

Título em Português:

Amebas de Vida Livre: elaboração da ferramenta de visualização PVT e identificação de Naegleria spp. e Acanthamoeba spp. no Rio Monjolinho em São Carlos - SP

Título em Inglês:

free-living amoeba: development of the visualization tool pvt and identification of naegleria spp. and acanthamoeba spp. in the monjolinho river in são carlos - sp

Autor:

Matheus Issa

Instituição:

Universidade de São Paulo

Unidade:

Instituto de Física de São Carlos

Orientador:

Otávio Henrique Thiemann

Área de Pesquisa / SubÁrea:

Genética Molecular e de Microorganismos

Agência Financiadora:

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

AMEBAS DE VIDA LIVRE: ELABORAÇÃO DA FERRAMENTA DE VISUALIZAÇÃO PVT E IDENTIFICAÇÃO DE *NAEGLERIA* SPP. E *ACANTHAMOEBA* SPP. NO RIO MONJOLINHO EM SÃO CARLOS - SP

Matheus Issa

Natália Karla Bellini, Douglas Cedrim Oliveira

Otávio Henrique Thiemann

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo

matheus.issa@usp.br

Objetivos

O presente projeto tem, por objetivo, realizar a análise e a caracterização molecular de Amebas de Vida Livre (AVL), com ênfase em *Naegleria* spp. e *Acanthamoeba* spp. passíveis de serem detectadas em 5 pontos de coleta do Rio Monjolinho (sítios A, B, C, D e E) [1]. De forma complementar ao tratamento molecular, deseja-se estruturar e implementar uma ferramenta de visualização computacional baseada no guia de classificação taxonômica Page, de 1988 (PVT, do inglês *Page's Key Visualization Tool*), de maneira a aprimorar as técnicas utilizadas nas análises morfológicas (atualmente baseadas na consulta manual ao Page).

Métodos e Procedimentos

Para a realização do presente projeto, duas abordagens são feitas: uma molecular e outra computacional. A primeira, que compreende o estudo de *Naegleria* spp. e *Acanthamoeba* spp. a nível restrito ao gênero, consiste na extração inicial do DNA genômico de amostras cultivadas em placas NNA (Non Nutrient Agar), obtidas da água já processada extraída dos sítios de coleta delimitados, e posterior amplificação baseada em reações em cadeia da polimerase (PCR). Os produtos dessa

reação são submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, purificados e parte deles são clonados, enquanto a outra parte é usada para sequenciamento direto pelo método de Sanger. Cada produto de ligação é transformado em bactérias *Escherichia coli* quimiocompetentes e, obtendo-se o crescimento das colônias, é realizada a extração de DNA plasmidial para posterior sequenciamento, também pelo método de Sanger. Com os resultados adquiridos, faz-se o alinhamento a partir de ferramentas bioinformáticas BLAST e, com a base de dados GenBank, efetua-se a comparação com as sequências já catalogadas, o que leva à efetiva identificação das espécies de AVL encontradas em cada uma das amostras.

A segunda, por sua vez, baseia-se na organização sistemática das informações contidas na chave de classificação taxonômica Page (1988) [2]. Assim, reúne-se tal conteúdo, bem como os parâmetros específicos de gênero, em tabelas, de forma a colocar as espécies nas linhas e as respectivas características nas colunas. Com esses dados, a partir de técnicas de visualização multidimensional, constrói-se um modelo rápido e interativo de coordenadas paralelas para que, dessa forma, seja possível a classificação em gênero e espécie da ameba de interesse de maneira otimizada.

Resultados

A análise molecular feita permitiu, até o presente momento, a identificação de duas espécies do gênero *Naegleria*: *N. philippinensis* e *N. australiensis*, conforme mostrado na Figura 1 e na Tabela 1.

Devido ao fato do projeto ainda estar em sua fase inicial, a análise computacional ainda está na etapa de desenvolvimento e de tabulação dos dados.

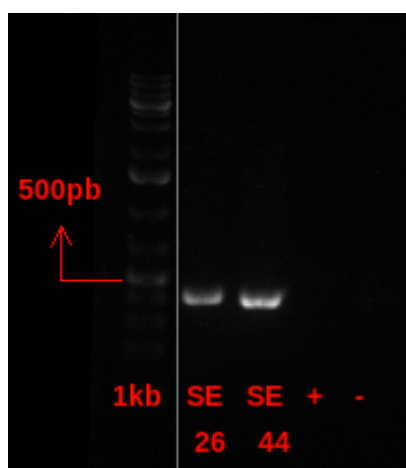


Figura 1: Eletroforese em gel para amostras do sítio E a 26 e 44 °C (comparação com 1 Kb Plus DNA Ladder).

Tabela 1: Resultados obtidos para análise molecular do sítio E.

Sítio	Comprimento do fragmento (pb) - identidade (%), Match do BLASTn e nº de acesso
SE26	405 pb – 99,26%, <i>N. philippinensis</i> AY033618.1
SE44	405 pb – 99,26%, <i>N. philippinensis</i> AY033618.1

Conclusões

A detecção amebiana obtida no sítio de coleta E do Rio Monjolinho é um indício de que outras espécies possam estar presentes nos demais pontos do rio. Isso reforça a necessidade de continuar a investigação proposta e, assim,

possibilitar o mapeamento ambiental desejado após a realização de toda a análise. Além disso, a partir da implementação do PVT, a análise molecular empregada pode ser complementada pela morfológica mediada pelo software em questão, fornecendo, assim, duas fontes de identificação microbiana que contribuem conjuntamente para o resultado final.

Referências Bibliográficas

- [1] BELLINI, N. K. et al. Isolation of *Naegleria* spp. from a Brazilian water source. **Pathogens**, v. 9, n. 2, p. 90, 2020.
- [2] PAGE, F.C. **A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae: With Instructions for Culture**. [s.l.]: Freshwater Biological Association, 1988. (Culture Collection of Algae and Protozoa).

FREE-LIVING AMOEBA: DEVELOPMENT OF THE VISUALIZATION TOOL PVT AND IDENTIFICATION OF *NAEGLERIA* SPP. AND *ACANTHAMOEBA* SPP. IN THE MONJOLINHO RIVER IN SÃO CARLOS - SP

Matheus Issa

Natália Karla Bellini, Douglas Cedrim Oliveira

Otávio Henrique Thiemann

São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo

matheus.issa@usp.br

Objectives

This project aims to carry out the analysis and molecular characterization of Free-Living Amoebas (FLA), emphasising *Naegleria* spp. and *Acanthamoeba* spp. that are likely to be detected at 5 collection points from Monjolinho River (sites A, B, C, D and E) [1]. As a complement to the molecular approach, the purpose is to structure and implement a computational visualization tool based on the taxonomic classification guide Page, from 1988 (Page's Key Visualization Tool - PVT), in order to improve the techniques used in morphological analysis (currently based on the manual query to Page).

Materials and Methods

To carry out this project, two approaches are taken: one molecular and the other computational. The first, which comprises the study of *Naegleria* spp. and *Acanthamoeba* spp. at the genus-restricted level, consists of an initial extraction of genomic DNA from samples grown on NNA plates (Non Nutrient Agar), obtained from processed water extracted from the delimited sampling sites, and subsequent amplification based on polymerase chain reactions (PCR). The products of this reaction are submitted to electrophoresis in a 1.5% agarose gel, purified and part of them are

cloned, while the other part is used for direct sequencing by the Sanger method. Each ligation product is transformed into chemocompetent *Escherichia coli* bacteria and, once the colonies have grown, plasmid DNA extraction is performed for subsequent sequencing, also using the Sanger method. With the acquired results, the alignment is made using BLAST bioinformatics tools and, with the GenBank database, the comparison is made with the already cataloged sequences, which leads to the effective identification of the FLA species found in each of the samples.

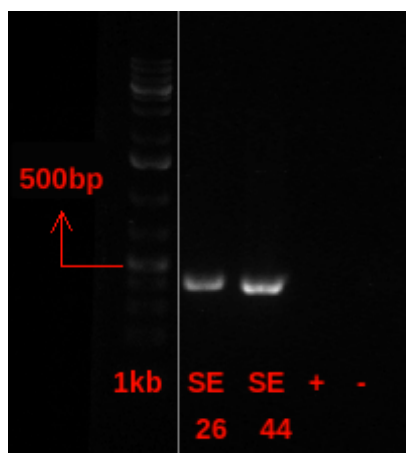
The second, on the other hand, is based on the systematic organization of the information contained in the taxonomic classification key Page (1988) [2]. Thus, this content is gathered, as well as the specific parameters of the genus, in tables, in order to place the species in the rows and the respective characteristics in the columns. With these data, using multidimensional visualization techniques, a fast and interactive model of parallel coordinates is built so that, in this way, it is possible to optimally classify the amoeba of interest into genus and species.

Results

The molecular analysis performed so far has allowed the identification of two species of the genus *Naegleria*: *N. philippinensis* and *N.*

australiensis, as shown in Picture 1 and Table 1.

Due to the fact that the project is still in its initial phase, the computational analysis is still in the development stage and data tabulation.



Picture 1: Gel electrophoresis for samples of site E at 26 and 44 °C (in comparison to 1 Kb Plus DNA Ladder).

Table 1: Results obtained for molecular analysis of the sampling site E.

Site	Fragment length (bp) - identity (%), BLASTn match and accession number
SE26	405 bp – 99,26%, <i>N. philippinensis</i> AY033618.1
SE44	405 bp – 99,26%, <i>N. philippinensis</i> AY033618.1

Conclusions

The amoebic detection obtained at sampling site E of Monjolinho River is an indication that other species may exist in other parts of the river. This strengthens the need to continue the proposed investigation and, thus, enable the desired environmental mapping after carrying out the entire analysis. Furthermore, from the implementation of the PVT, the molecular analysis employed can be complemented by the morphological analysis mediated by the

software in question, thus providing two sources of microbial identification that jointly contribute to the final result.

References

- [1] BELLINI, N. K. et al. Isolation of *Naegleria* spp. from a Brazilian water source. **Pathogens**, v. 9, n. 2, p. 90, 2020.
- [2] PAGE, F.C. **A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae: With Instructions for Culture**. [s.l.]: Freshwater Biological Association, 1988. (Culture Collection of Algae and Protozoa).