Page, 1988).

Acanthamoeba classification and taxonomy is currently based on phylogenetic analyses of SSU rRNA gene sequences. Of the seventeen genotypes (T1 to T17) identified in the genus (Stothard *et al.* 1998, Horn *et al.* 1999; Gast, 2001; Hewett *et al.* 2003; Corsaro and Venditti, 2010; Nuprasert *et al.* 2010), four (T7, T8, T9, and T17) are linked to morphological group I. While *Acanthamoeba* genotypes are usually distinguished by ~5% sequence variation, the SSU rRNA sequences of genotype T7, T8, T9, and T17 species are highly divergent from other sequence types (Stothard *et al.* 1998; Nuprasert *et al.* 2010).

The species of morphological group I remain poorly investigated and are less frequently isolated from the environment. We have isolated *Acanthamoeba* from Brazilian environmental samples and have established axenic cultures of seven isolates with morphological features compatible with the species of group I. The growth parameters, physiological features, and SSU

rRNA-based genotyping of these new isolates are reported here.

MATERIALS AND METHODS

Acanthamoeba isolation and axenic culture

The following Brazilian *Acanthamoeba* isolates are characterized in this study: ARO01 and ARO03 (both from river water, Monte Negro City, Rondonia State), ASP03 (water, Jurumirim's reservoir, Avaré City, São Paulo State), TMS02 (soil, Campo Grande City, Mato Grosso do Sul), TSC01 (soil, Joinville City, Santa Catarina State), TSP01 (humus garden, São Paulo City, São Paulo State), and TSP07 (soil, polluted part of Billings reservoir, São Paulo Metropolitan region, São Paulo State).

Soil and water samples were collected in sterilised polypropylene centrifuge tubes. Soil was directly seeded on 0.2% soy extract-agar plates, and water samples were filtered through 0.45-µm Millipore membranes and processed as described by Magliano *et al.* (2009). Cultures that were positive for *Acanthamoeba* were axenized and cloned twice by limiting dilution (Magliano *et al.* 2009), and are now kept at 28 °C or 37 °C without antibiotics in ATCC 712 growth medium (PYG: proteose peptone, yeast extract, glucose; Alfieri *et al.* 2000). Aliquots were frozen and stored under liquid nitrogen.

Trophozoite and cyst morphologies were examined in fresh preparations under an inverted microscope (40X).

Growth kinetics and osmotolerance assays

Trophozoites of log-phase 3- to 4-day-old cultures were resuspended at a density of ~ 1 x 10⁵/ml in ATCC 712 medium, and incubated (20 ml of each cell suspension in 250-ml Erlenmeyer flasks) at 28, 37 or 40

°C with shaking (100 rpm). The trophozoites and cysts were enumerated in a Fuchs-Rosenthal chamber under a phase-contrast light microscope.

Osmotolerance assays were performed at 28 °C in 24-well tissue culture plates. Cultures were started with 5×10^4 trophozoites in 0.5 ml ATCC 712 medium with or without mannitol (concentration range: 0.25-1.0 M). Growth was monitored under an inverted microscope, and on day 4, the trophozoites and cysts were enumerated.

***Acanthamoeba* conditioned medium and cytopathic assays**

Trophozoite suspensions (1×10^6 cells/ml) prepared in serum-free DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) were incubated at 37 °C for 48 h. Following centrifugation (400 x g, 10 min), *Acanthamoeba* conditioned media were filtered and processed as described by Alfieri *et al.* (2000). SIRC (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea) and HeLa cells distributed in the wells of 96-well microplates were grown at 37 °C (5% CO₂ atmosphere) in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Confluent monolayers were washed and incubated overnight (~18 h) with dilutions of *Acanthamoeba* conditioned medium or non-conditioned DMEM (control cell monolayers), all containing fetal bovine serum. Cultures were washed with PBS, and then fixed and stained with crystal violet. The proportion of cells remaining was visually estimated.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing of SSU ribosomal genes

Log-phase trophozoites were washed twice by centrifugation in PBS (pH 6.5), and pellets ($\sim 1 \times 10^7$ trophozoites) were frozen at -20 °C or immediately processed for DNA extraction by phenol-chloroform

(Kilvington *et al.* 1991). The oligonucleotides JAP1U (5'-CGGGGATGTATTTATTAG-3') and JAP5D (5'-GAAAACATCCTTGGC-3') were used to amplify ~1,200-bp fragments under previously established conditions (Alves *et al.* 2000; Magliano *et al.* 2009). PCR products were purified in Spin-X columns (Costar), cloned into *E. coli* DH5 α (TA cloning kit, Invitrogen), and at least three clones were automatically sequenced with the Big Dye Terminator kit. The nucleotide sequences determined in this study are available at GenBank under the accession numbers JF 325883-JF 325889.

Alignment of SSU ribosomal sequences and phylogenetic inferences

Partial SSU rRNA gene sequences (~1200 bp) of the Brazilian *Acanthamoeba* isolates were aligned with 31 *Acanthamoeba* sequences retrieved from GenBank using GeneDoc Software and visual adjustment. Phylogenetic trees were inferred with maximum likelihood (ML), neighbour-joining (NJ), maximum parsimony (MP), and Bayesian (B) methods. ML trees were generated with RAxML v.7.0 (Stamatakis, 2006), using the GTRGAMMA model, gamma shape parameter and proportion of invariable sites. Model parameters were estimated in RAxML over the duration of the tree search. Nodal supports were estimated with 600 replicates, also in RAxML, using the rapid bootstrapping algorithm. MP trees were inferred using PAUP* v. 4.0b10 (Swofford, 1998) with 1,000 replicates of random addition taxa and TBR branch swapping; all positions were of equal weight. NJ (Saitou and Nei, 1987) was also carried out using 1,000 replicates of bootstrap analyses in PAUP* v.4.0b10 with the GTRGAMMA model parameters, gamma shape parameter and proportion of invariable sites. Bayesian inferences were carried out with MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001), using the GTR

model. The first 100 trees from 1,000,000 generations were discarded as burn-in, and posterior probability values were calculated on the consensus of last tree samples. A divergence matrix was generated with Point

Replacer v.2.0. The trees were rooted with the sequences of *Balamuthia mandrillaris* V039 (AF019071).

Table 1. Brazilian *Acanthamoeba* isolates characterized in this study.

<i>Acanthamoeba</i> isolate	Source	Place (City/State)	SSU sequences (accession number)
ARO01	Water, river	Monte Negro/Rondonia	JF 325885
ARO03	Water, river	Monte Negro/Rondonia	JF 325888
TMS02	Soil	Campo Grande/Mato Grosso do Sul	JF 325883
TSC01	Soil	Joinville/Santa Catarina	JF 325884
ASP03	Water, Jurumirim's reservoir	Avaré/São Paulo	JF 325886
TSP01	Soil, garden	São Paulo/São Paulo	JF 325887
TSP07	Soil, polluted part of Billings reservoir	São Paulo Metropolitan region, São Paulo	JF 325889

RESULTS

The morphology of the Brazilian Acanthamoeba isolates

The seven new *Acanthamoeba* isolates are morphologically similar to each other and have features typically found in the species belonging to morphological group I. The trophozoites were relatively large; each contained a nucleus with a prominent central nucleolus, and there were many vacuoles in the cytoplasm. Mature cysts were large, double-walled and rounded; the ectocyst was smooth, and the inner cyst wall had a star-like structure (Fig. 1). The number of arms varied from 3 to 9, with 5 to 7 arms being the most common, as with *A. astronyxis* ATCC 30137. The mean cyst diameter varied from $23.3 \pm 2.3 \mu\text{m}$ (*Acanthamoeba* TSP01) to $25.6 \pm 3.7 \mu\text{m}$ (*Acanthamoeba* TMS02), which are in the range reported for *A. comandoni* (25.6 μm ; range: 21.0-30.0 μm) and larger than those reported for *A. astronyxis*

30137 (19.2 μm ; range: 16.0-28.0 μm) (Lewis and Sawyer, 1979).

SSU-based phylogenetic inferences

To classify the new Brazilian isolates, we amplified, cloned and sequenced ~1,200-bp fragments of the SSU rRNA gene. When the sequences were aligned with 31 other *Acanthamoeba* sequences retrieved from GenBank, phylogenetic analyses positioned the new Brazilian isolates in the robustly supported clade composed of the species of morphological group I (Fig. 1; Table 1). The overall sequence divergence among the species in this clade is ~12.7%; the divergence of group I species from the remaining taxa is ~35%.

Analyses placed *Acanthamoeba* TSP07 in genotype T9 and indicated that it is phylogenetically closely related to *A. astronyxis* 30901, *Acanthamoeba* PJ and PSH (1.0% divergence); it is 8.2% divergent from *A. comandoni* ATCC 30135, the reference species

for this genotype. On the other hand, *Acanthamoeba* TSP07 is very divergent (~16.9%; range: 16.6-17.1%) compared to the other six Brazilian *Acanthamoeba* isolates. The isolates ASP03, ARO01, TMS02, TSC01, TSP01, and ARO03 were homogeneous to each other (~1.9% divergence within their sequences; range: 0.4-2.9%) and clustered with two isolates recently assigned to the novel genotype T17 (Nuprasert *et al.* 2010).

Overall, trees generated by different methods displayed similar topologies, and nodal values consistently supported the relative positions of the group I species analysed. ML analyses separated the morphological group I *Acanthamoeba* isolates into three main groups: one, with an internal sequence divergence of ~14.4%, is composed of the species of genotypes T7 (*A. astronyxis* 30137) and T8 (*A. tubiashi* 30867); the second (internal sequence divergence of ~3.2%; range: 0.4-8.2%) is composed of *A. comandoni* 30135 (genotype T9) and *A. comandoni*-related isolates, including *Acanthamoeba* TSP 07 (present study), *A. astronyxis* 30901, and isolates AE2a, PJ, and PSH; and the third group (internal sequence divergence: ~2.0%; range: 0.1-2.9%) is composed of two recently characterised isolates of genotype T17 (Nuprasert *et al.* 2010) and six of the seven new Brazilian environmental isolates.

Our analyses are in general agreement with previously reported *Acanthamoeba* phylogenies (Gast, 1996, 2001; Stothard *et al.* 1998). The results indicate a close relationship among genotypes T3, T4 and T11 (5-7% divergence) and an interspecific polymorphism in genotype T4 (~4.1% internal divergence). In addition and corroborating an earlier study (Corsaro and Venditti, 2010), analyses separately resolved two *A. astronyxis* strains, yielding ~20% divergence: *A. astronyxis* 30137, the reference species of genotype T7, and *A. astronyxis* 30901; the latter was positioned in the clade of genotype T9.

Growth kinetics, thermotolerance and osmotolerance of the Brazilian *Acanthamoeba* isolates

Growth kinetics of the Brazilian *Acanthamoeba* isolates was studied at 28 °C, 37 °C, and 40 °C, with the results indicating similar growth rates at 28 °C (Table 2). All seven isolates grew at 37 °C and 40 °C, although at the latter temperature, doubling times significantly increased. Interestingly, the results indicated that *Acanthamoeba* ARO 01, TSC 01 and TSP 01 grow better at 37 °C than at 28 °C (Table 2).

The ability of trophozoites to multiply under and/or resist hyperosmotic conditions was examined in experiments carried out at 28 °C in ATCC 712 medium supplemented with 0.25, 0.5, 0.75 and 1 M mannitol (Table 3). At the lowest concentration assayed, mannitol did not appreciably interfere with the growth of trophozoites, although the growth of *Acanthamoeba* TSP 01 was moderately reduced ($P < 0.05$) compared to the growth of the control without mannitol. Trophozoites became rounded and vacuolated in medium containing 0.5 M mannitol (663 mOsm/Kg.H₂O), a condition that markedly reduced (isolates ARO01, ARO03, ASP03 and TSP01) and even eliminated (isolates TMS02, TSC01, and TSP07) the growth response. From those cultures, high numbers of cysts were recovered on day 4 (Table 3). Higher mannitol concentrations impaired growth and encystment. Cyst recovery was lower in 0.75 M than in 0.5 M mannitol-treated cultures, and no cysts were visualised until day 4 in cultures treated with 1 M mannitol, a concentration that also significantly reduced viability (Table 3). To confirm the viability of cells remaining on day 4, cultures of all *Acanthamoeba* isolates were successfully re-started after removal of 1 M mannitol from the medium (results not shown); trophozoites exhibiting typical morphology were evident within 2-6 days.

Table 2. Divergence within the SSU rRNA gene sequences of *Acanthamoeba* species of morphological group I.

<i>Acanthamoeba</i> spp	TMS02	TSC01	ARO01	ASP03	TSP01	ARO03	AE9a	AE1a	30137	EFW5	30867	30901	PSH	PJ	AE2a	TSP07
TMS02																
TSC01	0.4															
ARO01	0.9	1.1														
ASP03	1.5	1.6	1.5													
TSP01	2.7	2.9	2.6	3.0												
ARO03	2.3	2.5	1.7	2.5	1.6											
AE9a	1.9	2.1	2.1	2.3	2.5	2.5										
AE1a	2.0	2.2	2.2	2.4	2.6	2.6	0.1									
<i>A. astronyxis</i> 30137	19.4	19.7	19.6	19.4	18.7	19.3	18.9	18.8								
EFW5	19.4	19.7	19.6	19.4	18.7	19.3	18.9	18.8	0.0							
<i>A. tubiashi</i> 30867	14.6	14.9	14.7	14.2	14.2	14.8	13.8	13.7	15.6	15.6						
<i>A. astronyxis</i> 30901	16.0	16.3	16.2	16.2	15.8	16.1	15.6	15.5	20.2	20.2	14.8					
PSH	16.2	16.5	16.3	16.4	15.9	16.3	15.8	15.7	20.5	20.5	15.0	0.4				
PJ	16.2	16.5	16.3	16.4	15.9	16.1	15.8	15.7	20.5	20.5	14.8	0.4	0.4			
AE2a	16.0	16.3	16.3	16.3	15.9	16.2	15.6	15.5	20.4	20.4	15.2	1.0	1.0	1.0		
TSP07	16.8	17.1	17.0	17.0	16.6	16.9	16.4	16.3	20.3	20.3	14.7	1.0	1.0	1.0	1.5	
<i>A. comandoni</i> 30135	21.5	21.7	21.6	21.6	21.2	21.3	21.0	21.0	25.9	25.9	20.6	7.8	7.5	7.8	8.1	8.2

Figure 1. Maximum likelihood tree based on partial SSU rRNA *Acanthamoeba* sequences. Bootstrap values for ML and NJ analyses and posterior probabilities for a Bayesian inference are indicated at the tree nodes; values lower than 50% (ML and NL) or 0.7 (Bayesian inference) are not shown. The seven Brazilian *Acanthamoeba* isolates characterised in this study are in bold. The accession numbers of the sequences analysed and the *Acanthamoeba* genotypes are indicated. *Balamuthia mandrillaris* V039 was used as the outgroup. The characteristically star-shaped cysts of the *Acanthamoeba* isolates TSP07, TSP01, and ARO01 are shown in the figure (Bar = 10 µm).

Table 3. Growth kinetics of the Brazilian *Acanthamoeba* isolates at different temperatures.

Acanthamoeba	TEMPERATURE					
	28°C		37°C		40°C	
	Doubling Time (hours)	Max. Cell Density (x 10 ⁶ /ml)	Doubling Time (hours)	Max. Cell Density (x 10 ⁶ /ml)	Doubling Time (hours)	Max. Cell Density (x 10 ⁶ /mL)
ARO01 ^a	19.2 ± 1.4 (8)	2.8 - 3.7	14.6 ± 2.3 (11)	6.0 - 7.2	28.2 ± 2.0 (3)	1.6 - 1.8
TSP01 ^a	18.7 ± 0.4 (6)	3.1 - 4.0	13.6 ± 1.1 (9)	6.1 - 7.3	27.8 ± 0.5 (3)	1.3 - 1.7
ARO03 ^a	19.3 ± 0.2 (3)	3.1 - 3.6	17.8 ± 0.4 (3)	4.4 - 5.3	28.2 ± 0.5 (3)	1.4 - 1.9
TSC01	21.6 ± 1.0 (3)	2.6 - 2.8	18.6 ± 0.2 (3)	3.4 - 4.1	28.7 ± 2.0 (3)	1.5 - 1.7
TMS02	19.0 ± 2.4 (3)	3.2 - 3.4	20.3 ± 1.5 (3)	3.2 - 3.8	25.9 ± 1.8 (3)	1.6 - 1.9
ASP03	20.3 ± 1.9 (3)	3.3 - 3.9	21.1 ± 1.6 (3)	2.7 - 3.5	24.3 ± 2.9 (3)	1.4 - 1.7
TSP07	20.9 ± 2.1 (3)	3.1 - 3.9	22.7 ± 2.1(3)	3.0 - 3.4	30.9 ±5.5 (3)	1.5 - 1.9

Cultures were prepared in ATCC 712 medium (1 x 10⁵ trophozoites/ml) and incubated at the temperatures indicated. Doubling times (means ± SD; number of experiments performed in parenthesis) and maximal cell densities (range) attained within 3 to 4 days are indicated.

^a non-paired *t* test: doubling times at 37 °C significantly lower than at 28 °C (*P* value < 0.05)

Cytophatic effects produced by *Acanthamoeba* conditioned medium

SIRC and HeLa cell monolayers were markedly affected when incubated with medium conditioned by trophozoites (Fig. 2). Cell monolayers were almost completely destroyed by medium conditioned by the

isolates of genotype T17 (ARO01, ARO03, TSP01, ASP03, TMS02, and TSC01), while medium conditioned by *Acanthamoeba* TSP07 (genotype T9) produced an effect comparable to that observed with *A. polyphaga* ATCC 30461, a low virulent keratitis isolate (Visvesvara *et al.* 1975).

Figure 2. In vitro cytopathic effects produced by *Acanthamoeba* conditioned media. SIRC and HeLa cell monolayers were incubated for 18 h at 37 °C with medium conditioned by each of the Brazilian *Acanthamoeba* isolates and by *A. polyphaga* ATCC 30461. Conditioned media were previously diluted in complete DMEM (1: 10%; 2: 25%; 3: 50%) or directly added to cell cultures (4). CT: control cells incubated with non-conditioned DMEM. Cells were fixed and stained with crystal violet

DISCUSSION

Acanthamoeba phylogenies are traditionally based on SSU rRNA gene sequences. Although more sequence data has become available in recent years, we are far from understanding the diversity and evolutionary relationships among the organisms within this genus. Of the seventeen genotypes (T1-T17) identified thus far, four (T7, T8, T9, and T17) accommodate the more rarely examined species of

morphological group I, which form large, star-shaped cysts. Morphological group I comprises relatively few species; it includes two isolates recently assigned to the novel genotype T17, *A. astronyxis* ATCC 30137, *A. tubiashi* ATCC 30867, *A. comandoni* ATCC 30135 (the reference species of genotypes T7, T8, and T9, respectively), and some T7 and T9 environmental isolates (Stothard *et al.* 1998; Lorenzo-Morales *et al.* 2005a-c; Ertabaklar *et al.* 2007; Nuprasert *et al.* 2010).

We report the isolation, axenic culture and characterisation of seven Brazilian environmental *Acanthamoeba* isolates that display morphological features compatible with placement in morphological group I. The trophozoites formed large and star-shaped cysts frequently having 5-7 arms. Considering that the cysts of *A. tubiashi* more frequently have 3 to 4 arms and those of *A. comandoni* 6 to 10 arms (Lewis and Sawyer, 1979; Pussard and Pons, 1977), the new Brazilian isolates are likely most closely related to *A. astronyxis*. However, because cyst size and arm number may vary with growth conditions (Visvesvara and Balamuth, 1975; Stratford and Griffiths, 1978; Page, 1988), morphological parameters are clearly insufficient for distinguishing among morphologically similar species.

Acanthamoeba species are more reliably identified through phylogenetic analyses based on SSU rRNA gene sequences. In this regard, studies on the species of morphological group I have been limited by the small number of isolates and sequences available. The genotypes T7, T8 and T9 were defined on the basis of highly divergent sequences of single species (respectively *A. astronyxis* 30137, *A. tubiashi* 30867, and *A. comandoni* 30135), and genotype T17 was recently identified during the characterisation of two environmental isolates from Thailand (Nuprasert *et al.* 2010). We have sequenced ~1,200-bp fragments of the SSU rRNA genes from the seven new *Acanthamoeba* isolates to infer their genetic relatedness to known *Acanthamoeba* species, particularly those currently assigned to genotypes T7, T8, T9 and T17. Phylogenetic analysis by several different methods placed the seven Brazilian isolates in the robustly supported clade composed of the species of morphological group I and congruently resolved the group I isolates analysed here. *Acanthamoeba* TSP07 clustered with *A. comandoni* 30135, the reference

species of genotype T9, but the other six Brazilian isolates (ASP03, ARO01, TMS02, TSC01, TSP01 and ARO03) clustered with two non-thermotolerant isolates that were recently assigned to the novel genotype T17 (Nuprasert *et al.* 2010). With the inclusion of these six new isolates, genotype T17 now forms a homogeneous (~2.0% sequence divergence), well-supported group of isolates that likely represents a new *Acanthamoeba* species.

Acanthamoeba species of morphological group I have not yet been clearly implicated in human diseases (Lorenzo Morales, 2005a; Khan, 2006), but *A. astronyxis* was tentatively identified as the possible agent of a non-lethal case of human meningitis (Callicott *et al.* 1968). A study by Hadas and Mazur (1993) also indicate the pathogenicity and virulence for mice of a soil-derived isolate characterised as *A. astronyxis*. In contrast to *A. castellanii* and *A. polyphaga*, the more thoroughly investigated species of morphological group II, *A. astronyxis*, *A. comandoni* and *A. tubiashi* are rarely studied. Based on indirect markers of virulence (temperature tolerance, osmotolerance, and cytopathic effects), *A. astronyxis* reference strains (ATCC 30137, ATCC 30901, and CCAP 1534/1) and *A. comandoni* CCAP 1501/5 have been characterised as non-pathogenic (Hurt *et al.* 2003; Khan, 2001; Khan *et al.* 2000, 2002), but some studies indicate the pathogenic potential of environmental *A. astronyxis*-related strains (Lorenzo-Morales *et al.* 2005b, 2005c). Growth of all seven Brazilian *Acanthamoeba* isolates was observed at temperatures up to 40 °C, with the results indicating that three isolates of genotype T17 grow better at 37 °C than at 28 °C. Experiments with mannitol indicated that the Brazilian isolates resist/survive, at least for few days, under hyperosmotic conditions; although high concentrations of mannitol impaired growth and encystment and 1 M mannitol significantly affected

viability, cultures of all isolates could be successfully re-started from cells incubated for 4 days in 1 M mannitol. Additionally, incubation of SIRC and HeLa cells with medium conditioned by trophozoites resulted in pronounced cytopathic effects. Although these results suggest the pathogenicity of the new *Acanthamoeba* isolates, their potential to cause human and/or animal disease is yet to be demonstrated.

The *Acanthamoeba* phylogeny is still incomplete. The genus presently includes the highly divergent species of morphological group I, thus far represented by a small number of ATCC reference species and environmental isolates, seven of which were characterised in this study. Based on the high degree of sequence divergence, the creation of one or more novel genera to accommodate *A. astronyxis*, *A. tubiashi* and *A. comandoni* has been suggested (Stothard *et al.* 1998). We are, however, just beginning to unravel the genetic variability of the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts, and there is hidden diversity yet to be disclosed. The addition of new isolates and new SSU rRNA sequences, preferably combined with studies of other gene markers, will contribute to a better understanding of this group of *Acanthamoeba* isolates. Their phylogenetic relationships with the other species within the genus and their potential pathogenicity remain to be determined.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. S. Jongwutiwes for sending us his SSU sequences before they were available in GenBank and Carmen S. Takata and Marcio M. Yamamoto for their assistance at the sequencing facility. We are indebted to students (Elen G. dos Santos and Katia P. de Azevedo) and many colleagues for their help in sample collection and culture from the very beginning of this project.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported with funds from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil, Grant Nº 2009/53574-9) and CNPq (Brazil). A.C.M.M. received a PhD fellowship grant from CNPq (Brazil).

References

- Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J. Y. and Alizadeh, H. (2002). Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *Journal of Parasitology* 88, 621-623.
- Alfieri, S. C., Correia, C. E. B., Moteji, S. A. and Pral, E. M. F. (2000). Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Journal of Parasitology* 86, 220-227.
- Alves, J. M. P., Gusmão, C. X., Teixeira, M. M. G., Freitas, D., Foronda, A. S. and Affonso, H. T. (2000). Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33, 19-26.
- Bottone, E. J., Perez, A. A., Gordon, R. E. and Qureshi, M. N. (1994). Differential binding capacity and internalisation of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. *Journal of Medical Microbiology* 40, 148-154.
- Callicott Jr., J. H., Nelson, E. C., Jones, M. M., dos Santos, J. G., Utz, J. P., Duma, R. J. and Morrison Jr., J. V. (1968). Meningoencephalitis due to pathogenic free-living amoebae: report of two cases. *Journal of the American Medical Association* 206, 579-582.
- Clarke, D. W. and Niederkorn, J. Y. (2006). The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends in Parasitology* 22, 175-180. doi: 10.1016/j.pt.2006.02.004.
- Corsaro, D. and Venditti, D. (2010). Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitology Research* 107, 233-238. doi: 10.1007/s00436-010-1870-6.
- De Moraes, J. and Alfieri, S. C. (2008). Growth, encystment, and survival of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 66, 221-229. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00594.x.
- Ertabaklar, H., Türk, M., Dayanir, V., Ertug, S. and Walochnick, J. (2007). *Acanthamoeba* keratitis due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitology Research* 100, 241-246. doi: 10.1007/s00436-006-0274-0.
- Gast, R. J. (2001). Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 609-615. doi: 10.1111/j.1550-7408.2001.tb00199.x.

- Gast, R. J., Ledee, D. R., Fuerst, P. A. and Byers, T. J. (1996). Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43, 498–504. doi: 10.1111/j.1550-7408.1996.tb04510.x.
- Hadas, E. and Mazur, T. (1993). Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Tropical Medicine and Parasitology* 44, 197–200.
- Hewett, M. K., Robinson, B. S., Monis, P. T. and Saint, C. P. (2003). Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozoologica* 42, 325–329.
- Horn, M. T., Fritsche, R. K., Gautom, K. H., Schleifer, A. and Wagner, M. (1999). Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environmental Microbiology* 4, 357–367. doi:10.1046/j.1462-2920.1999.00045.x.
- Huelsenbeck, J. P. and Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755. doi: 10.1093/bioinformatics/17.8.754.
- Hurt, M., Neelam, S., Niederkorn, J. and Alizadeh, H. (2003). Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. *Infection and Immunity* 71, 6243–6255. doi: 0.1128/IAI.71.11.6243-6255.2003.
- Ibrahim, Y. W., Boase, D. L. and Cree, I. A. (2007). Factors affecting the epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmic Epidemiology* 14, 53–60. doi: 10.1080/09286580600920281.
- Khan, N. A. (2001). Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology* 43, 391–395.
- Khan, N. A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 564–595. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x.
- Khan, N. A. (2008). *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. *Journal of Medical Microbiology* 57, 1051–1057. doi: 10.1099/jmm.0.2008/000976-0.
- Khan, N. A., Jarroll, E. L., Panjwani, N., Cao, Z. and Paget, T. A. (2000). Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2858–2861.
- Khan, N. A., Jarroll, E. L. and Paget, T. A. (2002). Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Current Microbiology* 45, 197–202. doi: 10.1007/s00284-001-0108-3.
- Kilvington, S., Beeching, J. R. and White, D. G. (1991). Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 310–314.
- Lewis, E. J. and Sawyer, T. K. (1979). *Acanthamoeba tubiashi* n. sp., a new species of fresh-water amoebida (Acanthamoebida). *Transactions of the American Microscopy Society* 98, 543–549.
- Lorenzo-Morales, J., Lindo, J. F., Martinez, E., Calder, D., Figueruelo, E., Valladares, B. and Ortega-Rivas, A. (2005a). Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 99, 751–758. doi: 10.1179/136485905X65215.
- Lorenzo-Morales, J., Monteverde-Miranda, C. A., Jiménez, C., Tejedor, M. L., Valladares, B. and Ortega-Rivas, A. (2005b). Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Annals of Agricultural Environmental Medicine* 12, 233–236.
- Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martínez, E. and Valladares, B. (2005c). Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Research* 95, 273–277. doi: 10.1007/s00436-005-1301-2.
- Marciano-Cabral, F. and Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 273–307. doi: 10.1128/CMR.16.2.273-307.2003.
- Magliano, A. C., Maia da Silva, F., Teixeira, M. M. and Alfieri, S. C. (2009). Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. *Experimental Parasitology* 12, 231–235. doi: 10.1016/j.exppara.2009.07.006.
- Mazur, T., Hadas, E. and Iwanicka, L. (1995). The duration of the cyst stage and viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Tropical Medicine and Parasitology* 46, 106–108.
- Nuprasert, W., Putapornpit, C., Pariyakanok, L. and Jongwutiwes, S. (2010). Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 4636–4640. doi:10.1128/JCM.01090-10.
- Page, F. C. (1988). *A new key to fresh water and soil gymnamoeba*. Culture Collection of Algae and Protozoa, Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, England.
- Pussard, M. and Pons, R. (1977). Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* 13, 557–610.
- Ray, D. L. and Hayes, R. E. (1954). *Hartmannella astronyxis*: a new species of free-living ameba. *Journal of Morphology* 95, 159–188.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.
- Sriram, R., Shoff, M., Booton, G., Fuerst, P. and Visvesvara, G. S. (2008). Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 4045–4048. doi: 10.1128/JCM.01903-08..
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPc: maximum likelihood-based Phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688– 2690. doi: 10.1093/bioinformatics/btl446.

- Stothard, D. R., Schroeder-Diedrich, J. M., Awwad, M. H., Gast, R. J., Ledee, D. R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C. L., Fuerst, P. A. and Byers, T. J. (1998). The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45, 45-54. doi: 10.1111/j.1550-7408.1998.tb05068.x
- Stratford, M. P. and Griffiths, A. J. (1978). Variations in the properties and morphology of cysts of *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of General Microbiology* 108, 33-37.
- Swofford, D.L. (1998). *PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Version 4.0b10a. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S. P. and Maillard, J. Y. (2010). Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 231-259. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00190.x.
- Visvesvara, G. S. and Balamuth, W. (1975). Comparative studies on related free-living and pathogenic amebae with special reference to *Acanthamoeba*. *Journal of Protozoology* 22, 245-256.
- Visvesvara, G.S., Jones, D.B. and Robinson, N.M. (1975). Isolation, identification, and biological characterization of *Acanthamoeba polyphaga* from a human eye. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24, 784-790.
- Weekers, P. H., Bodelier, P. L. E., Wijen, J. P. H. and Vogels, G. D. (1993). Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2317-2319.