

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MATHEUS ISSA

**Elaboração da ferramenta de visualização computacional PVT
para Amebas de Vida Livre**

São Carlos

2022

MATHEUS ISSA

**Elaboração da ferramenta de visualização computacional PVT para
Amebas de Vida Livre**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Física de São Carlos da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Físicas e
Biomoleculares.

Orientador: Prof. Dr. Otavio Henrique
Thiemann

São Carlos
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Issa, Matheus

Elaboração da ferramenta de visualização computacional PVT para Amebas de Vida Livre / Matheus Issa; orientador Otávio Henrique Thiemann -- São Carlos, 2022.

27 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Físicas e Biomoleculares) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Amebas de Vida Livre. 2. Pages Visualization Tool.
3. Coordenadas paralelas. I. Thiemann, Otávio Henrique,
orient. II. Título.

RESUMO

Amebas de Vida Livre (AVL) são microrganismos protistas amplamente encontrados na natureza, grande parte deles vivendo livremente no ambiente e tendo importante papel no ecossistema microbiano. Entretanto, alguns gêneros são, também, parasitas oportunistas facultativos, como é o caso de *Naegleria* spp. e *Acanthamoeba* spp.. Tais espécies normalmente causam infecções associadas ao Sistema Nervoso Central (SNC) e sua rápida progressão leva os pacientes a óbito. No Brasil, os estudos desses microrganismos são bastante escassos, inexistindo um mapeamento de sua dispersão por todo o território, tornando-se um risco para a população. Um dos fatores que contribuem para a manutenção dessa situação é a não otimização das análises morfológicas hoje realizadas, visto que elas são embasadas na pesquisa manual em chaves de classificação taxonômica, dificultando o processamento eficiente das amostras pesquisadas. Sendo assim, o presente trabalho visou construir um robusto banco de dados contendo todas as espécies e suas respectivas características morfológicas a partir do guia de classificação Page (1988) e, com isso, elaborar uma ferramenta computacional de visualização denominada *Page's Visualization Tool* (PVT). Para alcançar esse objetivo, foram organizadas sistematicamente e tabuladas as descrições morfológicas das diferentes amebas presentes no guia para que, uma vez completo o banco de dados, ele pudesse servir como cerne para o desenvolvimento do software, a partir da aplicação das técnicas de visualização multidimensional de coordenadas paralelas. O trabalho contou com a colaboração dos pesquisadores Dra. Natália Karla Bellini e Prof. Dr. Douglas Cedrim Oliveira. A análise refinada do banco de dados permitiu a constatação de que as informações acerca dos três estágios de vida das AVLs são fundamentais para a efetiva distinção morfológica entre as espécies, sendo as do estágio de trofozoíto as mais gerais e completas, especialmente na ausência de características dos estágios encistado e flagelado ou presença de poucas delas. Os dados relacionados aos cistos são essenciais para a diferenciação de espécies quando há uma plena descrição dos mesmos, ao passo que os associados às formas flageladas se tornam cruciais quando os de cistos não são totalmente suficientes. Em contrapartida, informações complementares que descrevem meios de cultura, dispersão geográfica, estilo de vida e temperatura de crescimento não apresentam alta significância, acrescentando especificações únicas para poucas espécies. As características das espécies que produzem corpo de frutificação, por sua vez, têm sua devida relevância por diferenciar a ordem Acrasida das demais. Em posse dessas informações e do banco de dados, a aplicação das técnicas computacionais para uma análise preliminar permitiu a construção de uma interface interativa

para o software PVT, de modo a possibilitar que o usuário insira manual e rapidamente as características observadas por microscopia em suas amostras e consiga obter, no melhor dos casos, a espécie estudada ou pelo menos o gênero a qual ela pertence. Sendo assim, a efetividade do processo permite explorar a potencialidade da ferramenta em aperfeiçoar a metodologia hoje empregada para o estudo das morfologias de AVLs e cria espaço para que informações mais recentes e modernas complementem futuramente esse banco de dados, além de estimular futuras pesquisas no tema.

Palavras-chave: Amebas de Vida Livre. *Page's Visualization Tool*. Coordenadas paralelas.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Tabulação dos dados morfológicos do Page	11
3.2 Construção do software PVT	12
4 RESULTADOS	15
4.1 Banco de dados do PVT	15
4.2 Software PVT	19
5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

Amebas de Vida Livre (AVLs) são microrganismos eucariontes unicelulares pertencentes ao Reino Protista e que, por não requererem um organismo hospedeiro para sua sobrevivência, podem ser encontrados livres globalmente em diversos ambientes, como no solo, ar, água (tanto de piscinas quanto de rios), poeira, esgoto, ou em unidades de tratamento dentário, unidades de diálise, estações de lavagem de olhos e lentes de contato. As AVLs se alimentam majoritariamente de bactérias e, de forma secundária, de algas, fungos e até outros protozoários de menor tamanho. (1-4)

Dentro do vasto universo destes microrganismos protistas, pertencentes ao filo Rhizopoda, alguns deles, por compartilharem características morfológicas semelhantes, podem ser incluídos em grupos taxonômicos bastante amplos. Amebas, marinhas, de água doce ou terrestres, que não apresentam concha interna (testa), não esporulam e possuem estruturas locomotoras largas (pseudópodos lobosos) podem ser reunidas no grupo polifilético Gymnamoebae. Este grupo abriga as classes Heterolobosea, contendo as famílias Acrasidae, Gruberellidae, Guttulinopsidae e Vahlkampfiidae, Caryoblastea, contendo a família Pelomyxidae, e Lobosea, contendo as famílias Acanthamoebidae, Amoebidae, Cochliopodiidae, Echinamoebidae, Flabellulidae, Gephyramoebidae, Thecamoebidae, Hartmannellidae, Hyalodiscidae, Leptomyxidae, Paramoebidae, Vannellidae, Vexilliferidae, bem como alguns gêneros com relações familiares incertas, como é o caso de *Dinamoeba* e *Phretamoeba*. (5-6)

Embora de vida livre, as AVLs possuem características anfizoicas e, portanto, podem ser parasitas oportunistas facultativos, classificação essa que compreende um pequeno grupo de espécies. Dentre elas, há aquelas que apresentam alta patogenicidade, podendo acometer seres humanos e demais vertebrados e causar infecções letais no Sistema Nervoso Central (SNC), além de infecções cutâneas, renais, oculares e até pulmonares. Nesse sentido, pode-se mencionar o gênero *Acanthamoeba* (família Acanthamoebidae), com o maior número de espécies patogênicas, além de outros gêneros, como *Naegleria* (família Vahlkampfiidae) e *Sappinia* (família Thecamoebidae), cujos representantes letais são, respectivamente, *N. fowleri* e *S. diploidea*. (3,9) As encefalites causadas por amebas, por estarem associadas ao SNC, apresentam uma evolução clínica rápida, levando o paciente a óbito em pouco tempo e dificultando o diagnóstico precoce. Visto que essas enfermidades possuem sintomas muito semelhantes aos de encefalites e meningites de etiologia bacteriana, o tratamento, por muitas

vezes, é feito de forma equivocada, com o uso de antibióticos e antifúngicos na tentativa de combatê-las. Como o estudo dessas doenças ainda é escasso, não existe um tratamento específico nem um diagnóstico preciso, já que os sintomas acabam se restringindo a náuseas, febre, rigidez no pescoço, dores de cabeça e musculares, mudança de comportamento, dentre outros (3,8-9), facilmente confundidos com outras patogenias.

Atualmente, a América do Sul apresenta pouca informação sobre a dispersão das espécies de AVL em seu território. Países como o Brasil, que possuem grandes reservatórios de água doce, tornam-se cenários propícios para a presença significativa dessas amebas. Isso, somado ao constante uso para recreação e consumo dessa água, aumenta o potencial de emergências de saúde pública ocorrerem, justificando a necessidade de maiores pesquisas associadas a essa temática. (10-11)

Além disso, o estudo morfológico de Amebas de Vida Livre é embasado, atualmente, na comparação de características morfológicas observadas ao microscópio óptico com dados presentes na literatura. O método mais utilizado se baseia no guia de classificação por chaves taxonômicas “A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae,” de 1988, escrito pelo protozoologista estadunidense Frederick C. Page. (5) Sua extensa e detalhada descrição de diversos gêneros e espécies permite seu reconhecimento, baseado em imagens de microscopia ou demais técnicas de imageamento. No entanto, esse processo não é otimizado, já que o guia não dispõe as informações de maneira rápida e interativa, tomando um longo tempo de análise e de trabalho de observação e, assim, dificultando ainda mais uma identificação rápida e precisa desses organismos.

Tendo em vista as questões abordadas, o presente projeto teve, por objetivo, elaborar um mecanismo de otimização das análises de microscopia das AVLs, desenvolvendo, para isso, um programa de visualização por chaves taxonômicas denominado PVT (do inglês, *Page's Visualization Tool*). Ele consiste na organização sistemática do conteúdo morfológico presente no guia Page (1988) para criar um software de coordenadas paralelas por meio de técnicas de dados multivariados e geometria de alta dimensão. (12-13) Esta implementação fornece uma ferramenta computacional inovadora para análise de dados e classificação de AVLs que permitirá um significativo avanço na identificação desses microrganismos em amostras ambientais e, até mesmo, clínicas, bem como estimulará pesquisas futuras no tema.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem, por objetivo, construir, de maneira sistemática e ordenada, um banco de dados robusto contendo todas as características de Amebas de Vida Livre para cada uma das espécies descritas no guia de classificação por chaves taxonômicas “A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae” (1988), de Frederick C. Page, visando empregar uma refinada análise para elencar as informações essenciais para a classificação e distinção desses microrganismos. Com isso, possibilita-se o desenvolvimento de uma ferramenta computacional de visualização, denominada *Page's Visualization Tool* (PVT), com o intuito de elaborar um mecanismo capaz de aperfeiçoar os estudos morfológicos de AVLs atuais, os quais se baseiam na pesquisa e leitura manual do guia de classificação e, portanto, não são otimizados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 1 abaixo esquematiza, de forma global e resumida, a metodologia e os procedimentos empregados para a construção da ferramenta de visualização PVT, bem como sua aplicação prática.

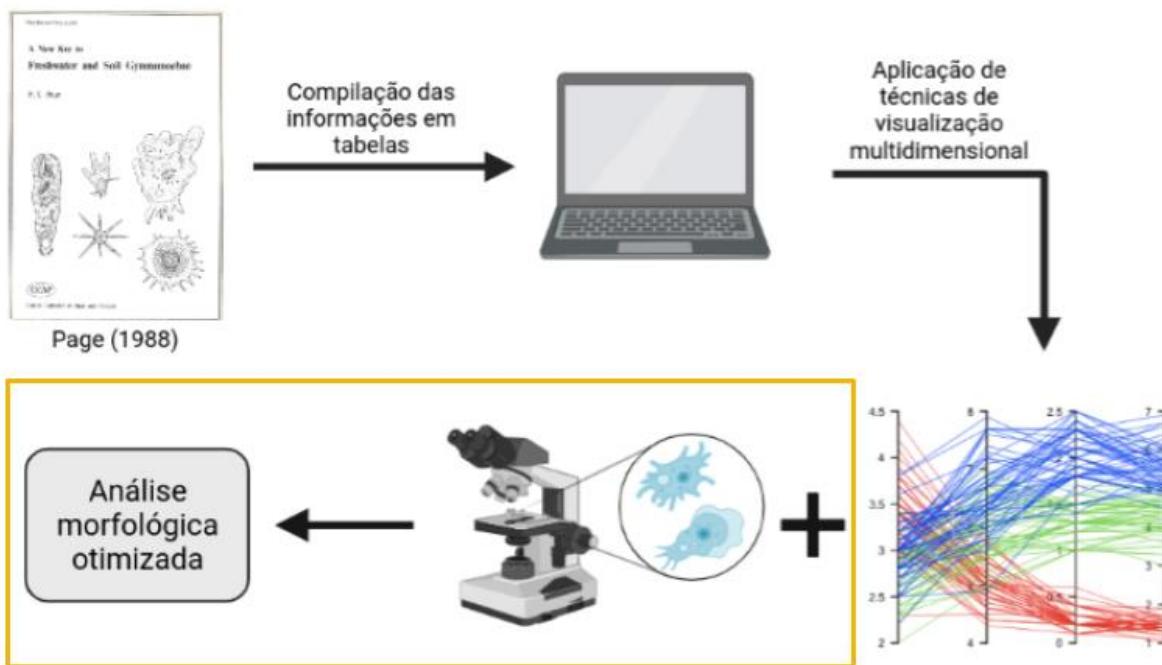


Figura 1 - Representação esquemática dos procedimentos empregados para a construção do PVT e de sua aplicação nas análises morfológicas (destacado em amarelo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o desenvolvimento da ferramenta PVT, o trabalho contou com a colaboração da Dra. Natália Karla Bellini, do Instituto Butantan, para a execução da primeira etapa representada no esquema da Figura 1 (tabulação e revisão dos dados do guia Page) e do Prof. Dr. Douglas Cedrim Oliveira, do Instituto Federal Goiano (IF Goiano), para a execução da segunda etapa (aplicação das técnicas de visualização multidimensional a partir do banco de dados gerado).

3.1 Tabulação dos dados morfológicos do Page

A elaboração da ferramenta computacional *Page's Visualization Tool* (PVT) se iniciou a partir da construção de um banco de dados organizando, sistematicamente, as descrições morfológicas para cada uma das espécies abordadas nas chaves de classificação do Page (1988) (5) e as reunindo em tabelas, conforme representado na Figura 1 pela primeira flecha do

esquema. A tabulação dos dados foi feita em uma planilha dispondo todas as espécies descritas no guia nas linhas da tabela, separadas por classe, e classificadas dentro de cada categoria explicitada pelo autor ao longo das chaves, arranjadas nas colunas da mesma. Foram inseridos os parâmetros específicos para as classes, ordens, famílias, gêneros e, por fim, espécies, de forma a abranger o máximo de informação possível para posterior análise refinada.

De maneira a padronizar o banco de dados criado, as características morfológicas foram separadas em três grupos associados a cada um dos possíveis estágios de vida dos microrganismos estudados: estágio flagelado, estágio de cisto e estágio de trofozoíto ameboide. Em cada um deles, as diversas informações podem ser divididas entre aquelas com respostas numéricas, nas quais as respostas foram inseridas como sendo valores representativos de quantidades ou associadas às dimensões mínima, máxima e média, e com respostas binárias, em que a presença ou a ausência da morfologia avaliada foi respondida como sendo afirmativa ou negativa. Quando a resposta negativa impossibilitava que as características seguintes fossem avaliadas (por exemplo, quando a espécie não apresentava estágio flagelado, nenhuma característica do mesmo era possível de ser avaliada), padronizou-se a resposta como sendo “NAp” (do inglês, *Not Applicable*). Por outro lado, quando a morfologia ou dimensão analisada não era descrita pelo Page para determinada espécie, o padrão adotado foi a resposta “NAv” (do inglês, *Not Available*).

Seguindo esses padrões, outros grupos de características foram incluídas no banco de dados de forma complementar, sendo elas as informações associadas a espécies identificadas como capazes de formar corpo de frutificação, bem como a patogenicidade para determinados organismos (seres humanos, camundongos e celenterados) e os meios de cultura nos quais os microrganismos descritos foram cultivados. Além disso, incluiu-se, também, as localizações geográficas onde tais AVLs foram encontradas e estudadas, de forma a completar o detalhamento atribuído a cada uma das espécies desses protozoários.

3.2 Construção do software PVT

Uma vez finalizado o banco de dados, a construção do software em si se tornou possível, etapa essa representada pela segunda flecha do esquema da Figura 1. Tendo em vista que o banco de dados dispõe de dados multivariados, já que cada espécie se relaciona com cada uma das morfologias/características existentes e, portanto, trata-se de uma matriz com geometria de

alta dimensão, optou-se por utilizar a técnica de visualização multidimensional de coordenadas paralelas para realizar a análise dos dados de forma efetiva. (12-13)

Assim, a partir do arquivo .csv do banco de dados, utilizou-se a biblioteca “d3” na linguagem JavaScript, associada a recursos de desenvolvimento web, para gerar um programa rápido e interativo em coordenadas paralelas, em que as espécies das amebas se localizam nas linhas e cada uma das características morfológicas nas colunas. Com isso, baseado no que o usuário observa nas imagens de microscopia das suas amostras estudadas, ele é capaz de selecionar as morfologias e demais informações presentes ou ausentes e, por fim, obter a resposta de qual espécie de ameba se está analisando, no melhor dos casos, ou pelo menos qual o gênero.

4 RESULTADOS

4.1 Banco de dados do PVT

A tabulação das informações contidas no guia de classificação Page gerou um banco de dados formado por 225 espécies distintas de Amebas de Vida Livre, sendo 40 delas pertencentes à classe Heterolobosea, 6 à classe Caryoblastea e 179 à classe Lobosea. Somado a isso, foram geradas 484 categorias distintas de morfologias e características gerais para tais AVLs, distribuídas em:

- 11 associadas ao estágio de vida flagelado;
- 84 associadas ao estágio de vida de cisto;
- 330 associadas ao estágio de vida de trofozoíto;
- 19 associadas à descrição do corpo de frutificação das espécies que o possuem;
- 6 associadas à descrição das temperaturas de crescimento;
- 20 associadas à descrição dos meios de cultura utilizados para a obtenção das informações explicitadas;
- 5 associadas à descrição do estilo de vida/patogenicidade e
- 9 associadas à descrição da distribuição geográfica das espécies.

As Figuras 2a e 2b ilustram, respectivamente, algumas das informações catalogadas para cada um dos estágios de vida e para as demais características.

a)

Flagellate											
Flagellate stage	Ingests food	Number of flagella	Divides in this stage	Presence of cytostome	Mean length min (μm)	Mean length max (μm)	Mean length (μm)	Presence of anterior rostrum	Lip-like rostrum	Nucleus with anterior position	
Cysts											
Cyst stage	Presence of microcysts	Presence of a single encysted plasmodium		Mean diameter min (μm)	Mean diameter max (μm)	Mean diameter (μm)	Cysts with distinct gelatinous coating	Cysts with vacuolate appearance	Circular cysts	Oval cysts	Reniform cysts

Trophozoite										
Presence of nucleus	Minimum number of nuclei	Maximum number of nuclei	Mean number of nuclei	Tendency to supernumerary nuclei	Nucleus mean diameter min (μm)	Nucleus mean diameter max (μm)	Nucleus mean diameter (μm)	Nucleolus mean diameter min (μm)	Nucleolus mean diameter max (μm)	Nucleolus mean diameter (μm)
Mean length min (μm)	Mean length max (μm)	Mean length (μm)	Length/Breadth minimum ratio	Elongate shape	Linguiform shape	Branched shape	Straight shape	Oval shape	Globular shape	

b)

Fruiting body characteristics								
Fruiting body formation	Fruiting in presence of dung and mixed bacterial flora	Fruiting on agar with <i>E. coli</i> or <i>K. pneumoniae</i>	Sorocarp cells differentiated	Sorocarp cells alike	Sorocarp with stalk	Spores produced in chains (simple or branched)	Spores produced in a terminal sorus	
Growth temperature								
Temperature min (°C)	Temperature max (°C)	Optimal temperature (°C)	Growth at 37°C	Growth at 37°C in bacterised culture	Growth at 40°C in bacterised culture	NN growth media	NNE growth media	AC growth media
Growth media								
CMA growth media	Rh growth media	Colp growth media	CP growth media	Free-living	Mycophagous	Parasitic on freshwater coelenterates	Pathogenic to mice	Pathogenic to humans
Geographic distribution								
Widely distributed	Present in North America	Present in Central America	Present in South America	Present in Europe	Present in Africa			

Figura 2 - Exemplos de características incluídas no banco de dados para a caracterização das espécies de AVL. **a)** Morfologias associadas a cada um dos três estágios de vida de AVL: flagelado, cisto e trofozoíto. **b)** Características complementares para a classificação das AVLs: características dos corpos de frutificação, temperatura e meios de crescimento, estilo de vida amebiano e distribuição geográfica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As informações obtidas após a tabulação fornecem uma visão geral de como as espécies de AVL estão distribuídas e, dessa forma, quais características são fundamentais para a correta identificação a nível de espécie. De maneira geral, espécies que apresentam estágio de cisto possuem, nele, informações essenciais para a diferenciação dos microrganismos. Exemplo disso é o caso da diferenciação efetiva entre as espécies da família Acanthamoebidae (gêneros *Protacanthamoeba* e *Acanthamoeba*), como representado na Figura 3. Nela, pode-se verificar que os cistos apresentam características únicas capazes distinguir morfológicamente as espécies analisadas por microscopia.

Species	Cysts										
	Excystment pore/opercula	Excystment through break in wall	Presence of endocyst arms	Tips of endocyst arms at level of ectocyst	Tips of endocyst arms in depressions formed by ectocyst	Endocyst arms contact ectocyst in the same plane	Endocyst arms contact ectocyst in various planes	Minimum number of endocyst arms/pores	Maximum number of endocyst arms/pores	Mean number of endocyst arms/pores	
<i>Protacanthamoeba caledonica</i>	No	Yes	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	
<i>Protacanthamoeba invadens</i>	No	Yes	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	
<i>Acanthamoeba tubiashi</i>	Yes	No	Yes	Yes	No	NAv	NAv	3	5	NAv	
<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No	5	9	NAv	
<i>Acanthamoeba comandoni</i>	Yes	No	Yes	Yes	No	No	Yes	5	14	NAv	
<i>Acanthamoeba lugdunensis</i>	Yes	No	Yes	No	Yes	NAv	NAv	NAv	NAv	7	
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Yes	No	Yes	No	Yes	NAv	NAv	NAv	NAv	7	
<i>Acanthamoeba rhysodes</i>	Yes	No	Yes	No	Yes	NAv	NAv	7	7.5	7	
<i>Acanthamoeba mauritanensis</i>	Yes	No	Yes	No	Yes	NAv	NAv	NAv	NAv	5	
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Yes	No	Yes	No	Yes	NAv	NAv	5	6	NAv	
<i>Acanthamoeba griffini</i>	Yes	No	Yes	No	Yes	NAv	NAv	NAv	NAv	6	
<i>Acanthamoeba quina</i>	Yes	No	Yes	No	Yes	NAv	NAv	4	5	NAv	
<i>Acanthamoeba divonensis</i>	Yes	No	Yes	No	Yes	NAv	NAv	5	6	NAv	
<i>Acanthamoeba triangularis</i>	Yes	No	Yes	No	Yes	NAv	NAv	NAv	4	NAv	
<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	Yes	No	Yes	No	Yes	NAv	NAv	3	4	NAv	

Figura 3 - Exemplos de características do estágio de cisto de espécies da família Acanthamoebidae para diferenciação das espécies.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Outro exemplo da importância da descrição de informações associadas ao estágio de cisto está na classificação de espécies da família Vahlkampfiidae (gêneros *Vahlkampfia*, *Naegleria*, *Wilaertia*, *Adelphamoeba*, *Paratetramitus*, *Tetramitus* e *Tetramastigamoeba*). Embora tais características forneçam as indicações de distinção mais úteis, elas não são suficientes para a correta diferenciação, sendo, então, necessário avaliar as morfologias do estágio flagelado dessas espécies, conforme ilustrado na Figura 4. Com esses dois conjuntos de dados, a categorização se torna mais efetiva, dispensando, até, as informações do estágio de trofozoíto, uma vez que elas não fornecem distinções o suficiente para a devida classificação para esse caso.

Species	Flagellate											
	Flagellate stage	Ingests food	Number of flagella	Divides in this stage	Presence of cytostome	Mean length min (μm)	Mean length max (μm)	Mean length (μm)	Presence of anterior rostrum	Lip-like rostrum	Nucleus with anterior position	
<i>Vahlkampfia ovis</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	
<i>Schizopyrenus horticolus</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	
<i>Vahlkampfia froschi</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	
<i>Vahlkampfia atopa</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	
<i>Vahlkampfia lacustris</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	
<i>Vahlkampfia debilis</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	
<i>Vahlkampfia magna</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	
<i>Vahlkampfia erythaenusa</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	
<i>Naegleria gruberi</i>	Yes	NAv	2	No	No	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	
<i>Naegleria jadini</i>	Yes	NAv	2	No	No	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	
<i>Naegleria lovaniensis</i>	Yes	NAv	2	No	No	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	
<i>Naegleria fowleri</i>	Yes	NAv	2	No	No	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	
<i>Naegleria australiensis australiensis</i>	Yes	NAv	2	No	No	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	
<i>Naegleria australiensis italica</i>	Yes	NAv	2	No	No	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	
<i>Willaertia magna</i>	Yes	NAv	4	Yes	No	19	30	22	NAv	NAv	NAv	

Figura 4 - Exemplos de características do estágio flagelado de espécies da família Vahlkampfiidae para diferenciação das espécies.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ainda que essa associação entre a caracterização tanto do estágio de cisto quanto do flagelado seja bastante efetiva, muitas das espécies descritas no banco de dados não apresentam

formas flageladas e, em alguns casos, forma de cisto, ou até mesmo não são atribuídas a elas informações sobre esses estágios de vida. Como exemplo, pode-se citar as espécies das famílias Paramoebidae (gêneros *Platyamoeba* e *Vanella*) e Vexilliferidae (gênero *Vexillifera*), as quais não possuem formas encistadas conhecidas e não há informação sobre a presença ou não do estágio flagelado. Nesses casos, as informações acerca do trofozoíto são vitais, especialmente as dimensões e os detalhamentos morfológicos do núcleo, da própria forma ameboide e das estruturas presentes em sua superfície (tegumento e/ou glicocálix), da forma flutuante e de seus pseudópodos, das projeções hialinas do citoplasma (subpseudópodos e uroide) e das inclusões cristalinas no mesmo.

Endossada a importância dos dados acerca dos estágios de vida das Amebas de Vida Livre, ao se avaliar as características complementares abordadas pelo Page, o mesmo, por sua vez, não ocorre. Informações relacionadas à distribuição geográfica ou ao meio de cultura utilizado para a obtenção dos microrganismos estudados são tanto incompletas quanto inefficientes, visto que abordam descrições genéricas a ponto de serem desnecessárias quando incluídas na análise junto às demais características morfológicas. A patogenicidade das espécies também não possui relevância, visto que ela traz dados ou muito esparsos ou muito específicos, como é o caso da patogenicidade a celenterados pela *Hydramoeba hydroxena* e a fungos pela *Dermamoeba minor*.

Além disso, quando se analisa o impacto dos dados de temperatura de crescimento na distinção entre as espécies, ele não é significativo, de maneira geral. No entanto, eles se tornam relevantes quando se está estudando espécies do gênero *Naegleria* e *Acanthamoeba*, visto que eles permitem a diferenciação dentro do próprio gênero e de outros organismos como um todo por apresentarem representantes termofílicos. Isso é de extrema importância socioambiental, uma vez que alguns desses organismos são altamente patogênicos aos seres humanos e até mesmo letais, conforme já explicitado. (3,9)

Por fim, os dados relacionados à descrição de espécies que apresentam corpo de frutificação acabam ganhando mais destaque quanto a sua significância na diferenciação taxonômica quando comparados aos demais complementares. Isso se deve ao fato de serem capazes de separar uma ordem inteira do restante das AVLs: a ordem Acrasida, composta pelas famílias Acrasidae e Guttulinopsidae, conforme ilustrado pela Figura 5. Elas por si só já permitem tal diferenciação, embora seja importante considerar as demais características para uma identificação precisa.

Species	Fruiting body formation	Fruiting in presence of dung and mixed bacterial flora	Fruiting on agar with <i>E. coli</i> or <i>K. pneumoniae</i>	Sorocarp cells differentiated	Sorocarp cells alike	Sorocarp with stalk	Spores produced in chains (simple or branched)	Spores produced in a terminal sorus	Mean length min (μm)
<i>Paratetramitus jugosus</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp
<i>Tetramitus rostratus</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp
<i>Tetramastigamoeba hoarei</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp
<i>Didascalus thorntoni</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp
<i>Trimastigamoeba philippinensis</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp
<i>Stachyamoeba lipophora</i>	No	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp	NAp
<i>Acrasis rosea</i>	Yes	NAv	NAv	Yes	No	NAv	Yes	No	NAv
<i>Acrasis granulata</i>	Yes	NAv	NAv	Yes	No	NAv	Yes	No	NAv
<i>Pocheina rosea</i>	Yes	NAv	NAv	Yes	No	NAv	No	Yes	NAv
<i>Pocheina flagellata</i>	Yes	NAv	NAv	Yes	No	NAv	No	Yes	NAv
<i>Guttulinopsis vulgaris</i>	Yes	Yes	No	No	Yes	No	NAv	NAv	5.5
<i>Guttulinopsis nivea</i>	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	NAv	NAv	4.5
<i>Guttulinopsis stipitata</i>	Yes	NAv	NAv	No	Yes	NAv	NAv	NAv	NAv
<i>Guttulinopsis clavata</i>	Yes	NAv	NAv	No	Yes	NAv	NAv	NAv	NAv
<i>Rosculus ithacus</i>	No	NAv	NAv	No	Yes	NAv	NAv	NAv	NAv

Figura 5 - Exemplo representativo dos dados acerca da formação de corpo de frutificação, presente nas espécies das famílias Acrasidae e Guttulinopsidae.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Software PVT

A sistematização do guia de classificação Page permitiu a geração de um banco de dados com um volume consideravelmente grande de informações. Dessa forma, a construção completa do software PVT e de sua interface interativa ainda está em fase de desenvolvimento. No entanto, análises preliminares já foram realizadas, em princípio apenas para o caso de características associadas ao estágio flagelado de espécies dos gêneros *Vahlkampfia* e *Naegleria*.

Ao utilizar, inicialmente, o arquivo .csv bruto do banco de dados para essas espécies, dada a quantidade de informações nele presentes, o resultado gerado apresentou muita oclusão das informações, tornando as espécies e as dimensões das colunas completamente ilegíveis e impossível de fazer qualquer distinção entre os microrganismos ali descritos. A Figura 6 exemplifica o produto dessa primeira abordagem.

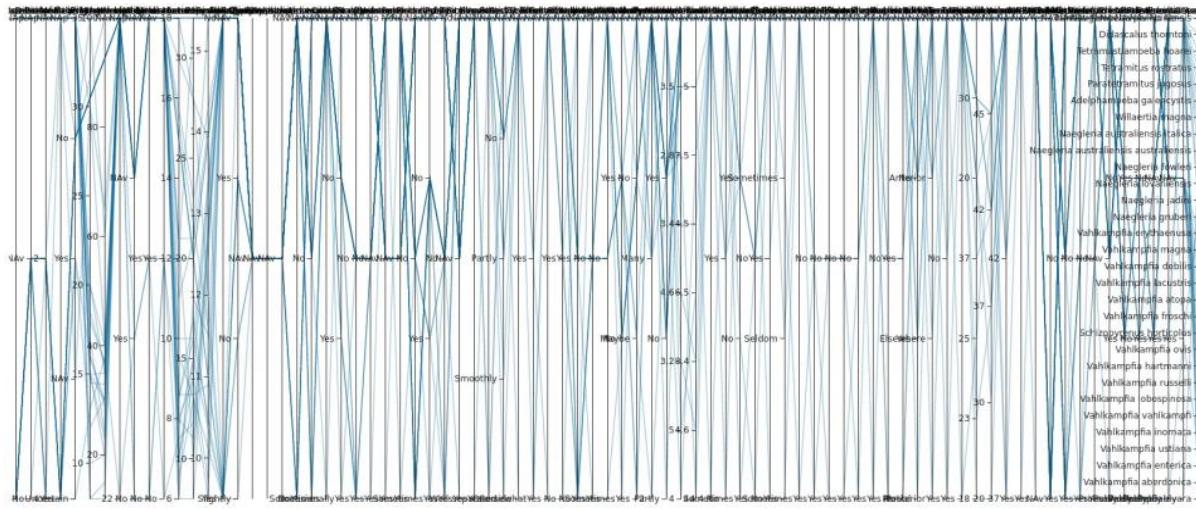
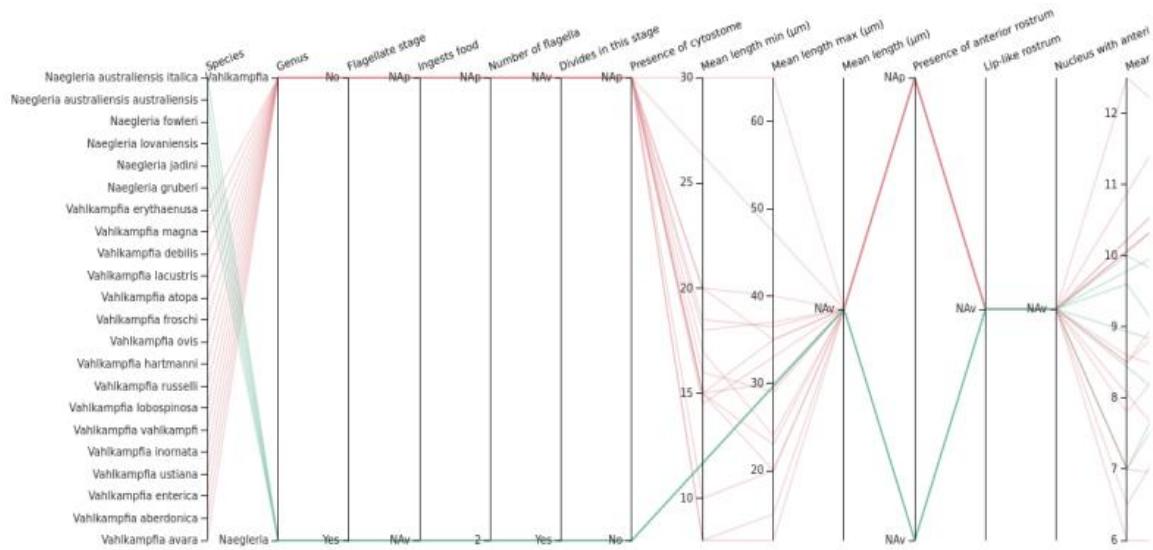


Figura 6 - Exemplo representativo da interface do software PVT a partir do arquivo bruto apenas para as características do estágio flagelado das espécies do gênero *Vahlkampfia* e *Naegleria*.

Fonte: Elaborada pelo autor e pelo Prof. Dr. Douglas Cedrim Oliveira.

Sendo assim, decidiu-se acrescentar o espaçamento necessário para que as informações se tornassem legíveis e, também, separar os gêneros com colorações diferentes. Para isso, foi necessária a adição de uma primeira coluna contendo os gêneros das espécies presentes no banco de dados, podendo, assim, atribuir cores distintas a cada um deles e refinar a visualização. Além disso, de forma a melhorar ainda mais a interface e aperfeiçoar a disposição dos dados, resolveu-se adicionar o próprio banco de dados no formato tabular logo abaixo do sistema de coordenadas paralelas. Com isso, o usuário consegue visualizar tanto no gráfico quanto na tabela as características por ele observadas e aferir, ainda, outras informações que aquele microrganismo possui, mas que não foram possíveis de serem avaliadas nas amostras estudadas.

A Figura 7 abaixo exemplifica o resultado dessa análise preliminar empregada, de modo a conseguir, com êxito, gerar uma ferramenta inovadora de visualização interativa que permite ao usuário a seleção das características morfológicas e complementares a partir da observação por microscopia de suas amostras de estudo.



Species	Genus	Flagellate	Ingests food	Number of	Divides in	Presence of	Mean	Mean	Mean	Presence of	Lip-like	Nucleus	Mean	Mean
Vahlkampfia avara	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	14.5	33	NAv	NAp	NAv	NAv	7	14
Vahlkampfia aberdonica	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	18	37	NAv	NAp	NAv	NAv	6.5	13
Vahlkampfia enterica	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	17	24	NAv	NAp	NAv	NAv	8.5	17
Vahlkampfia ustiana	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	30	65	NAv	NAp	NAv	NAv	12.5	21
Vahlkampfia inornata	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	18.5	36.5	NAv	NAp	NAv	NAv	8.6	13.2
Vahlkampfia vahlkampfi	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	NAv	NAv	NAp	NAp	NAv	NAv	NAv	NAv
Vahlkampfia lobospinosa	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	16	29	NAv	NAp	NAv	NAv	7.8	15
Vahlkampfia russelli	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	15	23	NAv	NAp	NAv	NAv	NAv	20
Vahlkampfia hartzmanni	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	10	20	NAv	NAp	NAv	NAv	NAv	NAv
Vahlkampfia ovis	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	20	35	NAv	NAp	NAv	NAv	8.5	16
Vahlkampfia froschi	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	8	12	NAv	NAp	NAv	NAv	7	10
Vahlkampfia atopa	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	15	30	NAv	NAp	NAv	NAv	NAv	20
Vahlkampfia lacustris	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	8	15	NAv	NAp	NAv	NAv	6	8
Vahlkampfia debilis	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	15	20	NAv	NAp	NAv	NAv	NAv	10
Vahlkampfia magna	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	20	40	NAv	NAp	NAv	NAv	NAv	NAv
Vahlkampfia erythaenusa	Vahlkampfia	No	NAp	NAp	NAv	NAp	15	35	NAv	NAp	NAv	NAv	NAv	23
Naegleria gruberi	Naegleria	Yes	NAv	2	Yes	No	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	10	16
Naegleria jadini	Naegleria	Yes	NAv	2	Yes	No	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv
Naegleria lovanensis	Naegleria	Yes	NAv	2	Yes	No	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	9.6	13
Naegleria fowleri	Naegleria	Yes	NAv	2	Yes	No	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	NAv	7	15

Figura 7 - Exemplo representativo da interface do software PVT após um tratamento inicial das acerca do estágio flagelado das espécies do gênero *Vahlkampfia* e *Naegleria*.

Fonte: Elaborada pelo autor e pelo Prof. Dr. Douglas Cedrim Oliveira.

Posto isso, o próximo passo, naturalmente, consiste no emprego das técnicas computacionais mencionadas para todo o banco de dados gerado, dispondo as 225 espécies e as 484 características ali contidas de maneira eficiente. Dessa forma, consegue-se gerar um software altamente funcional e otimizado, além de disponível para a comunidade acadêmico-científica, direcionando, assim, para a solução do problema da falta de praticidade nas análises morfológicas de AVLs e da dificuldade inerente à sua realização.

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho visou elaborar uma possível solução para o estudo morfológico de Amebas de Vida Livre, realizado, até os dias de hoje, por meio da consulta manual ao guia de classificação taxonômica “A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae”, escrito por Page em 1988. A falta de otimização no processo intensifica o cenário de escassez de estudos desses microrganismos no Brasil e no mundo, tornando-se, então, necessário o desenvolvimento de uma ferramenta que aprimore as análises morfológicas.

Sendo assim, a partir da organização sistemática das informações contidas no guia Page, construiu-se um banco de dados robusto e volumoso contendo todas as descrições trazidas pelo autor em suas chaves de classificação. Para isso, ordenou-se as 225 espécies distribuídas entre as classes Heterolobosea, Caryoblastea e Lobosea nas linhas da tabela e as 484 características morfológicas nas colunas. Elas foram divididas entre os três estágios de vida possíveis (flagelado, cisto e trofozoíto), bem como entre dados complementares, abrangendo desde descrições para espécies que apresentam corpo de frutificação, passando pelas informações de cultivo e estilo de vida, e chegando, finalmente, à distribuição geográfica dos microrganismos listados.

Através de uma análise refinada e cautelosa do volume de dados obtidos, foi possível averiguar que algumas categorias são mais efetivas e relevantes na distinção entre as espécies do que outras. As informações de trofozoíto são fundamentais para a classificação das AVLs como um todo, principalmente àquelas que apresentam pouco ou nenhum dado sobre os estágios encistado e flagelado. Dentre elas, pode-se destacar, em especial, as dimensões e as especificações do núcleo e da forma ameboide em si, das estruturas presentes em sua superfície (tegumento e/ou glicocálix), da forma flutuante e de seus pseudópodos, dos subpseudópodos e uroide, bem como das inclusões cristalinas no citoplasma.

Espécies que apresentam estágios de cisto bem descritos são capazes de serem distinguidas simplesmente pelas descrições a ele associadas, como é o caso da família Acanthamoebidae e da família Vahlkampfiidae, sendo, então, um potente recurso a ser explorado nas análises morfológicas empregadas. No entanto, para o último grupo taxonômico, os dados de cisto precisam ser complementados pelos referentes ao estágio flagelado, uma vez que tal família apresenta uma vigorosa categorização dessas informações. Neste caso, as informações associadas ao trofozoíto não são suficientes para uma classificação efetiva de tais microrganismos.

As descrições adicionais, por sua vez, não apresentam um impacto significativo para a diferenciação das AVLs, sobretudo os dados de distribuição geográfica e de meios de cultura utilizados. O estilo de vida descrito permite que apenas algumas espécies específicas sejam classificadas precisamente (por exemplo, a patogenicidade a celenterados pela *Hydramoeba hydroxena* e a fungos pela *Dermamoeba minor*), ao passo que as temperaturas de crescimento se tornam importantes apenas para a distinção de algumas espécies termofílicas que apresentam grande relevância para a saúde pública, como é o caso das espécies patogênicas de *Naegleria* e *Acanthamoeba* que podem ser letais. Já a formação de corpo de frutificação, por sua vez, acaba tendo uma evidência maior no estudo, dentre tais categorias, por ser capaz de particularizar as espécies das famílias Acrasidae e Guttulinopsidae.

Uma vez estabelecida a grande importância de uma substancial descrição das morfologias atreladas a cada um dos estágios de vida das AVLs, somado a detalhamentos complementares de dados pontuais, o emprego das técnicas de visualização multidimensional por coordenadas paralelas tornou possível, ainda que através de uma análise preliminar, a construção inovadora do software PVT com uma interface interativa e eficiente. O usuário é capaz de selecionar, em cada uma das colunas, as informações observadas através da microscopia de suas amostras, de forma a filtrar os dados e obter, no melhor dos casos, a designação da espécie que está estudando.

Embora já se consiga ter uma ideia da efetividade desta ferramenta de visualização, ainda é necessário completá-la com as demais informações contidas no banco de dados e realizar os devidos tratamentos para tornar a utilização mais dinâmica e robusta. Além disso, tendo já estabelecido a versão inicial de tal programa, torna-se necessário, ao longo do tempo, atualizar o banco de dados, visto que novas espécies e características foram e vêm sendo inseridas aos grupos taxonômicos presentes no guia Page desde a data de sua publicação (1988) até os dias de hoje. Somado a isso, almeja-se, futuramente, incluir não só as novidades morfológicas descobertas, mas também os resultados moleculares obtidos nos últimos anos com o advento das tecnologias de identificação biológica.

Com isso, possibilita-se o desenvolvimento de uma inovadora técnica otimizada, efetiva e qualificada para aprimorar os estudos de Amebas de Vida Livre de maneira geral, relacionando-se a abordagem morfológica e molecular para as análises. Dessa forma, acredita-se que o conhecimento acerca das AVLs poderá ser ampliado, suprindo a escassez das pesquisas no tema e reduzindo os impactos socioambientais causados por essa problemática. Além disso, tal contribuição poderá auxiliar não só os trabalhos sobre essa temática como também poderá

servir de modelo para a sistematização de características para outros organismos, sejam eles procariontes ou eucariontes.

REFERÊNCIAS

- 1 MONTALBANO DI FILIPPO, M. *et al.* Isolation and molecular characterization of free-living amoebae from different water sources in Italy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 4, p. 3417-3427, 2015.
- 2 MARTINEZ, A. J.; VISVESVARA, G. S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathology**, v. 7, n. 1, p. 583-598, 1997.
- 3 SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 9, p. 1001-1027, 2004.
- 4 DENDANA, F. *et al.* Free-living amoebae (FLA): detection, morphological and molecular identification of Acanthamoeba genus in the hydraulic system of an haemodialysis unit in Tunisia. **Parasite**, v. 15, n. 2, p. 137-142, 2008.
- 5 PAGE, F.C. **A new key to freshwater and soil Gymnamoebae:** with instructions for culture. Ambleside: Freshwater Biological Association, 1988. (Culture collection of algae and protozoa). ISBN 9781871105025.
- 6 PAGE, F.C. The classification of “naked” amoebae (Phylum Rhizopoda). **Archiv für Protistenkunde**, v. 133, n. 3-4, p. 199-217, 1987.
- 7 REYES-BATLLE, M. *et al.* Isolation and molecular characterization of a Naegleria strain from a recreational water fountain in Tenerife, Canary Islands, Spain. **Acta Parasitologica**, v. 62, n. 2, p. 265-268, 2017.
- 8 KRÓL-TURMIŃSKA, K.; OLENDER, A. Human infections caused by free-living amoebae. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 24, n. 2, p. 254, 2017.
- 9 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Bacterial Meningitis.** 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/meningitis/bacterial.html>. Acesso em: 21 jun. 2022.
- 10 BELLINI, N. K. *et al.* Isolation of *Naegleria* spp. from a Brazilian water source. **Pathogens**, v. 9, n. 2, p. 90, 2020.
- 11 SABERI, R. *et al.* A systematic literature review and meta-analysis on the global prevalence of *Naegleria* spp. in water sources. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 6, p. 2389-2402, 2020.
- 12 HEINRICH, J.; WEISKOPF, D. State of the art of parallel coordinates. **Eurographics - state of the art reports.** 2013. p. 95-116. Disponível em: https://joules.de/files/heinrich_state_2013.pdf. Acesso em: 21 jun. 2022.
- 13 MUNZNER, T. **Visualization analysis and design.** Boca Raton: CRC Press, 2014.