

João Marcelo Pereira Alves

Caracterização e Filogenia Moleculares  
de *Acanthamoeba*

Tese apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade  
de São Paulo para obtenção do título  
de Doutor em Ciências

Área de concentração: Biologia da  
Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Maria Heloiza  
Trebilcock Affonso

São Paulo

2.001

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

---

Alves, João Marcelo Pereira.

Caracterização e filogenia moleculares de *Acanthamoeba* / João Marcelo Pereira Alves. -- São Paulo, 2001.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Parasitologia.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Linha de pesquisa: Biologia Molecular de amebas de vida livre.

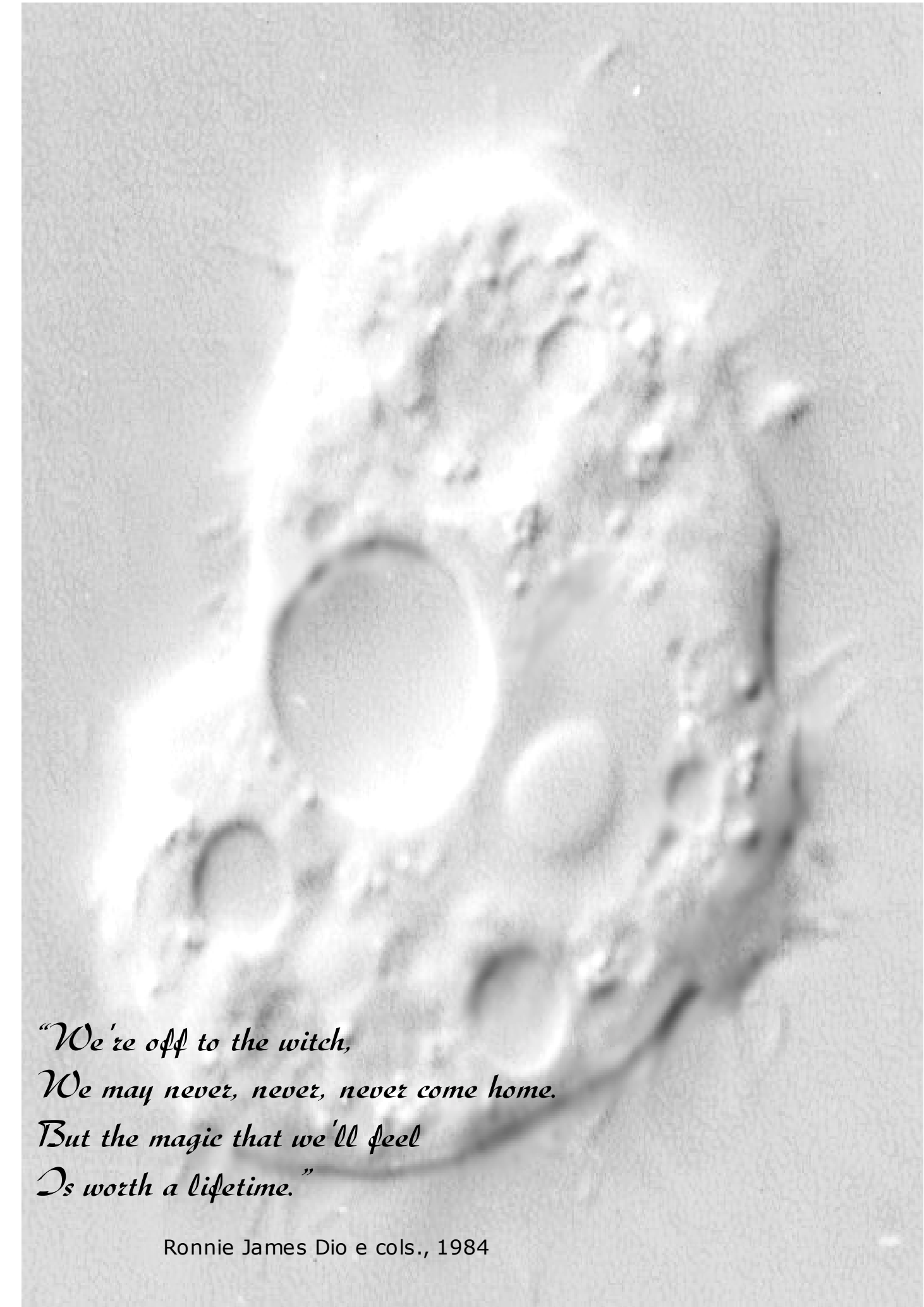
Orientador: Affonso, Maria Heloiza Trebilcock.

Versão do título para o inglês: Molecular characterization and phylogeny of *Acanthamoeba*.

Descritores: 1. *Acanthamoeba* 2. Filogenia 3. Identificação de organismo 4. RNA ribossômico 5. Sequenciamento de DNA

*ICB/SBIB053/2001*

---



*"We're off to the witch,  
We may never, never, never come home.  
But the magic that we'll feel  
Is worth a lifetime."*

Ronnie James Dio e cols., 1984

## Prefácio

“Esta tese foi elaborada de acordo com as Normas da CPG/ICB relativas a outras formas de elaboração de tese de doutorado que permitem a inclusão, como Anexos, de resultados já publicados em periódicos internacionais indexados em língua inglesa. Permite ainda que detalhes metodológicos e resultados obtidos sejam aqueles contidos nos artigos anexados ao corpo da tese.

Artigos que compõe o corpo da tese:

Anexo 1 – Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. Alves, J. M. P., Gusmão, C. X., Teixeira, M. M. G., Freitas, D., Foronda, A. S. & Affonso, H. T. (2.000) **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **33**: 19-26.

Anexo 2 – Genus *Acanthamoeba*: parity among random amplified polymorphic DNA, total DNA and SSU rDNA restriction length polymorphism patterns for the grouping and characterization of Brazilian keratitis isolates. Alves, J. M. P., Saba, M. M. F., Teixeira, M. M. G. & Affonso, H. T. (Manuscrito em preparação).

Este trabalho teve o apoio financeiro de CNPq e FAPESP

Dedico este trabalho a

**José Bento Monteiro Lobato** (1882 – 1948) e **Carl Sagan** (1934 – 1996),

por terem me tornado, quase 20 anos atrás, um viciado em leitura e ciência.

Suas obras e idéias são responsáveis por boa parte do que sou.

## **Agradeço**

Aos meus pais, João e Darci, sem os quais absolutamente nada em minha vida teria sido possível. Não lhes dedico meu trabalho por que a eles dedico toda minha vida;

Às minhas irmãs Geiza e Syntia, à minha avó Ernesta e ao Bendj por constituírem uma família perfeita, com todas suas qualidades e defeitos;

À Prof.a. Dra. Maria Heloiza Trebilcock Affonso, cujos orientação, amizade, paciência (*quase sempre...*), confiança, brigas, convivência e etc. tornaram os últimos sete anos muito mais construtivos e agradáveis;

À Prof.a. Dra. Marta Maria Geraldtes Teixeira, pela contínua colaboração e co-orientação em qualquer aspecto do trabalho e por nos acolher tão bem em seu laboratório;

Aos Profs. Drs. Luiz R. Nunes e Regina L. C. Oliveira, do Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes, cuja colaboração foi imprescindível para a finalização deste trabalho;

Aos vários professores (da Parasito, Bio, EPM, etc.), que muito ajudaram com ensinamentos, orientação, colaboração e amizade, em especial os Profs. Drs. Carlos E. Winter, Jeffrey J. Shaw e Lucile M. F. Winter (cujo laboratório foi o primeiro onde estivemos instalados, lá atrás em 1.992);

Ao Prof. Dr. Jeffrey J. Shaw por ter gentilmente cedido sua cópia do PAUP\* para Windows (sem a qual boa parte das análises teria ficado apenas no nível hipotético) e por me proporcionar experiência, primeiro como aluno e, depois, como monitor informal em parte do seu curso de filogenia;

Aos Srs. Wolfgang Fischer, Heribert Pickart, Manoel A. Peres e à Sra. Márcia de Oliveira Rocha pelo valioso auxílio técnico prestado em diversas fases e aspectos deste trabalho;

Aos inúmeros colegas que passaram pelo laboratório de *Acanthamoeba* ao longo de todos estes anos, em especial aos amigos Cléber X. Gusmão, Lúcia M. Lopes e Dalva M. Hashimoto;

Aos amigos Myrna G. Serrano, Rogéria M. Ventura, Adriana R. Fuzato, Flávia M. Silva, Alane P. C. Zahar, Robson Ferreira, Carmen S. Takata e Marta Campaner pela fervilhante troca de idéias, por me fazer sentir sempre “em casa” em seu laboratório e por tornar meu cotidiano muito mais divertido; Ah, Myrna, valeu pela idéia que resultou no meu primeiro programinha de biocomputação! (pensou que eu iria esquecer a promessa?);

Às dezenas de alunos de vários laboratórios do departamento com quem convivi, responsáveis por tornar a Parasito um lugar a ser lembrado com carinho;

Ao pessoal da turma Bio-92 e “agregados”, muitos amigos para toda a vida. Em especial, mio caro fratello Luís F. Mucci (Luiggi);

À K., por ter me ensinado tanto em tão pouco tempo;

Aos diversos escritores, de ficção ou não, cujas influências sobre mim não podem ser subestimadas. Sem falar nas infinitas horas de diversão, claro;

Aos diversos músicos do rock, ídolos ou companheiros de banda (Rising Sun will never set!), sem os quais minha sobrevivência no mundo dos mentalmente sãos seria absolutamente impossível. E, especialmente, aos insuperáveis Johann S. Bach e Ludwig van Beethoven – nada pode ir mais alto;

Aos órgãos financiadores CNPq e FAPESP, por manter o laboratório, seus projetos e bolsistas durante todos esses anos;

A todos que ajudaram, de qualquer forma, mas não foram citados aqui por falha minha. E, principalmente, aos que não atrapalharam;

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



## ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumo	4
Abstract	6
<hr/>	
<b>1. Introdução</b>	<b>8</b>
1.1 O gênero <i>Acanthamoeba</i>	8
1.1.1 Morfologia, ecologia e ciclo de vida	9
1.1.2 Patologias associadas	12
1.1.2.1 Encefalite amebiana granulomatosa (GAE)	12
1.1.2.2 Ceratite crônica	12
1.1.3 Genes ribossômicos em <i>Acanthamoeba</i> e sua utilização em sistemática	16
1.1.4 Taxonomia	18
1.2 Evolução, filogenia e dados moleculares	20
1.2.1 A natureza do pensamento evolutivo	20
1.2.2 A síntese evolutiva	24
1.2.3 Inferência filogenética	24
1.2.4 Métodos moleculares em sistemática	29
1.2.4.1 Métodos baseados em distâncias	33
1.2.4.2 Métodos baseados no princípio da parcimônia	37
1.2.4.3 Máxima verossimilhança e modelos de evolução molecular	39
1.2.5 Exame da robustez e confiabilidade das filogenias	45
1.2.6 Os conceitos de espécie	46
1.3 Objetivos	48
<hr/>	
<b>2. Material e Métodos</b>	<b>49</b>
2.1 Organismos e cultivo	49
2.1.1 Cepas referência da ATCC	49
2.1.2 Cepas isoladas de casos de úlcera de córnea humana	49
2.2 Extração de DNA genômico total	50
2.2.1 Reações de amplificação aleatória de DNA polimórfico	50
2.2.2 Clivagem do DNA genômico total por endonucleases de restrição	51
2.3 Construção dos oligonucleotídeos para PCR e seqüenciamento	52
2.4 Reações de amplificação por PCR e purificação dos produtos	55
2.5 Clivagem por enzimas de restrição dos produtos de PCR	56
2.6 Cálculo das estimativas de distâncias genéticas entre os isolados	57
2.7 Reações de seqüenciamento do SSU rDNA em termociclador	58

2.8 Alinhamento das seqüências do SSU rDNA de <i>Acanthamoeba</i>	58
2.9 Análise filogenética do SSU rDNA de <i>Acanthamoeba</i>	59
2.9.1 Análises de distância	59
2.9.2 Análises de parcimônia	61
2.9.3 Análises de máxima verossimilhança	62
<hr/>	
<b>3. Resultados e Discussão</b>	68
3.1 Amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD)	68
3.2 RFLP de DNA genômico total	69
3.3 RFLP do SSU rDNA	72
3.4 Determinação da seqüências do SSU rDNA	76
3.5 Análises filogenéticas	78
3.5.1 Alinhamento e determinação do tipo de seqüência do SSU rDNA	78
3.5.2 Conceitos de espécie	123
3.5.2.1 Conceitos reprodutivos	123
3.5.2.2 Conceito ecológico	123
3.5.2.3 Conceito evolutivo	125
3.5.2.4 Conceito filogenético ou cladístico	126
3.5.2.5 Conceito de coesão	127
3.5.2.6 A situação das espécies em <i>Acanthamoeba</i>	128
3.5.3 Determinação do modelo evolutivo disponível mais adequado para o alinhamento do SSU rDNA	129
3.5.4 Construção das árvores filogenéticas	136
3.5.4.1 Análises de distância	139
3.5.4.2 Procura de árvores ótimas por parcimônia	144
3.5.4.3 Análises de verossimilhança das árvores obtidas e procura da árvore de ML para um alinhamento parcial	150
<hr/>	
<b>4. Conclusões</b>	157
<hr/>	
<b>5. Referências bibliográficas</b>	159
<hr/>	
Anexo 1 – Trabalho publicado	
Anexo 2 – Manuscrito em preparação	
<hr/>	

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

