Maria do Rosário Alexandre da Silva

Detecção de DNA de *Blastocystis* sp. em pacientes candidatos a transplantes atendidos no hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Martins de Paula

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Silva, Maria do Rosário Alexandre da

Detecção de DNA de *Blastocystis* sp. em pacientes candidatos a transplantes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP) / Maria do Rosário Alexandre da Silva. – São Paulo, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Fabiana Martins de Paula

Descritores: 1. BLASTOCYSTIS. 2. DIAGNÓSTICO. 3. ALELOS.

USP/IMTSP/BIB-09/20

Aos meus pais Expedito Alexandre e Francisca Felipe que sempre me apoiaram,

me dedicaram amor, carinho e, não há tempo ou distância que apague.

Aos meus irmãos pela amizade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que tem sido o meu refúgio e a minha fortaleza. Nos momentos de dificuldade, o seu amor me amparou e me tornou forte o suficiente para chegar até aqui.

A toda a minha família, especialmente meus pais Francisca Felipe da Silva e Expedito Alexandre da silva, que nunca colocaram obstáculos para me ajudar.

A todos os meus irmãos, que sempre estiveram ao meu lado, me encorajando a seguir em frente.

Ao meu esposo Claudivon Alves e minha filha Luisa, obrigada pela compreensão. O amor e o carinho de vocês me dão forças para suportar as adversidades.

Ao casal de amigos José Roberto e Maria Ivanir, que me apoiaram e me ajudaram em todos os momentos que precisei.

Ao meu supervisor Sandro Rogério, que muitas vezes permitiu que me ausentasse do meu trabalho para conseguir assistir as disciplinas do curso.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana Martins de Paula, que não mediu esforços para que esse projeto fosse possível. Obrigada por compreender as minhas dificuldades e me incentivar a supera-las. Agradeço a todas as vezes que me incentivou a dar o meu melhor e por tudo o que fez para o meu desenvolvimento e aprendizado no laboratório.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryschek pela confiança e oportunidade.

A todos os colegas mestrandos e doutorandos, que sempre estiveram dispostos a contribuírem com o desenvolvimento deste projeto.

A todos os funcionários do laboratório de Investigação Médica (LIM06) do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

À toda a equipe do Laboratório central de parasitologia do Hospital das Clínicas, pela oportunidade de aprender um pouco sobre o diagnóstico de *Blastocystis sp*. na rotina laboratorial.

À Eliane Araujo, secretária do programa de pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, sempre muito atenciosa.

Agradeço também ao Dr. Sérgio Vieira dos Santos e a Dra. Susana Angélica Zevallos que participaram da banca no exame de qualificação, obrigada pelas suas correções e contribuições na melhoria deste trabalho.

“ Não há nada permanente, a não ser a mudança. ”

Heráclito

RESUMO

Silva MR. Detecção de DNA de *Blastocystis* sp. em pacientes candidatos a transplantes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). (Dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

Blastocystis sp. é um protozoário intestinal comumente encontrado em amostras fecais de muitas espécies animais, incluindo humanos, sendo pouco estudado em pacientes imunocomprometidos, especialmente nos candidatos a transplante. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência e a identificação molecular de subtipos (ST) de *Blastocystis* sp. em amostras fecais de pacientes candidatos a transplante. A Reação em Cadeia da Polimerase foi realizada utilizando *primers* específicos para o DNA ribossomal de *Blastocystis*. As sequências de DNA obtidas foram alinhadas e comparadas com outras sequências do banco de dados GenBank e MLST (*Multilocus Sequence Typing*). As amostras analisadas mostraram uma positividade de 16% (24/150) para *Blastocystis* sp. A maior ocorrência foi observada em candidatos a transplante renal (31,4%), seguida de candidatos a transplante hepático (10,4%) e candidatos a transplante de medula óssea (5,9%). O ST3 (45,8%) foi o mais prevalente entre os isolados, seguido pelo ST1 (37,5%), ST2 (12,5%) e ST7 (4,2%). Foi observado dentro dos subtipos: os alelos 4 e 78/81 (ST1); alelos 11 e 12 (ST2); alelos 34, 36, 37 e 54 (ST3) e alelo 96 (ST7). Este é o primeiro estudo de identificação molecular de *Blastocystis* sp. em candidatos a transplante. Os presentes resultados confirmam a maior ocorrência do subtipo 3 em candidatos a transplante, além de reforçar a importância de novas investigações de *Blastocystis* sp. nesses pacientes.

Descritores: *Blastocystis*. Diagnóstico. Alelos

ABSTRACT

Silva MR. Detection of *Blastocystis* sp. subtypes in transplant candidate patients from Clinical Hospital, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Brazil (HC FMUSP). (Dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

Blastocystis sp. is an intestinal protozoan commonly found in faecal samples of many animal species, including humans, but poorly studied in immunocompromised patients, especially in transplant candidates. The purpose this study was to evaluated the occurrence and molecular identification of *Blastocystis* sp. in faecal samples from transplant candidate patients. The Polymerase Chain Reaction was performed using specific primers for *Blastocystis* DNA ribosomal. The DNA sequences obtained were aligned and compared with other sequences from the GenBank and MLST database. The analyzed samples showed a positivity of 16% (24/150) for *Blastocystis* sp. The highest occurrence was observed in renal transplant candidates (31.4%), followed by hepatic transplant candidates (10.4%) and candidates for bone marrow transplantation (5.9%). The ST3 (45.8%) was the most prevalent among the isolates followed by ST1 (37.5%), ST2 (12.5%) and ST7 (4.2%). It was observed within the subtypes: alleles 4 and 78/81 (ST1); alleles 11 and 12 (ST2); alleles 34, 36, 37 and 54 (ST3); and allele 96 (ST7).This is the first study of *Blastocystis* sp. molecular identification in transplant candidates**.** These results confirmed the highest occurrence of the subtype 3 in transplant candidates, as well as reinforcing the importance of the new investigation of *Blastocystis* sp. in these patients.

Descriptors: *Blastocystis*. Diagnosis. Alleles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diferentes formas de *Blastocystis* sp. 21

Figura 2- Ciclo biológico de *Blastocystis* sp. 22

Figura 3- Representação esquemática do gene SSU-rDNA de *Blastocystis*. 26

Figura 4- PCR utilizando *primers* específicos que amplificam o fragmento de aproximadamente 600bp localizado SSU-rDNA de *Blastocystis* sp. 39

Figura 5- Amplificação de DNA em amostras fecais (1 ao 17, A e B) de pacientes candidatos a transplante renal utilizando primer específico de (~600bp) 40

Figura 6- Amplificação de DNA em amostras de fezes (1 a 9) de pacientes candidatos a transplante hepático, utilizando *primer* específico de (~600bp)..... 41

Figura 7- Amplificação de DNA em amostras de fezes (1 a 3) de pacientes candidatos a transplante de medula óssea, utilizando *primer* específico de (~600bp)..... 41

Figura 8- Amplificação de DNA em amostras fecais de pacientes candidatos a transplante utilizando *primer* universal (~140bp)..... 42

Figura 9- Árvore filogenética mostrando as relações evolutivas inferidas dos subtipos de *Blastocystis* sp. identificados nas amostras dos candidatos a transplante 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados dos pacientes candidatos transplantes atendidos no HCFMUSP, de 2011 a 2013. 38

Tabela 2- Distribuição dos subtipos de *Blastocystis* sp. em pacientes candidatos a transplantes, HCFMUSP, em 2011 a 2013.....43

Tabela 3- Distribuição dos subtipos de *Blastocystis* e seus respectivos alelos de acordo com a identificação das amostras.....45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Distribuição dos subtipos de *Blastocystis* sp. de acordo com os hospedeiros.....23

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição e frequência dos alelos dentro dos subtipos de *Blastocystis* sp. em pacientes candidatos a transplantes. 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

STs - Subtipos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

SSU-rDNA - pequena subunidade do Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal (Small Subunit ribossomal Desoxirribonucleic Acid)

CDC- centro de controle e prevenção de doenças (Centers for Desease Control and Prevention).

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)

bp- Pares de bases

RD5- Iniciador específico para eucariotos

BhRDr- Iniciador específico para *Blastocystis*.

STS primer- conjunto de iniciadores específicos para os ST1-7 de *Blastocystis*

IBS- Síndrome do Intestino Irritável (Irritable Bowel Syndrome)

HCFMUSP- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LIM- Laboratório de Investigação Médica

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido

TR- Transplante renal

TH- Transplante hepático

TMO- Transplante de medula óssea

dNTPs- Desoxinucleotídeos trifosfatos

Pmol- Picomol

qsp- quantidade suficiente para

ddNTPs- Dideoxirribonucleotídeos

pH- Potencial hidrogeniônico

MLST- Tipagem de Sequencias de Multi *locus* (Multilocus Sequence Typing)

MM- Massa molecular

CP- Controle positivo

CN- Controle negativo

HIV- Vírus da Imunodeficiência adquirida

Aids- Síndrome da imunodeficiência adquirida (Acquired immunological deficiency syndrome)

IBD- Doença do Intestino Inflamado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....18
1.2 Histórico e nomenclatura 19
1.3 Morfologia.....20
1.4 Ciclo biológico 21
1.5 Epidemiologia.....22
1.6 Diversidade genética e potencial zoonótico 23
1.7 Diagnóstico.....24
1.7.1 Diagnóstico parasitológico..... 24
1.7.2 Diagnóstico molecular..... 25
1.8 Patogenicidade.....27
1.9 Imunodepressão e *Blastocystis* sp.....28
2 JUSTIFICATIVA.....30
3 OBJETIVOS.....31
3.1 Objetivo geral.....31
3.2 Objetivos específicos 31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....32
4.1 Aspectos éticos.....32
4.2 Critérios de inclusão 32
4.3 Critérios de exclusão 322
4.4 População de estudo 33
4.5 Extração do DNA 33
4.6 Quantificação de DNA nas amostras 34
4.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....34
4.8 Controles 35
4.9 Eletroforese 36
4.10 Reação de Sequenciamento.....366
4.11 Análise dos dados.....37
5 RESULTADOS.....38
5.1 Caracterização da população estudada.....38
5.2 Diagnóstico molecular.....39
5.3 Árvore filogenética 45
6 DISCUSSÃO.....47
8 CONCLUSÕES.....56

REFERÊNCIAS.....57
ANEXO 1- APROVAÇÃO PROJETO DE PESQUISA.....64

1 INTRODUÇÃO

Blastocystis sp. é um protozoário anaeróbio que coloniza cerca de 1 bilhão de pessoas, apresenta distribuição mundial e maior prevalência em países tropicais e em desenvolvimento[1]. Alguns estudos têm associado à sua presença a sintomas gastrointestinais inespecíficos, como diarreia, dor abdominal e constipação[2,3,4].

Blastocystis sp. possui uma grande diversidade genética, tendo sido encontrado até o momento 17 subtipos (ST), sendo dez (ST1-9 e ST12) encontrados em humanos[2,5]. Esta diversidade genética pode provavelmente estar relacionada ao seu possível potencial patogênico[2].

Até o presente momento não tem sido avaliado a presença deste organismo em candidatos a transplantes. Estudos utilizando modelos experimentais apontam *Blastocystis* sp. como um patógeno gastrointestinal, e condições de imunossupressão podem representar um importante fator de predisposição para o desenvolvimento de doença[6,7]. E por fim, mesmo após 100 anos da sua identificação muitas questões permanecem por serem evidenciadas.

1.2 Histórico e nomenclatura

O primeiro registro do gênero *Blastocystis* foi apresentado por Alexieff[8] em 1911 (apud Stensvold e Clark[1]) ao descrever a espécie *Blastocystis enterocola* como um fungo. No ano seguinte, Brumpt[9] (apud Miné e Rosa[10]), examinando fezes humanas, observou organismos semelhantes aos descritos anteriormente, porém o descrevendo como uma levedura intestinal e o reclassificando para espécie *Blastocystis hominis* [5,11].

Durante um longo período *Blastocystis* sp. foi conhecido como uma levedura, mas baseado em características morfológicas e fisiológicas foi reclassificado como um protozoário[12]. Em 1996, estudos moleculares baseados no gene ribossomal (SSU-rDNA) permitiram a inclusão de *Blastocystis* sp. dentro do Filo Stramenopiles, composto em sua maioria por organismos de vida livre[13]. Atualmente, *Blastocystis* sp. é considerado um protozoário, membro do domínio Eukaryota, Filo Stramenopiles, Classe Blastocystae, Ordem Blastocystida, Família Blastocystidae e Gênero *Blastocystis*[1,14].

Embora os nomes específicos foram baseados na origem do hospedeiro, as recentes análises do gene SSU-rDNA de *Blastocystis* têm demostrado uma grande diversidade genética[5,15]. Baseando-se nessas variações Stensvold *et al*.[16] propuseram uma terminologia consenso, assim os isolados devem ser denominados *Blastocystis* sp., seguido pelo subtipo de 1-17, na tentativa de agrupar os isolados com as mesmas características genéticas.

1.3 Morfologia

Blastocystis sp. é um organismo polimórfico, sendo encontradas as formas vacuolar, granular, ameboide e cística em maior frequência (Figura 1). Outras formas distintas e menos frequentes também podem ser encontradas, como as formas avacuolar e multivacuolar[17]. Entretanto, ainda não se sabe ao certo o significado e a função da maioria delas[18].

As formas vacuolares são comumente observadas em amostras fecais e em meio de cultura. Podem se apresentar de diferentes tamanhos (variando de 3 a 120µm), mas em média possuem de 5 a 15µm. Tem como principais características um vacúolo central que ocupa cerca de 90% da célula e uma fina camada de citoplasma com a presença de um ou mais núcleos. O vacúolo central é cercado por membranas, contendo carboidratos, gorduras e proteínas[19].

As formas granulares, variam de 15 a 80µm, são comuns em amostras de cultura e caracterizadas pela presença de grânulos no citoplasma, que podem ser metabólicos ou lipídicos[17].

A forma ameboide é a menos frequente, possui forma irregular, e podem dar origem a forma cística. A forma ameboide tem sido relatada em cultura de pacientes sintomáticos, sugerindo uma possível relação com a patogenicidade deste organismo[20].

A forma cística é geralmente detectada em amostras fecais e raramente observada em cultura *in vitro*. A forma cística pode ser esférica ou ovoide, medem de 3 a 5µm, e o citoplasma apresenta-se condensado[21]. O número de núcleos pode variar de um a quatro. Os cistos podem permanecer viáveis no meio ambiente por longo período de tempo, e é considerada a forma infectante[11].

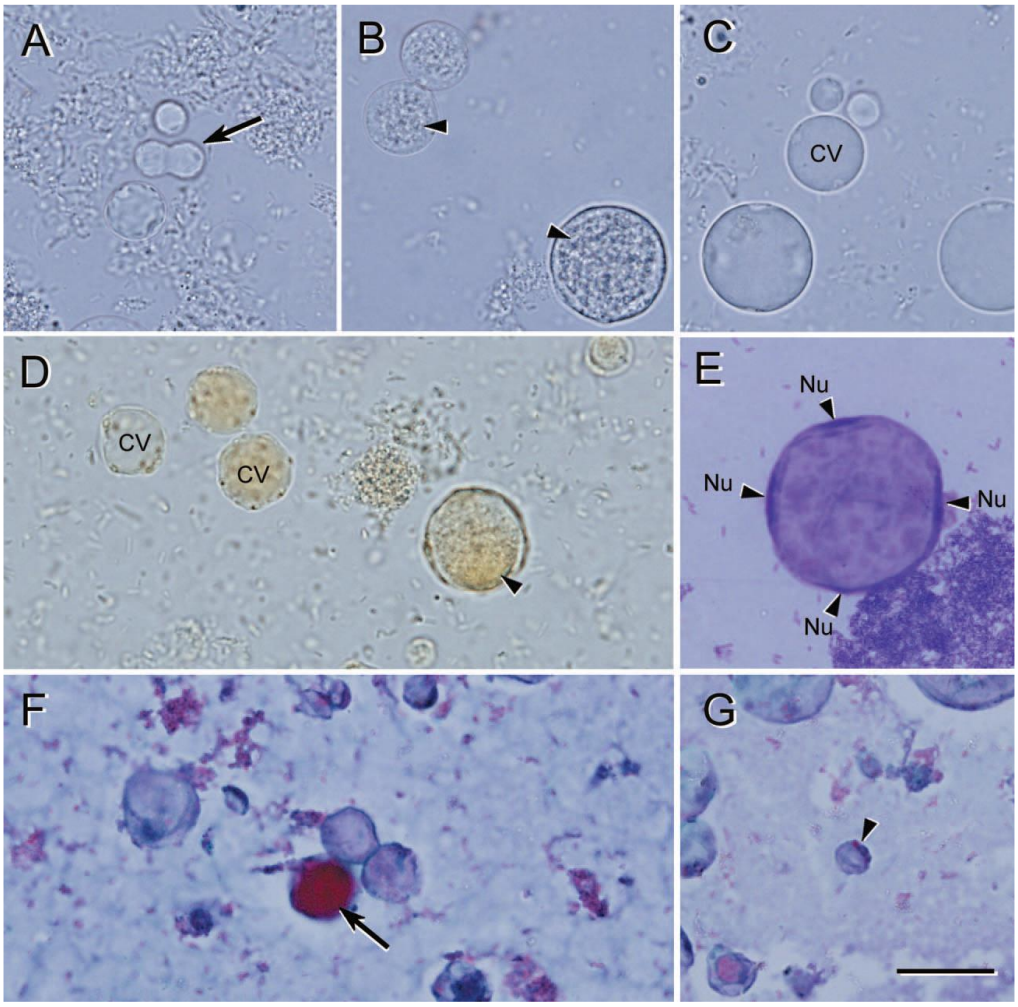

Figura 1 – Formas de *Blastocystis* sp. cultivado em meio Jones. (A, B e C) Diagnóstico sem coloração. (A) Reprodução por divisão binária, (B) formas granuolares, (C) forma vacuolar, (D) formas vacuolares coradas com lugol, (E) forma vacuolar com presença de quatro núcleos (Nu) corada com coloração de Giemsa, (F e G) formas vacuolares coradas com tricrômico. Barra, 20µm, adaptado de Tan[11].

1.4 Ciclo biológico

O ciclo de vida de *Blastocystis* sp. ainda não foi completamente elucidado, principalmente pela ausência de um modelo animal que represente a infecção, sobretudo nos humanos. O ciclo biológico proposto pelo CDC[22] (Centers for Desease Control and Prevention) (Figura 2) inicia-se com a ingestão de cistos através de água e/ou alimentos contaminados. No intestino grosso os cistos se

transformam em formas vacuolares que dão origem as formas multivacuolar e ameboide. Estas se desenvolvem em cistos de parede fina, responsáveis pela autoinfecção e, cistos de parede espessa que são liberados junto com as fezes para o meio ambiente[23].

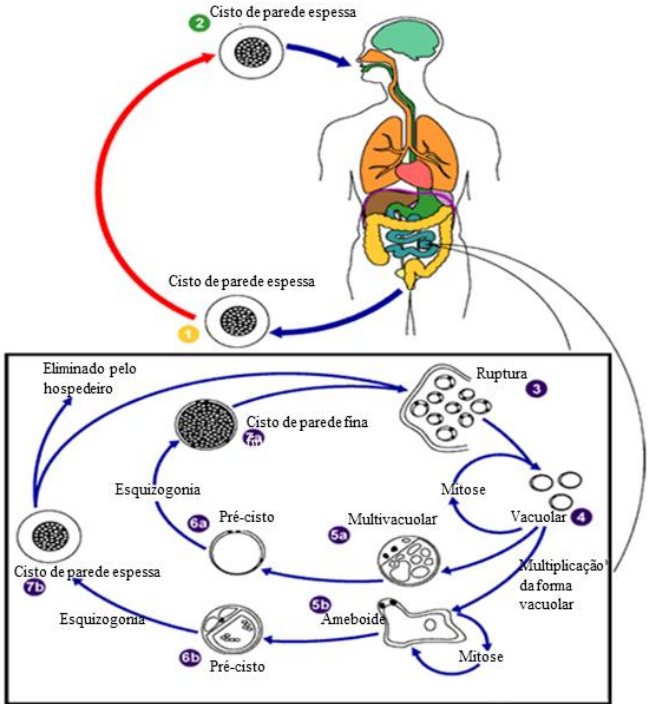

Figura 2 - Ciclo biológico proposto para *Blastocystis* sp. e adaptado de CDC[22]

1.5 Epidemiologia

Blastocystis sp. tem sido apontado em inquéritos parasitológicos como o protozoário de grande ocorrência em amostras fecais humanas[11,24]. Os valores têm variado de 0,5 a 62%, sendo as maiores ocorrências observadas nos países tropicais e em desenvolvimento, o que pode ser atribuído às precárias condições de higiene, contato com animais e consumo de água e alimentos contaminados[5].

Os dados de ocorrência de *Blastocystis* sp. em países desenvolvidos têm variado de 0,5 a 1%, no Japão, podendo chegar a 20% nos Estados Unidos[5]. Por

outro lado, nos países em desenvolvimento, como no Brasil, têm sido reportados valores de 4,6%[10] a 58%[25]. Na China[26] e Tailândia[27], a prevalência pode variar de 1,9 a 32,6%; e de 0,9 a 43,7%, respectivamente. De acordo com Stensvold *et al*.[28], as variações nos valores de prevalência podem estar relacionadas com a população humana estudada e os métodos utilizados para o diagnóstico.

1.6 Diversidade genética e potencial zoonótico

Blastocystis sp. isolados de diferentes hospedeiros são morfologicamente indistinguíveis[11]. Entretanto as análises moleculares do gene SSU-rDNA tem demonstrado a grande diversidade genética, sendo até o momento identificados 17 subtipos (ST1-17), que ocorrem em mamíferos, aves, répteis e anfíbios[1,29]. No quadro 1, está demonstrado a distribuição dos subtipos de *Blastocystis* sp. de acordo com o hospedeiro isolado.

Subtipos	Principais hospedeiros	Referências
ST1-9, ST12	Humano	1, 29, 30
ST1, ST2, ST4, ST5, ST8	Outros mamíferos	6, 29
ST3, ST4, ST7, ST17	Roedores	31,32
ST6, ST7, ST8	Aves	11
ST10-16	Camelo, elefante, canguru	31

Quadro 1- Distribuição dos subtipos de *Blastocystis* sp. de acordo com a literatura consultada.

Em humanos já foram identificados dez subtipos (ST1-9, ST12)[29,30], sendo que ST1-4 são os mais comuns, somando cerca de 90% dos isolados[33]. Os ST5-

ST8 e ST12 são raramente reportados em humanos, sendo frequentemente relatados em outros hospedeiros, por outro lado, o ST9 tem sido reportado apenas no hospedeiro humano[5]. Em relação à distribuição, os ST1, ST2 e ST3 ocorrem mundialmente, enquanto ST4 é comum em alguns países da Europa[34]. Por outro lado, ST6 é raramente reportado entre os europeus e norte-americanos, porém em alguns países da Ásia e do Oriente Médio, como no Egito, Nepal, Japão e Malásia a ocorrência desse subtipo nos isolados humanos tem sido frequentemente relatada[33].

A alta similaridade entre as sequências do gene SSU-rDNA de isolados humanos e de outros animais indicam que alguns subtipos de *Blastocystis* sp. são potencialmente zoonóticos e, que animais podem representar uma fonte de transmissão para humanos[29]. De acordo com alguns estudos ST1, ST2 e ST4 possuem baixa especificidade de hospedeiro, podendo ser encontrado em humanos e animais domésticos, enquanto ST6 e ST7 são considerados subtipos aviários e, têm sido esporadicamente relatados na população humana[15,29].

1.7 Diagnóstico

1.7.1 Diagnóstico parasitológico

Diversos métodos parasitológicos têm sido utilizados para detectar as formas de *Blastocystis* sp. em amostras fecais[35]. O método de concentração por formol éter e o exame direto com lugol são utilizados com frequência, entretanto este organismo pode ser facilmente confundido com outras estruturas, como as leveduras, *Cyclospora* sp. e glóbulos de gordura[1,11,36].

Com isso têm sido recomendados os esfregaços com colorações permanentes e os métodos de cultura xênica para aumentar a sensibilidade do diagnóstico de *Blastocystis* sp.[15]. Em um estudo comparativo, Stensvold *et al*.[36] demonstraram a sensibilidade de 50% para a concentração com formol éter, 82% para o esfregaço permanente corado com tricrômico e 89% para o método de cultura. Em outro estudo similar foi demonstrado que a positividade para *Blastocystis* sp. utilizando o método de cultura foi aproximadamente duas vezes maior (10,6%) em relação a microscopia direta (6,5%)[37]. No entanto a cultura não é um procedimento de diagnóstico na rotina laboratorial. Além disso, os métodos parasitológicos não possibilitam a identificação exata dos diferentes subtipos de *Blastocystis* sp.[15,36].

1.7.2 Diagnóstico molecular

Fragmentos do gene SSU-rDNA tem sido utilizado com frequência para identificação de diferentes organismos e para estudos das relações filogenéticas entre as espécies[28]. As principais vantagens é que são regiões conservadas e que podem ser facilmente amplificadas pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)[28]. Diversos grupos de pesquisa, trabalhando de forma independente, têm utilizado regiões diferentes deste gene para detectar e identificar os subtipos de *Blastocystis* sp. em amostras fecais[15,36,38,39] (Figura 3).

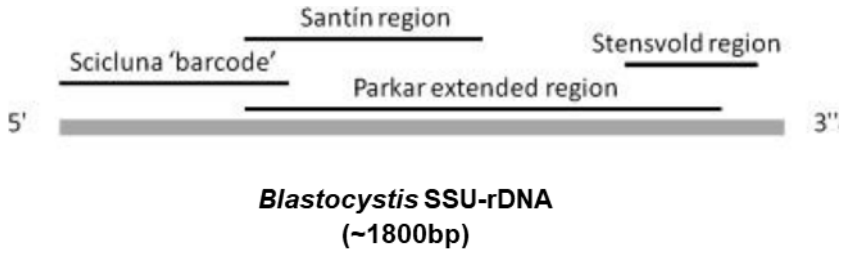

Figura 3- Representação esquemática do gene SSU-rDNA de *Blastocystis*. Regiões do gene utilizadas por vários autores para identificar os subtipos de *Blastocystis* sp., adaptado de Clark *et al*.[5]

A região *barcoding,* descrita por Scicluna *et al*.[38], corresponde a um fragmento de aproximadamente 600bp localizado na extremidade 5' do gene, e é amplificada pelo conjunto de *primers* RD5, específico para eucariotos e, BhRDr específico para *Blastocystis* sp. Esta região tem sido a mais utilizada, principalmente por apresentar alta sensibilidade, além de ser recomendada como marcador de diversidade genética de *Blastocystis*[28].

Por outro lado, *primers* subtipo específico (STS-primers) tem sido utilizados para detectar os subtipos ST1-7[40]. As vantagens estão relacionadas com a identificação de um ou mais subtipos, não necessitando de sequenciamento, porém é considerado pouco sensível, além de não possibilitarem o estudo das variações genéticas intrasubtipo e das relações filogenéticas. Assim pode ser recomendado em situações onde o sequenciamento não é uma opção[28].

Ensaios de PCR em tempo real têm sido desenvolvidos, porém com pouca aplicação. Jones *et al*.[41] utilizaram sondas para amplificar alvos desconhecidos do genoma de *Blastocystis* capazes de detectar os subtipos ST1, ST3 e ST4. Poirier et al.[42] desenvolveram uma PCR em tempo real para o gene SSU-rDNA, para detectar DNA específico dos ST1-9, com 95% de especificidade. De acordo com os estes autores[42] a dificuldade em desenvolver uma PCR em tempo real capaz de

detectar todos os subtipos de *Blastocystis* sp. está na ampla variabilidade genética deste organismo.

1.8 Patogenicidade

Embora *Blastocystis* sp. tenha sido descrito a mais de um século ainda não é certo que possa causar doença em humanos[1]. A maioria dos casos são assintomáticos, ou apresentam sintomas gastrointestinais inespecíficos, como diarreia, dor abdominal, náusea, vômito, fadiga e flatulência[11].

Recentemente tem sido sugerido que *Blastocystis* sp. seja um componente da microbiota intestinal e, que sua patogenicidade possa estar relacionada com a alteração dos componentes dessa microbiota[43,44]. De acordo com alguns autores isso pode ser considerável, uma vez que não se conseguiu chegar a um consenso no papel deste organismo na saúde humana, apesar do grande número de investigações realizadas[1].

Neste contexto, estudos têm avaliado a presença de *Blastocystis* sp. em pacientes com doenças gastrointestinais[45,46]. Coskun *et al.*[47] detectaram uma ocorrência de 8% em pacientes com colite ulcerativa. Em outro estudo foi demonstrado maior ocorrência de *Blastocystis* sp. entre pacientes com Síndrome do Intestino Irritável (IBS), estes apresentaram remissão dos sintomas após o tratamento[48]. De acordo com Roberts et al.[46] a mudança na microbiota intestinal causada por IBS poderia proporcionar condições favoráveis para a colonização desse organismo. Entretanto a falta de um grupo controle adequado e a exclusão de outros possíveis agentes infecciosos tem sido questionado por outros autores[1].

Por outro lado, tem sido proposto que o potencial patogênico de *Blastocystis* sp. possa estar diretamente relacionado com a sua diversidade genética[11]. Alguns

trabalhos têm demonstrado que o ST3, seguido por ST1 e ST2 são mais frequentes em indivíduos sintomáticos do que em assintomáticos[2,49]. Entretanto a falta de correlação definitiva entre subtipos e sintomas sugere que condições inerentes ao hospedeiro possam ter um papel importante na manifestação clínica de *Blastocystis* sp.[6,7].

1.9 Imunodepressão e *Blastocystis* sp.

Doenças infecciosas, particularmente aquelas causadas por patógenos endêmicos, merecem especial atenção, pois apresentam risco considerável para pacientes imunocomprometidos[37,51], sobretudo, aqueles, que receberam transplante de órgãos sólidos[51,52]. Com o aumento do número de transplantes e o desenvolvimento de drogas imunossupressoras mais potentes, a frequência de rejeição tem diminuído, mas, por outro lado os receptores tornaram-se suscetíveis a infecções oportunistas[51,52.]

A incidência e prevalência de infecções parasitárias em receptores de transplantes são pouco conhecida[51]. Recentemente Azami *et al.*[51] demonstraram que 33% de pacientes transplantados renais estavam infectados por uma ou mais espécies de parasitas intestinais. Em um estudo retrospectivo realizado em quatros centros de transplantes no Brasil, foi detectado 14,6% de positividade para *Blastocystis* sp. associado com diarreia após a realização do transplante[52]. Ghosh *et al*.[53] relataram um caso de paciente com leucemia mielóide crônica, com dor abdominal e diarreia aguda após a realização do transplante e o exame microscópico de fezes demonstrou numerosas formas de *Blastocystis* sp.

Neste contexto, *Blastocystis* sp. tem sido apontado como um possível agente oportunista. Wang *et al*.[6] demonstraram à presença de *Blastocystis* sp. no

intestino delgado de suínos imunossuprimidos e, sugeriram que a imunossupressão possa alterar a resposta do hospedeiro fazendo com que *Blastocystis* sp. colonize não somente o intestino grosso, mas também as sessões distais do intestino delgado. Este fato sugere que *Blastocystis* sp. pode ter uma interação diferente com o hospedeiro imunocomprometido promovendo a doença.

Blastocystis sp. permanece envolvido em diversas controvérsias e indefinições, principalmente no que diz respeito a sua capacidade em causar doença em humano[11]. Alguns autores consideram prudentes considerá-lo como um organismo potencialmente patogênico, principalmente em situações de imunodepressão[6]. Assim o diagnóstico e o tratamento de *Blastocystis* sp. em pacientes candidatos a transplante pode contribuir com a qualidade de vida destes pacientes e evitar complicações após a realização do transplante.

2 JUSTIFICATIVA

Diante disto, as doenças infecciosas, de um modo geral, constituem risco considerável para os pacientes imunocomprometidos[52]. Apesar dos pacientes candidatos a transplantes constituírem um grupo de risco para diversas infecções, incluindo aquelas causadas por organismos oportunistas[54], até o momento nenhum trabalho abordou a ocorrência de *Blastocystis* sp. nessa população. Deve-se considerar a possibilidade de gravidade da infecção por *Blastocystis* sp. em pacientes candidatos a transplantes. Associado a isto, tem-se um número reduzido de estudos existentes no Brasil que abordam o diagnóstico molecular de *Blastocystis* sp.[55,56], e em nenhum foi relatado em pacientes imunocomprometidos. Assim estudos que avaliem a ocorrência e a distribuição de subtipos de *Blastocystis* sp. em pacientes candidatos a transplantes podem contribuir para o entendimento da possível relação deste organismo nessa população.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

a) Realizar a detecção molecular de *Blastocystis* sp. em pacientes candidatos a transplantes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC FMUSP).

3.2 Objetivos específicos

a) Verificar a ocorrência de *Blastocystis* sp. em amostras fecais de pacientes candidatos a transplantes renal, de fígado e de medula óssea atendidos no HC FMUSP, utilizando o diagnóstico molecular.
b) Identificar os subtipos de *Blastocystis* sp. presentes nas amostras de DNA dos pacientes candidatos a transplantes atendidos no HC FMUSP.
c) Verificar a diversidade de alelos dentro dos subtipos de *Blastocystis* sp. presente nos isolados obtidos dos pacientes candidatos a transplantes atendidos no HC FMUSP.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC FMUSP) (protocolo n°1.817.111, Anexo 1). Foram selecionadas amostras de fezes de pacientes candidatos a transplantes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC FMUSP) entre os anos de 2011 a 2013. As amostras de fezes selecionadas foram provenientes de pacientes que participaram do projeto intitulado de “Investigação de técnicas diagnósticas para identificação da infecção por *Strongyloides stercoralis* em pacientes com diferentes formas de imunodepressão” (protocolo 0123/10) e estavam armazenadas no Laboratório de Investigação Médica (LIM-06), Imunopatologia da Esquistossomose do HC FMUSP.

4.2 Critérios de inclusão

Amostras fecais que estavam armazenadas em freezer a -20ºC e que possuíam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) devidamente assinado pelo paciente ou responsável.

4.3 Critério de exclusão

Amostras fecais que não possuíam o TCLE assinado pelo paciente ou responsáveis.

4.4 População de estudo

Das 162 amostras fecais de pacientes candidatos a transplantes renal (TR), hepático (TH) e de medula óssea (TMO), 150 foram selecionadas para o presente estudo. O diagnóstico parasitológico das amostras fecais foi realizado no momento da coleta pelas técnicas de sedimentação espontânea, Rugai e cultura em placa de ágar[57]. Em seguida, foi realizada a pesquisa no sistema eletrônico e no banco de dados (LIM/06) para obter as informações sobre: idade, sexo e doenças que levaram a indicação de transplante.

4.5 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit comercial QIAamp® DNA stool MiniKit (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. Aproximadamente 200mg de material fecal foram transferidos para um tubo do tipo eppendorf, seguido pela adição de 1,4mL do tampão ASL, homogeneização por 1 minuto, e incubação a 70°C por 5 minutos. Em seguida, o tubo foi homogeneizado durante 15 segundos, centrifugado a 12.400*g* por 1 minuto, e 1,2mL do sobrenadante foram adicionados em um novo tubo, contendo a pastilha de inibidor. Após a homogeneização, e incubação por 1 minuto em temperatura ambiente, o tubo foi centrifugado a 12.400*g* durante 3 minutos. Em um novo tubo, contendo 15µL de proteinase K, foram transferidos 200µL do sobrenadante e homogeneizado. Em seguida foram acrescentados 200µL do tampão AL, homogeneizado por 15 segundos e incubado a 70°C por 10 minutos. Após a incubação foram adicionados 200µL de etanol absoluto gelado e homogeneizado. Em seguida todo o material foi aplicado na coluna, então centrifugado a 12.400*g* por 1 minuto. O tubo coletor foi substituído e então foram adicionados 500µL do tampão AW1 e centrifugado a 12.400*g* por 1 minuto. Novamente o tubo coletor foi

substituído e adicionados 500µL do tampão AW2 e centrifugado a 12.400*g* por 3 minutos. A coluna foi transferida para um novo tubo e adicionados 50µL do tampão de eluição. Incubado em temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado a 12.400*g* por 1 minuto. Essa etapa foi repetida. A coluna foi descartada e o DNA eluido foi quantificado, distribuído em alíquotas e armazenado em freezer -20°C até o momento do uso.

4.6 Quantificação de DNA nas amostras

A concentração de DNA das amostras foi estimada por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop ND-1000 UV-VIS spectrophotometer v.3.2.1 (NanoDrop Technologies Scientific, Wilmington, Delaware USA). A estimativa de pureza foi dada pela relação da absorbância do DNA/proteína[58].

4.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA extraído foi amplificado utilizando-se *primers* específicos: BhRDr (R:5'-GAGCTTTTTAACTGCAACAACG-3') e RD5 (F:5'-ATCTGGTTGATCCTGC CAGT-3') localizados no SSU-rDNA de *Blastocystis* sp., descrito por Scicluna *et al*.[38], que amplificam um fragmento de aproximadamente 600bp.

A PCR foi realizada em volume final de 20µL, nas seguintes condições: 20 mg/mL de Albumina Sérica Bovina, tampão 5X PCR, 10mM de dNTPs, 25mM de $MgCl_2$, 20pmol/µL de cada primer, 5 U/µL de enzima *GoTaq*® *DNA Polimerase* (Promega Corporation, Madison, USA) e 4µL de DNA (~100ng).

As amostras foram submetidas aos ciclos de amplificação: 94°C por 2 minutos para desnaturação inicial, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto

(desnaturação), 61,8°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão), e uma extensão final de 72°C por 2 minutos. A reação foi realizada no equipamento Master cycler ep gradient S thermocycler (Eppendorf®, Hamburg, Alemanha). Um controle positivo (cultura de *Blastocystis* sp.) e outro negativo (mix da reação de PCR e água destilada) foram incluídos em cada reação.

4.8 Controles

O controle positivo foi obtido a partir da cultura de amostras frescas positivas para *Blastocystis* sp. Estas amostras foram provenientes do laboratório central de parasitologia do HCFMUSP. Para a realização da cultura foi utilizado o protocolo proposto por Zerpa *et al*.[59]. O meio de cultivo foi preparado utilizando fosfato de ácido de sódio 8,95g, fosfato de potássio 1,15g, Cloreto de sódio 20g, extrato de levedura 4g e água destilada, qsp 2.750mL. Depois foi adicionado 5% de soro humano inativado, amido de arroz 2,75g, penicilina 1,000IU/mL e estreptomicina 50-100µg/mL. Posteriormente o meio foi distribuído em tubos de 2,5ml e adicionado cerca de 100mg de amostras fecais positivas para *Blastocystis* sp. Estas culturas foram mantidas a 37°C em estufa em condições de anaerobiose, e examinadas após 24h e 48h em microscopia óptica (Olympus CX 41, Japão) em aumento de 10X e 40X. Em seguida foram centrifugadas a 8.000*g* durante um minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi armazenado em freezer a -20°C até o momento de uso. Para extração do DNA do controle positivo foi utilizado o kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN® Hilden, Germany), como descrito anteriormente no item 4.5.

Como controle da extração de DNA foi utilizado os *primers* universais: 18SEUDIR (F:5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGG-3') e 18SEUINV (R:5'-TAATTTGCGCGCCTGCTG-3'), localizados na região SSU-rDNA de eucariotos,

como descrito por Wang *et al*.[60], que amplificam um fragmento de aproximadamente 140bp.

4.9 Eletroforese

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com *SYBR safe* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA). Para tanto 5µL do produto amplificado foram homogeneizados com 1µL do tampão 10x Bluejuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA), e aplicados no gel de agarose. Foi também aplicado ao gel um marcador molecular de 100 pares de bases (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA), um controle positivo (DNA proveniente de cultura de *Blastocystis* sp.) e um controle negativo (produto de PCR com água destilada). Os géis foram visualizados em transluminador de luz ultravioleta (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, USA) e fotografados para posterior análise.

4.10 Reação de Sequenciamento

Para o sequenciamento foi utilizada à técnica derivada da metodologia de Sanger *et al*.[61] utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes (kit *BigDye® Terminator* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Os produtos com amplificação positiva foram inicialmente purificados pela enzima ExoSAP (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), de acordo com as instruções do fabricante e, posteriormente submetidos ao sequenciamento para incorporação dos didesoxinucleotídeos marcados.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit ABI Prism *BigDye®* *Terminator* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com modificações no protocolo proposto pelo fabricante. Para o sequenciamento foram utilizados 4µL de *BigDye® mix;* 2µL de buffer 5X (200mM Tris-HCI pH 9,0 + 5mM $MgCL_2$); 2µL de cada *primer* (1,6 pmol/µL); 2µL do produto purificado e 10µL de água Mili-Q com volume final de reação de 20µL. O produto da PCR de sequenciamento foi precipitado, em seguida resfriado em banho de gelo e submetido ao sequenciamento automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

4.11 Análise dos dados

As sequências geradas foram avaliadas utilizando o programa BioEdit[62] e alinhadas com outras sequências de *Blastocytis* sp. presentes no banco de dados GenBank utilizando a ferramenta *BLAST*[63]. E em seguida foram submetidas ao banco de *Blastocytis* sp. Multilocus Sequence Typing (*MLST*)[64] para a identificação dos alelos.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população estudada

O presente estudo avaliou 150 amostras de fezes de pacientes candidatos a transplantes renal, hepático e de medula óssea. Das 150 amostras, 56 (37,3%) foram do sexo feminino e 94 (62,7%) do sexo masculino, e idade variando de 19 a 83 anos (Tabela 1).

Tabela 1- Dados dos pacientes candidatos transplantes atendidos no HCFMUSP, de 2011 a 2013.

Grupo	Feminino n(%)	Masculino n(%)	Idade*
TR (n=51)	18 (35,3%)	33 (64,7%)	52,3 (±13,5)
TH (n=48)	17 (35,4%)	31 (64,6%)	55,5 (±12,5)
TMO (n=51)	21 (41,2%)	30 (58,8%)	47,4 (±13,7)

TR – transplante renal; TH – transplante hepático; TMO – transplante de medula óssea; * Média (±desvio padrão).

Diversas doenças justificaram a indicação do transplante nos candidatos. No TR as doenças de base foram: nefropatias hipertensiva, diabética, insuficiência renal crônica sem causa definida, nefrite lúpica, litíase renal e nefropatia pós sepse. Nos pacientes candidatos a TH foram: cirrose causada pelos vírus B e/ou C, cirrose alcóolica, esteatose hepática não alcóolica, cirrose hepática criptogênica, hepatite autoimune, cirrose biliar primária e esquistossomose. Os candidatos TMO as causas apontadas foram mieloma múltiplo, leucemia mielóide aguda, linfoma não Hodgkin, doença de Hodgkin, anemia aplásica grave e mielofibrose.

O resultado do diagnóstico parasitológico das amostras fecais demonstrou ausência de positividade para *Blastocystis* sp. Os pacientes TR apresentaram 11 amostras positivas (9 para *Strongyloides stercoralis* e duas para *Entamoeba coli*). Os TH apresentaram quatro amostras positivas (três para *S. stercoralis* e uma para *Endolimax nana*), e de TMO outras quatro (duas para *S. stercoralis* e duas para *E. coli*).

5.2 Diagnóstico molecular

A Reação em Cadeia de Polimerase foi inicialmente padronizada utilizando os *primers* específicos, que amplificam o fragmento de aproximadamente 600bp (Figura 4).

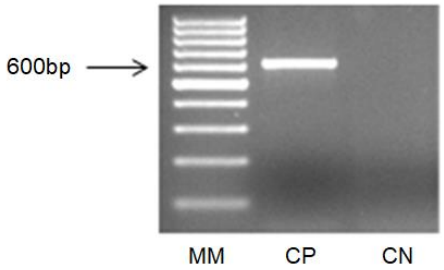

Figura 4- PCR utilizando *primers* específicos que amplificam o fragmento de aproximadamente 600bp localizado SSU-rDNA de *Blastocystis* sp. CP (controle positivo – cultura de *Blastocystis* sp.), CN (controle negativo – mix de PCR com água destilada) e MM (marcador de massa molecular 100bp, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

A amplificação do alvo nos pacientes candidatos a transplantes foi de 16,7% (25/150), sendo 33,3% (17/51) entre os TR, 10,4% (5/48) entre os TH e apenas 5,9% (3/51) entre os TMO.

Na Figura 5 estão demonstradas as 17 amostras de fezes com amplificação positiva de DNA para o alvo entre os candidatos a transplante renal. E nas Figuras 6 e 7 estão demonstradas as amostras com amplificação para o alvo entre os pacientes candidatos a transplante hepático e de medula óssea, respectivamente. Pode-se observar que em algumas amostras, como no TR (amostra 09, Figura 5) e TH (amostras 01 a 04, Figura 6), ocorreu amplificação inespecífica, com produtos de diferentes tamanhos.

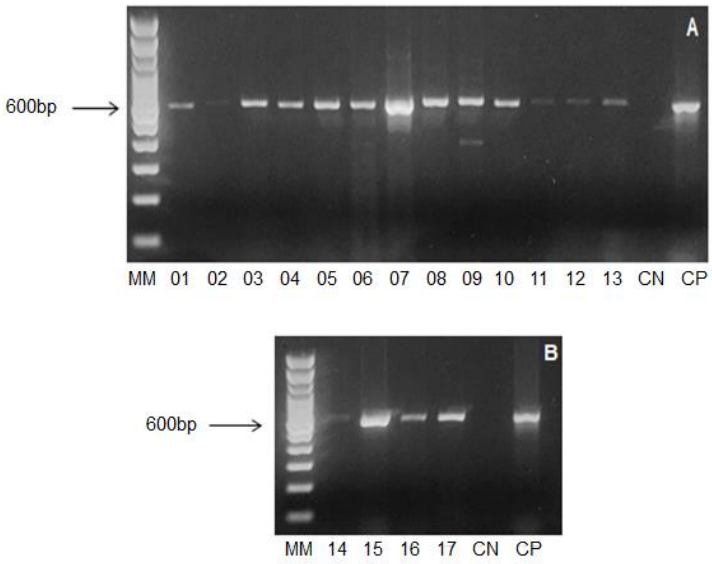

Figura 5- Amplificação de DNA em amostras fecais (1 ao 17, A e B) de pacientes candidatos a transplante renal utilizando *primer* específico localizado na região de SSU-rDNA de *Blastocystis* sp. (~600bp). CP (controle positivo – cultura de *Blastocystis* sp.), CN (Controle negativo – mix de PCR com água) e MM (marcador de massa molecular 100bp, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

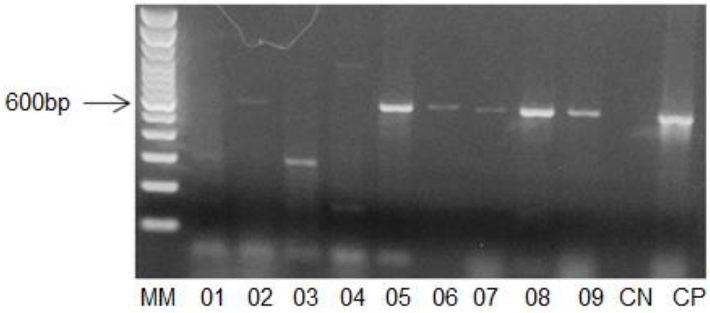

Figura 6- Amplificação de DNA em amostras de fezes (1 a 9) de pacientes candidatos a transplante hepático, utilizando *primer* específico localizado na região SSU-rDNA de *Blastocystis* sp. (~600bp). CP (controle positivo – cultura de *Blastocystis* sp.), CN (controle negativo – mix de PCR com água), e MM (marcador de massa molecular 100bp, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

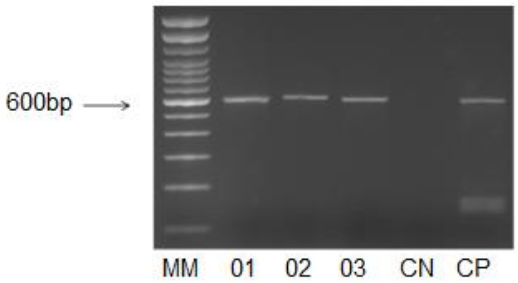

Figura 7- Amplificação de DNA em amostras de fezes (1 a 3) de pacientes candidatos a transplante de medula óssea, utilizando *primer* específico localizado na região de SSU-rDNA de *Blastocystis* sp. (~600bp). CP (controle positivo – cultura de *Blastocystis* sp.), CN (controle negativo – mix de PCR com água), e MM (marcador de peso molecular 100bp, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

As amostras de DNA (n=125) sem amplificação do alvo (~600bp) foram submetidas a uma PCR em triplicata. Após a nova PCR não foi observada amplificação. Assim foi realizada a PCR utilizando *primer* universal (fragmento de 140bp), como controle da extração de DNA (Figura 8). E pode-se observar que todas apresentaram o fragmento de 140bp.

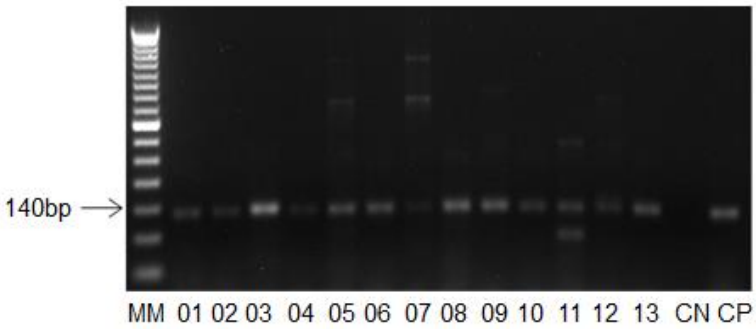

Figura 8- Amplificação de DNA em amostras fecais de pacientes candidatos a transplante utilizando *primer* universal (~140bp). CP (controle positivo – cultura de *Blastocystis* sp.), CN (controle negativo – mix de PCR com água) e MM (marcador de massa molecular de 50bp, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

As amostras com amplificação para o alvo (~600bp) foram submetidas ao sequenciamento. As sequências foram submetidas à base de dados, e em 24 amostras houve confirmação de *Blastocystis* sp., com identidade variando de 87 a 100%. Uma única amostra, com amplificação de ~600bp não foi confirmada ser *Blastocystis* sp., sendo identificada como *Galactomyces geotrichum*, com identidade de 86%.

Entre as 24 sequências confirmadas como sendo *Blastocystis* sp. foram identificados os seguintes subtipos: ST1 em 9 (37,5%) amostras, ST2 em 3 (12,5%), ST3 em 11 (45,8%) e o ST7 em apenas uma amostra (4,2%) (Tabela 2). Pode-se observar que a maioria dos isolados dentro do TR foi o ST1, seguido pelo ST3, enquanto que nos TH e TMO o ST3 foi o mais frequente.

Tabela 2- Distribuição dos subtipos de *Blastocystis* sp. em pacientes candidatos a transplantes, HCFMUSP, em 2011 a 2013.

	%(n/total de isolados em cada subtipo)			
Grupo	ST1	ST2	ST3	ST7
TR	50,0 (8/16)	6,25 (1/16)	37,5 (6/16)	6,25 (1/16)
TH	-	40,0 (2/5)	60,0 (3/5)	-
TMO	33,3 (1/3)	-	66,7 (2/3)	-
Total	37,5 (9/24)	12,5 (3/24)	45,8 (11/24)	4,2 (1/24)

TR – Transplante Renal; TH – Transplante Hepático; TMO – Transplante de Medula Óssea.

Na pesquisa utilizando a base de dados *(MLST)* foram identificados os alelos: 4, 78/81 (ST1); 11 e 12 (ST2); 34, 36, 37 e 54 (ST3) e 96 (ST7). É importante ressaltar que uma amostra do ST1 não formou o *"contig"*, e quando as sequências individuais (originarias dos primers *"forward"* e *"reverse"*) foram analisadas a base de dados (*MLST*) foi identificado um alelo em cada sequência, caracterizando uma infecção mista por dois alelos (78 e 81).

Pode-se observar que somente um único alelo foi identificado no ST7. No ST1 foram identificados os alelos 4 (8/9) e 78/81(1/9), com frequências de 88,9 e 11,1%, respectivamente. No ST2 foram identificados os alelos, 11 (1/3) e 12 (2/3), com frequências de 33,3% e 66,7%, respectivamente. No ST3 foram identificados quatro alelos 34 (4/11), 36 (4/11), 37 (2/11) e 54 (1/11), com frequências variando de 9,1 a 36,4% (Gráfico 1).

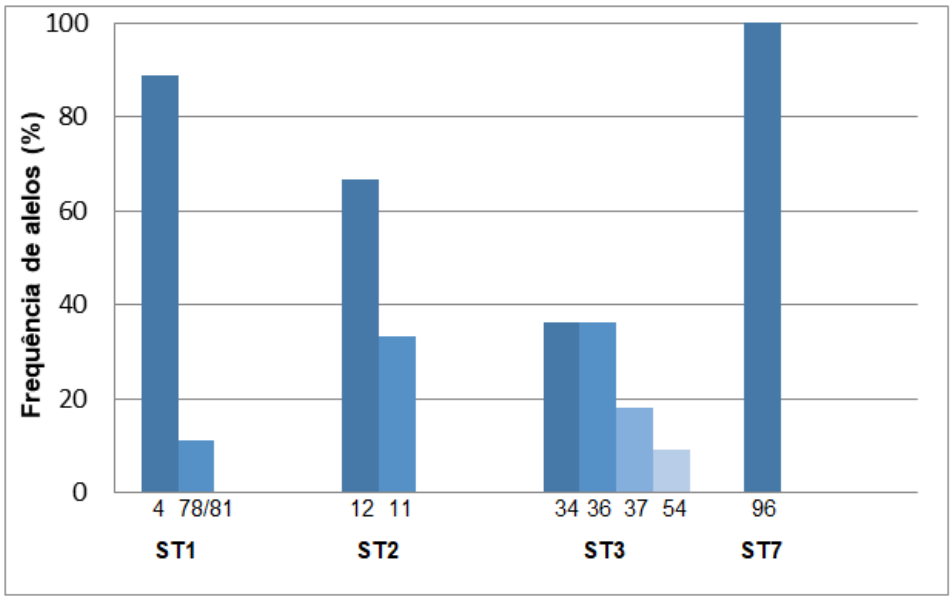

Gráfico 1- Distribuição e frequência dos alelos dentro dos subtipos de *Blastocystis* sp. em pacientes candidatos a transplantes.

A distribuição dos subtipos e seus respectivos alelos, de acordo com a amostra em cada grupo de candidatos a transplante estão demonstrados na Tabela 3. Observou-se que dentre o TR, o ST1 foi o subtipo mais frequente, seguido pelo ST3, que apresentou uma maior diversidade de alelos. Nos TH e TMO, a maior frequência foi do ST3.

Tabela 3- Distribuição dos subtipos de *Blastocystis* e seus respectivos alelos de acordo com a identificação das amostras.

Identificação das amostras	Subtipo	Alelo
Transplante Renal		
01TR	ST3	36
04TR	ST3	34
07TR	ST3	36
09TR	ST3	34
10TR	ST1	04
11TR	ST1	04
22TR	ST1	04
26TR	ST1	04
27TR	ST3	36
29TR	ST1	04
30TR	ST1	04
31TR	ST1	78 e 81
35TR	ST7	96
42TR	ST1	04
48TR	ST3	54
55TR	ST2	12
Transplante Hepático		
22TH	ST2	11
26TH	ST2	12
32TH	ST3	36
33TH	ST3	37
47TH	ST3	34
Transplante de Medula óssea		
06TMO	ST3	34
36TMO	ST1	04
46TMO	ST3	37

5.3 Árvore filogenética

Na figura 9 está demonstrada a distribuição dos subtipos de *Blastocystis* sp. identificados nas amostras dos candidatos a transplante. Pode-se observar que as sequencias obtidas dos isolados TR31F e TR31R, estão agrupados dentro do ST1, porém em ramos diferentes.

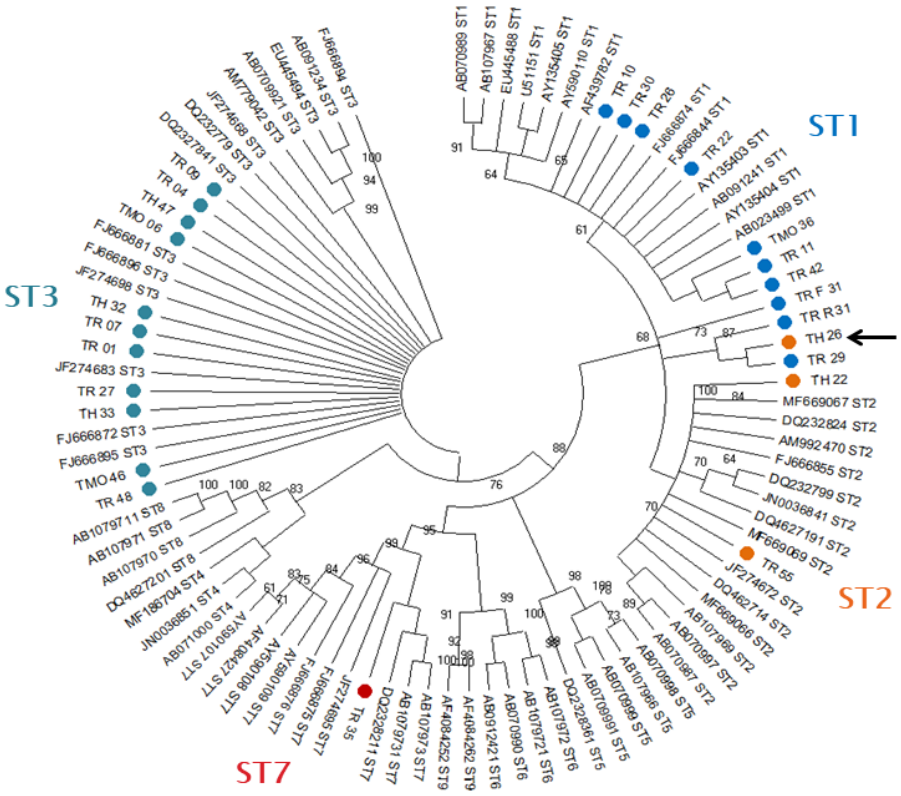

Figura 9- Árvore filogenética mostrando as relações evolutivas inferidas dos subtipos de *Blastocystis* sp. identificados nas amostras dos candidatos a transplante. A seta indica a amostra ST2 agrupada dentro do ramo ST1. A análise foi conduzida utilizando o método Neighbor-Joining. Valores de *bootstrap* inferiores a 50% não foram exibidos.

Pode-se observar que uma amostra identificada como ST2 (TH 26) ficou agrupada dentro do ramo do ST1, o que pode nos indicar o quanto são discretas as diferenças entre os subtipos.

6 DISCUSSÃO

Blastocystis sp. é um protozoário gastrointestinal de distribuição mundial frequentemente relatado como o organismo de maior ocorrência em inquéritos parasitológicos[24]. Em alguns estudos tem sido apontado como um importante agente causador de doença gastrointestinal, especialmente em condições de imunodepressão[37,50]. No entanto são escassos os dados de prevalência em pacientes imunocomprometidos, a maioria dos trabalhos são realizados com pacientes HIV/Aids ou com câncer[50], ou ainda a número restrito de relatos de casos com pacientes pós-transplante[65]. Assim este é o primeiro estudo que avalia a ocorrência de *Blastocystis* sp. em pacientes candidatos a transplantes, sobretudo utilizando a análise molecular.

Alguns estudos têm apontado uma maior positividade de *Blastocystis* sp. em pacientes imunocomprometidos em relação ao grupo controle[51,66,67]. Estes estudos apontam que o comprometimento da imunidade nestes pacientes pode ocasionar diarreia e outros sintomas gastrointestinais.

Considerando estudos com pacientes imunocomprometidos (em diferentes condições) e baseados no diagnóstico parasitológico, as positividades para *Blastocystis* sp. variaram de 2 a 55%[68-71] dependendo da população estudada e da técnica parasitológica de escolha. No presente estudo não foi observada amostra positiva pelas técnicas parasitológicas, provavelmente devido a utilização de métodos parasitológicos (Sedimentação espontânea, Rugai e cultura em Placa de ágar) não indicados para a pesquisa deste organismo. Diversos autores reforçam que os métodos parasitológicos convencionais possuem baixa sensibilidade[35,36,72] e para facilitar a identificação tem sido recomendado as colorações permanentes,

e/ou os métodos de cultura[36,73]. Por outro lado, tem sido relatado que alguns subtipos não apresentam bom crescimento em determinados meios de cultura[13,37].

A amplificação e o sequenciamento de diferentes regiões do gene SSU-rDNA tem sido utilizada para a pesquisa de DNA de *Blastocystis* sp. em amostras fecais[15,36,39]. Em 2006, Scicluna *et al*.[38] descreveram a região *barcoding,* com aproximadamente 600bp. De acordo com alguns trabalhos à amplificação dessa região além de aumentar sensibilidade do diagnóstico, pode ser utilizada como um marcador de diversidade genética deste organismo[1,28,74].

Por outro, tem sido relatado que esses iniciadores podem amplificar DNA inespecífico na ausência ou em pouca quantidade de DNA de *Blastocystis* sp.[1] No presente trabalho todas as sequencias geradas foram confirmadas na base de dados como *Blastocystis* sp., com exceção de uma única amostra com amplificação no tamanho esperado (~600bp), que após o sequenciamento não foi correspondente ao *Blastocystis* sp.

Nossos resultados demonstraram que 16% das amostras fecais dos candidatos a transplantes apresentaram amplificação de DNA de *Blastocystis* sp. Esta positividade foi menor quando comparada a outros estudos moleculares realizados no Brasil em outras populações[55,75]. Como no estudo realizado em moradores da cidade de Botucatu, no Estado de São Paulo foi demonstrado a positividade de 71% de *Blastocystis* sp., utilizando métodos moleculares[75].

É válido ressaltar que existe uma lacuna de registros ou relatos de *Blastocystis* sp. na população de candidatos a transplante, por isso as possíveis discussões foram baseadas na população imunocomprometida em geral, ou ainda em pacientes com patologias que possam justificar transplantes renais, fígado e medula óssea. A imunodepressão que o presente estudo se refere está relacionada

com as doenças de bases. Outro ponto importante é que não foi encontrado registros de sintomas gastrointestinais nas fichas dos pacientes incluído no presente estudo.

Em pacientes com doença renal crônica, uma possível doença que pode predispor ao transplante de rins, estudos realizados no Brasil baseados em métodos parasitológicos, apontam uma ocorrência de 20,1%[68] e 24,5%[70] para *Blastocystis* sp. No entanto, estudos realizados em transplantados renais, Naeini *et al*.[69] relatam 4,7% de positividade considerando técnicas parasitológicas. Rao *et al*.[65] descreveram *Blastocystis* sp. como importante agente responsável por diarreias neste grupo. No presente estudo foi observada uma positividade de 31,4% para DNA de *Blastocystis* sp. entre os candidatos a TR.

Nos candidatos a TH foram detectados DNA de *Blastocystis* sp. em 10,4% das amostras analisadas. É válido reforçar que na literatura atual são escassos os dados sobre a ocorrência deste organismo em candidatos a transplante, sobretudo no que se refere ao grupo hepático. Recentemente foi descrito formas vacuolares em paciente após transplante hepático[76]. Em outro estudo avaliando pacientes com cirrose hepática, foi demonstrado que 21,6% apresentaram DNA de *Blastocystis* sp.[77]

Em relação ao grupo TMO, em um estudo realizado no Egito foi observado que 55% dos indivíduos com leucemia linfoide foram positivos para *Blastocystis* sp. por técnicas parasitológicas[71]. No presente trabalho apenas 5,9% apresentaram amplificação do fragmento de DNA de *Blastocystis* sp. entre os candidatos a transplante de medula óssea. Nossos resultados foram inferiores aos reportados por Poirier *et al*.[42], com 16% de positividade, e Tasova *et al*.[78], com 13% de positividade, em pacientes com neoplasias hematológicas, utilizando a PCR em

tempo real e a microscopia direta, respectivamente.

Tem sido especulado que *Blastocystis* sp. pode ser um patógeno gastrointestinal oportunista, e que em hospedeiros imunocomprometidos, a imunossupressão pode ser um importante fator para o desenvolvimento de doença. Neste contexto, dois estudos realizados com modelos experimentais demonstram que os animais imunossuprimidos apresentaram uma predisposição a colonização do intestino delgado em relação aos animais imunocompetentes[6,7]. No estudo realizado com camundongos imunossuprimidos, os exames histopatológicos demonstraram a presença de formas de *Blastocystis* sp. em todas as camadas do intestino delgado, além de esfoliação epitelial e infiltrado inflamatório na submucosa[7]. Porém a análise histológica do intestino delgado não revelou evidência de patologia causada por *Blastocystis* sp. em suínos imunocomprometidos[6].

Por outro lado, existem algumas evidências de que *Blastocystis* sp. possa causar infecção oportunista em humanos imunocomprometidos. Em um estudo realizado no Egito foi detectado *Blastocystis* sp. em 12,1% dos indivíduos imunocomprometidos e em 7,2% dos pacientes imunocompetentes[66]. Mariam *et al*.[79] reportaram *Blastocystis* sp. como principal causa de diarreia em pacientes com HIV/Aids e sugeriram o tratamento deste organismo a fim de melhorar a qualidade de vida destes pacientes. De acordo com Marcos e Gotuzzo[80], pacientes com HIV/Aids e transplantados são mais suscetíveis a desenvolverem os sintomas associados com presença de *Blastocystis* sp. Neste contexto, a diversidade genética e a resposta imune do hospedeiro podem ser fatores importantes para o desenvolvimento da infecção[37,50]

A análise molecular baseada no gene SSU-rDNA tem apontado 17 subtipos de *Blastocystis*, encontrados em humanos, outros mamíferos e aves[5]. Os subtipos encontrados neste estudo foram ST3 (45,8%), ST1 (37,5%), ST2 (12,5%) e ST7 (4,2%), similar ao reportado na literatura. Segundo Alfellani *et al*.[33] a maioria dos isolados humanos correspondem ao ST3, seguido por ST1, ST2 e ST4. No entanto o ST4 não foi isolado no presente trabalho, o que pode ser explicado pela distribuição geográfica deste subtipo, na qual tem sido reportada em apenas 2% dos isolados na América do Sul[30]. Por outro lado, o ST4 tem sido frequentemente reportado em alguns países da Europa[34,42]. No Brasil, alguns trabalhos já tinham apontado a maior ocorrência dos ST3, seguido por ST1 e ST2[55,56,75]. Com exceção de Malheiros et al.[81] que detectaram maior frequência do ST1 (41%), seguido por ST2 (32%) e ST3 (17%), em uma população indígena da região Amazônica no Estado do Mato Grosso.

Segundo a literatura, ST5-9 são raramente encontrados em humanos[1]. ST6 e ST7 são comumente detectados em aves na Ásia e no Oriente Médio[11]. No Brasil, ST6 foi isolado de humanos em dois trabalhos[55,56] realizados no estado de São Paulo. No presente estudo não foi observado à presença de ST6, entretanto ST7 foi isolado em 4,2%, similar ao reportado recentemente por Oliveira-Arbex *et al*.[75] na cidade de Botucatu. Na América do Sul a prevalência registrada para ST7 foi de apenas 2,3%[30]. De acordo com Yoshikawa *et al*.[32] ST7 é raramente encontrado em humanos (3,9%), podendo ser identificado em roedores. Meloni *et al*.[82] encontraram ST7 e ST8 em 2,9% dos isolados humanos na Itália. Embora no presente estudo não fosse identificado os ST8 e ST9, o ST8 recentemente foi isolado em 7% dos moradores da zona rural no Estado do Rio de Janeiro[83].

Tem sido sugerido que a diversidade genética de *Blastocystis sp*. pode estar relacionada ao potencial patogênico deste organismo[5,11]. Assim diversos estudos

têm sido realizados para identificar os subtipos de *Blastocystis* em indivíduos saudáveis e sintomáticos, entretanto até o momento nenhum subtipo específico foi relacionado de forma consistente à manifestação de sintomas[1].

Neste trabalho foram observados os subtipos ST1, ST2, ST3 e ST7 entre indivíduos candidatos a transplantes, ST3 foi o subtipo de maior ocorrência sendo encontrado nos três grupos. Nossos resultados foram similares ao reportado em estudos realizados em pacientes com HIV/aids e câncer[37,50]. No presente estudo não foi observada relação entre os subtipos e o tipo de indicação ao transplante.

Em um trabalho realizado na França em pacientes com neoplasias hematológicas foram encontrados quatro diferentes subtipos ST3, ST4, ST6 e ST7, sendo que ST4 foi observado com maior frequência[42]. No presente trabalho foram encontrados apenas dois subtipos ST1 e ST3 em pacientes candidatos a transplante de medula óssea, que pode ser devido à baixa ocorrência de *Blastocystis* sp. encontrada neste grupo.

A análise das sequencias gênicas multilocus *(MLST)* tem demonstrado a existência de diversidade genética dentro dos subtipos de *Blastocystis sp*.[30]. Neste trabalho foram identificados os alelos 34, 36, 37 e 54 dentro do ST3, similar aos resultados observados por Melo *et al*.[56], reforçando a maior variabilidade genética dentro deste subtipo. Embora existam poucos estudos sobre as sequências do MLST, alguns autores apontam para a sua importância na compreensão de questões relacionadas com a patogenicidade e a transmissão zoonótica deste organismo[1].

Com este enfoque, tem sido reportado que a discriminação de alelos pode fornecer informações úteis sobre a especificidade do hospedeiro[33,84]e distribuição geográfica de *Blastocystis sp*.[2,30], além de uma correlação com manifestações

clínicas[85]. No presente estudo foram identificados diferentes alelos, mas os resultados são contrários aos obtidos por estudos anteriores[33,84], ou seja, menor número de alelos dentro de cada ST. Foi identificado somente dois alelos (4 e 78) no ST1, com predominância no alelo 4. Em estudo realizado em amostras humanas na Colômbia, foi demonstrada a presença dos alelos 1, 2, 4, 82 e 83 no ST1, com maior predominância do alelo 2[84].

No presente estudo, dentro do ST3 foram identificados os alelos 34, 36, 37 e 54. Estes e outros alelos foram observados em amostras humanas e de primatas não humanos[33]. Os resultados de Ramírez *et al*.[84] apontam para uma grande diversidade de alelos (9 diferentes alelos) dentro do ST3.

O ST7 tem sido descrito comumente em aves, e raramente em humanos[11,32]. Por outro lado, no presente estudo foi identificado o ST7 (alelo 96), diferente dos resultados encontrados por Ramírez *et al*.[84], que não observaram o ST7.

O papel patogênico de *Blastocystis* sp. é ainda muito controverso. Recentes estudos apontam *Blastocystis* sp. como um componente da microbiota intestinal humana[86-88]. Estes estudos são suportados principalmente pela alta ocorrência de *Blastocystis sp*. em indivíduos saudáveis associada à falta de evidências direta de patologia[1,89,90]. Tito *et al*.[91] observaram a presença de *Blastocystis* sp. em 30% dos indivíduos saudáveis e em apenas 4% dos pacientes com a doença do intestino inflamado. De acordo com Scanlan *et al*.[92] *Blastocystis* sp. é um organismo comum da microbiota intestinal humana, podendo ser encontrado em mais de 50% dos indivíduos saudáveis e que sua patologia depende das variações genéticas apresentadas pelo organismo.

Assim algumas análises associam a presença deste organismo com uma maior diversidade na microbiota intestinal[86-88]. No entanto, alguns estudos indicam

que ocorre uma redução de bactérias benéficas na presença de *Blastocystis* sp[44]. Um estudo recente sobre a associação entre componentes da microbiota intestinal e encefalopatia hepática sugere que a ausência de *Blastocystis* sp. está relacionada com a gravidade da lesão hepática[77]. Essas discrepâncias podem ser devidas a complexa natureza genética de *Blastocystis*, ou seja, a presença de diferentes subtipos, os quais podem influenciar a microbiota intestinal[91]. Assim subtipos distintos exibem diferentes taxas de crescimento, suscetibilidade a drogas, intervalos de hospedeiros e outras características biológicas[16], que poderiam atuar diretamente na composição desta microbiota[91].

Em uma recente discussão sobre o papel patogênico de *Blastocystis* sp. em pacientes com doenças renais crônicas, Salinas[93], aborda questões importantes, que devem ser consideradas de um modo geral. Neste contexto, Salinas[93] enfatiza que infelizmente o papel de *Blastocystis* como causa de doença esta longe de ser completamente compreendido, uma vez que, envolve o estudo de vários fatores relacionados com o número e morfologia de parasitas, resposta imune do hospedeiro, resposta ao tratamento e técnicas laboratoriais utilizadas, e até agora apontam para dados contraditórios. Além de ensaios clínicos bem desenhados que abordem seu potencial caráter patogênico.

O presente trabalho apresenta algumas limitações que podem estar relacionadas principalmente com as técnicas parasitológicas utilizadas para o diagnóstico parasitológico. Neste contexto vale ressaltar que o objetivo do projeto originário foi a pesquisa de *S. stercoralis*. Além disso, observou-se a ausência de sintomas nos registros que possam estar relacionados com a presença de *Blastocystis* sp.

Contudo este é o primeiro estudo envolvendo a caracterização molecular de *Blastocystis* sp. em amostras de fezes de pacientes candidatos a transplantes.

Assim os presentes resultados confirmaram a maior ocorrência do subtipo ST3, seguido pelo ST1 e ST2 nos isolados. Além disso, reforça a importância de novas pesquisas relacionadas com a presença de *Blastocystis* sp. em pacientes imunocomprometidos, até então pouco explorada.

7 CONCLUSÕES

a) Ocorrência de 16% de *Blastocystis* sp. nos pacientes candidatos a transplantes atendidos no HCFMUSP, utilizando a pesquisa de DNA.

b) Foram identificados os subtipos ST1, ST2, ST3 e ST7, sendo o ST3 o mais prevalente entre os isolados.

c) A maior diversidade de alelos foi observada dentro do ST3.

REFERÊNCIAS

1. Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: a personal view. Parasitol Int. 2016;65(6):763-771.

2. Ramírez JD, Flórez C, Oliveira M, Beernal MC, Giraldo JC. *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from diferente geographical regions of Colombia. Plos One. 2017;12(2):e0172586. doi: 10.1371/journal.pone.0172586. eCollection 2017

3. Zhang W, Ren G, Zhao W, Yang Z, Shen Y, Sun Y, et al. Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* and subtyping of *Blastocystis* in cancer patients: relationship to diarrhea and assessment of zoonotic transmission. Front Microbiol. 2017;8:1835. doi: 10.3389/fmicb.2017.01835. eCollection 2017.

4. Riabi TR, Mirjalali H, Haghighi A, Nejad MR, Pourhoseingholi MA, Poirier P, et al. Genetic diversity analysis of *Blastocystis* subtypes from both symptomatic and asymptomatic subjects using a barcoding region from the 18S rRNA gene. Infect Genet Evol. 2018;61:119-26.

5. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in *Blastocystis* research. Adv parasitol. 2013;82:1-32.

6. Wang W, Bielefeldt-Ohmann H, Traub RJ, Cuttell L, Owen H. Location and pathogenic potential of *Blastocystis* in the porcine intestine. Plos One. 2014;9(8): e103962 doi: 10.1371/journal.pone.0103962

7. Abdel-Hafeez EH, Ahmad AK, Abdelgelil NH, Abdellatif MZ, Kamal AM, Hassanin KM, et al. Immunopathological assessments of human *Blastocystis sp*. in experimentally infected immunocompetent and immunosuppresed mice. Parasitol Res. 2016;115(5):2061-71.

8. Alexieff, A. Sur la nature des formations dites "Kystes de *Trichomonas intestinalis*." C R Soc Biol. 1911;71:296-98.

9. Brumpt, E. *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines. Bull Soc Pathol Exot. 1912;5:725-30.

10. Miné JC, Rosa JA. Frequency of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in stool samples examined at the parasitology Laboratory of the school of pharmaceutical sciences at the São Paulo State University, Araraquara. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(6):565-69.

11. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis sp*.Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):639-65.

12. Zierdt CH, Rude WS, Bull BS. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. Am J Clin Pathol. 1967;48(5):495-501.

13. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. Nature. 1996;4:380-98.

14. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, NakamuraY , Nakamura G, Nakamura F. et al. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of Stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. J Eucaryot Microbiol. 2002;49(1):42-53.

15. Parkar U, Traub RJ, Kumar S, Mungthin M, Vitali S, Leelayoova S, et al. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. Parasitol. 2007;134:359-367.

16. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E. Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. Trends Parasitol. 2007;23(3):93-6.

17. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. Clin Microb Rev. 1996;9(4):563-84.

18. Vdovenko AA. *Blastocystis hominis*: origin and significance of vacuolar and granular forms. Parasitol Res. 2000;86:8-10.

19. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*- past and future. Clin Microbiol Rev. 1991;4:61-79.

20. Vassalos CM, Spanakos G, Vassalou E, Papadopoulou C, Vakalis N. Differences in clinical significance and morphologic features of *Blastocystis sp* subtype 3. Am J Clin Pathol. 2010;133:251-58.

21. Yamada M, Yoshikawa H. Morphology of human and animal *Blastocystis* isolates with special references to reproductive modes. Parasitol Res. 2012;4:9-35.

22. Centers for Disease Control and prevention. Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria. [cited 2019 May 7]. Avaliable from: http://www.cdc Prevention.www.cdc.gov/dpdx/blastocystis/index.html

23. Singh M, Suresh K, Ho LC, Ng GC, Yap EH. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. Parasitol Res. 1995;81:446-450.

24. Piubelli C, Soleymanpoo H, Giorli G, Formenti F, Buonfrate D, Bisoffi Z, et al. *Blastocystis* prevalence and subtypes in autochthonous and immigrant patients in a referral centre for parasitic infections in Italy. Plos One. 2019;14(1):e0210171. doi: 10.1371/journal.pone.0210171.

25. Borges JD, Alarcon RS, Amato Neto V, Gakiya E. Parasitoses intestinais de indígenas da comunidade Mapuera (Oriximiná, Estado do Pará, Brasil): elevada prevalência de *Blastocystis hominis* e encontro de *Cryptosporidium* sp e *Cyclospora cayetanensis*. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(3):348-50.

26. Li L, Zhang X, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z. et al. Cross sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. Parasitol Res. 2007;102:83-90.

27. Saksirisampant W, Nuchprayoon S, Pradniwat P, Lamchuan D. Boeck and Drbohlav Locke egg serum medium for detection of *Blastocystis hominis*. Chula Med J. 2010; 54(6):527-36.

28. Stensvold CR. *Blastocystis*: genetic and molecular methods for diagnosis and epidemiology. Trop Parasitol. 2013;3(1):26-34.

29. Wang J, Gong B, Liu X, Zhao W, Bu T, Zhang Z, et al. Distribution and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes in various mammal and bird species in northeastern China. Parasit Vectors. 2018;11(1):522. doi: 10.1186/s13071-018-3106-z.

30. Ramírez JD, Sánchez A, Hernández C, Flórez C, Bernal MC, Giraldo JC, et al. Geografhic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. Infect Genet Evol. 2016;41:32-5.

31. Wawrzyniak L, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, et al. *Blastocystys*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. Ther Adv Infect Dis. 2013;1(5):167-78.

32. Yoshikawa H, Abe N, Wu Z. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. Microbiol. 2004;150:1147-51.

33. Alfellani MA, Stenvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Trop. 2013;126:11-18.

34. Domínguez-Márquez MV, Guna R, Muñoz C, Gómez-Muñoz MT, Borrás R. High prevalence os subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). Parasitol Res. 2009;105:949-55.

35. Nascimento SA, Moitinho ML. *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a community of Pitanga city, Paraná Estado, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2005;47(4):213-7.

36. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA- based methods: a comparatice study. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;59:303-307.

37. Yersal O, Malatyali E, Ertabaklar H, Oktay E, Barutca S, Ertug S. *Blastocystis* subtypes in cancer patients: Analysis of possible risk factors and clinical characteristics. Parasitol Int. 2016;65:792-6.

38. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. Protist. 2006;157(1):77-85.

39. Santín M, Gómez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis sp*. from humans and animals. Parasitol Res. 2011;109(1):205-12.

40. Yoshikawa Y, Nagano I, Wu Z, Yap EH, Singh M, Takahashi Y. Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. Mol Cel Probes. 1998;12(3):153-9.

41. Jones MS, Ganac, Hiser, Hudson GN, Andy Le A, Whipps CM. Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. Parasitol Res. 2008;103:551-7.

42. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, Alaoui HE, Delbac F, Livrelli V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in Human stool samples: prospective study of patients with hematological Magnancies. J Clin Microbiol. 2011;49(3):975-83.

43. Pandey PK, Siddharth J, Verma P, Bavdekar A, Patole MS, Shouche YS. Molecular typing of fecal eukaryotic microbiota of human infants and their respective mothers. J Biosci. 2012;37:221-6.

44. Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B , NkoudMongo C , Wawrzyniak, Cian A, et al. *Blastocystis* Is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. Plos One. 2014;9(11):e111868. doi: 10.1371/journal.pone.0111868. eCollection 2014.

45. Dogruman-Al F, Kustimur S, Yoshikawa H, Tuncer C, Simsek Z, Tanyuksel, et al. *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. Mem Inst Oswaldo Cruz, RJ. 2009;104(5):724-7.

46. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis sp* Gut Pathog. 2014;6: doi: 10.1186/1757-4749-6-17

47. Coskun A, Malatyali E, Ertabaklar H, Yasar MB, Karaoglu AO, Ertug S. *Blastocystis* in ulcerative colitis patients: Genetic diversity and analysis of laboratory findings . Asian Pac J Trop Med. 2016;9(9):916-9.

48. Mumcuoglu I, Coskun FA, Akasu N, Purnak T, Gungor C. Role of *Dientamoeba fragilis and Blastocystis sp*. in irritable bowel syndrome. Turk Parazitol Derg. 2013;37(2):73-77.

49. Jalallou N, Iravani S, Rezaeian M, Alinaghizade A, Mirjalali H. Subtypes distribution and frequency of *Blastocystis sp* Isolated from diarrheic and non-diarrheic patients. Iran J Parasitol. 2017;12(1):63-68.

50. Tan TC, Ong SC, Suresh KG. Genetic variability of *Blastocystis sp* isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. Parasitol Res. 2009;105:1283-6.

51. Azami M, Sharifi M, Hejazi SH, Tazihibi M. Intestinal parasitic infections in renal transplant recipientes. Braz J Infect Dis. 2010;14(1):15-8.

52. Batista MV, Pierrotti LC, Abdala E, Clemente WT, Girão ES, Rosa DR, et al. Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients. Trop Med Intern Health. 2011;16(9):1134-42.

53. Ghosh K , Ayyaril A, Nirmala V. Acute GVHD involving the gastrointestinal tract and infestation with *Blastocystis hominis* in a patient with chronic myeloid leukaemia following allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 1998;22:1115-7.

54. Rostami MN, Keshavarz H , Eskandari E, Kia EB, Rezaeian M. Intestinal parasitic infections in renal transplant recipientes. Iranian J Parasitol. 2007;2(3):16-23.

55. David EB, Guimarães S, Oliveira AP, Oliveira-Sequeira TC, Bittencourt GN, Nardi AR, et al. Molecular caracterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. Parasit Vectors. 2015;8(103):103. doi: 10.1186/s13071-015-0714-8.

56. Melo GB, Paula FM, Malta FM, Maruta CW, Criado P, Castilho VL, et al. Identification of *Blastocystis* subtypes in clinical stool samples from Sao Paulo city, Brazil. Parasitol Open. 2017;1-6.

57. De Carli GA. Parasitologia clínica- seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnostic das parasitoses humanas. 2ª ed. São Paulo: Atheneu,2007.

58. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

59. Zerpa RL, Huicho L, Náquira C, Espinoza I. A simplied culture method for *Blastocystis hominis*. Rev Mex Patol Clin, 2000;47(1):17-19.

60. Wang W, Cuttell L, Bielefeldt-Ohmann H, Inpankaew T, Owen H, Traub R. Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in diferente geographical settings. Parasit Vectors. 2013;6:215-19.

61. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(12):5463-7.

62. BioEdit Sequence Alignment Editor. [cited 2019 May 7]. Avaliable from: http:/www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html

63.Basic Local Alignment Search Tool (nBLAST)). [cited 2019 May 7]. Avaliable from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ GenBank/tbl2asn2

64. Multilocus Sequence Typing (MLST) [cited 2019 May 7]. Avaliable from: http://pubmlst.org/blastocystis/

65. Rao K, Sekar U, Iraivan KT, Abraham G, Soundararajan P. *Blastocystis hominis* - an emerging cause of diarrhoea in renal transplant recipientes. J Assoc Physicians India. 2003;51:719-721.

66. Abdel-Hafeez EH, Ahmad AK, Ali BA, Moslam FA. Opportunistic Parasites among Immunosuppressed Children in Minia District, Egypt. Korean J Parasitol. 2012;50(1):57-62.

67. Escobedo A, Núñez FA. *Blastocystis hominis* infection in Cuban AIDS patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997;92:321-22.

68. Kulik RA, Falavigna DL, Nishi L, Araujo SM. *Blastocystis sp* and other intestinal parasites in hemodialysis patients. Braz J Infect Dis. 2008;12(4):338-41.

69. Naeini AE, Sharifi M, Shahidi S, Taheri S, Seirafian S, Taheri D, et al. Intestinal fungal and parasitic infections in kidney transplant recipients: a multi-center study. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2012;23(4):677-83.

70. Gil F, Barros MJ, Macedo NA, Júnior CG, Redoan R, Busatti, et al. Prevalence of intestinal parasitism and associated symptomatology among hemodialysis patients. Rev Inst Med Trop. 2013;55(2):69-74.

71. Eassa SM, Ali HS, El Masry SA, El-Fattah AH. *Blastocystis hominis* among Immunocompromised and Immunocompetent Children in Alexandria, Egypt. Ann Clin Lab Res. 2016;4:1-7.

72. Dogruman-Al F, Simsek Z, Boorom K, Ekici E, Sahin M, Tuncer C, Kustimur S, Altinbas A. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in rutinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD patients in Ankara, Turkey. Plos One. 2010;5(11):e15484. doi: 10.1371/journal.pone.0015484.

73. Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Khan AH, Ahmed A, Surin J, et al. Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis sp* in Sebha, Libya. Parasit Vectors. 2013;6:86. doi: 10.1186/1756-3305-6-86.

74. Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KE, Nielsen HV. Short report: *Blastocystis sp* subtype 4 is common in Danish *Blastocystis* -positive patients presenting with acute diarrhea. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(6):883-5.

75. Oliveira-Arbex AP, David EB, Guimarães S. *Blastocystis* genetic diversity among children of low-income daycare center in southeastern Brazil. Infect Genet Evol. 2018;57:59-63.

76. Usluca S, Inceboz T, Unek T, Aksoy U. *Isospora belli* in a patient with liver transplantation. Turkiye Parasitol Derg. 2012;36(4):247-50.

77.Yildiz S, Doğan I, Doğruman-Al F, Nalbantoğlu U, Üstek D, Sarzhanov F, et al. Association of enteric protist *Blastocystis sp*. and gut microbiota with Hepatic encephalopathy. J Gastroinstin Liver Dis. 2016;25(4):489-97.

78. Tasova Y, Sahin B, Koltas S, Paydas S. Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy. Acta Med Okayama. 2000;54(3):133-6.

79. Mariam ZT, Abebe G, Mulu A. Opportunistic and other intestinal parasitic infections in AIDS patients, HIV seropositive healthy carriers and HIV seronegative individuals in southwest Ethiopia. East Afr J Public Health. 2008;5:169-173.

80. Marcos LA, Gotuzzo E. Intestinal protozoan infections in the immunocompromised host. Curr Opin Infect Dis. 2013;26(4):295-301.

81. Malheiros AF, Stensvold CR, Clark CG, Braga GB, Shaw JJ. Short report: molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2011;85(6):1050-53.

82. Meloni D, Sanciu G, Poirier P, Alaoui HE, Chabé M, Delhaes L, et al. Molecular subtyping of *Blastocystis sp* isolates from symptomatic patients in Italy. Parasitol Res. 2011;109:613-9.

83. Barbosa CV, Barreto MM, Andrade RJ, Sodré F, d'Avila-Levy CM, Peralta JM, et al. Intestinal parasite in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): prevalence and diversity of *Blastocystis* Subtypes. Plos One. 2018 Mar:e0193860. doi: 10.1371/journal.pone.0193860. eCollection 2018.

84. Ramírez JD, Sánchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Flórez AC, Stensvold CR. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. Infect Genet Evol. 2014;22:223-8.

85. Casero RD, Mongi F, Sánchez A, Ramírez JD. *Blastocystis* and urticaria: examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. Acta Trop. 2015;148:156-61.

86. Beghini F, Pasolli E, Truong TD, Putignani L, Cacciò SM, Segata N. Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. ISME J. 2017;11:2848-63.

87. Audebert C, Even G, Cian A, The *Blastocystis* Investigation Group, Safadi DE, Certad G, et al. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. Sci Rep. 2016;6:25255.

88. Andersen LO, Bonde I, Nielsen HB, Stensvold CR. A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. FEMS Microbiol Ecol. 2015 Jul;91: doi: 10.1093/femsec/fiv072.

89. Chen TL, Chan CC, Chen HP, Fung CP, Lin CP, Chan WL, et al. Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis hominis* in healthy adults. Am J Trop Med Hyg. 2003;69(2):213-16.

90. Scanlan PD. Blastocystis: past pitfalls and future perspectives. Trends Parasitol. 2012;28(8):327-34.

91.Tito RY, Chaffron S, Caenepeel C, Lima-Mendez G, Wang J, Vieira-Silva, et al. Population-level analyses of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. Gut. 2018;1-10.

92. Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilic-Stojanovic M, Heilig HG, De vos WM, O'Toole PW, et al. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalente and diverse member of the healthy human gut microbiota. FEMS Microbiol Ecol. 2014;90(1):326-30.

93. Salinas JL. *Blastocystis* Infection in Patients with Chronic Renal Disease. Braz J Infect Dis. 2009;13(1):1.

ANEXO 1- APROVAÇÃO PROJETO DE PESQUISA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção de DNA de Blastocystis spp. em pacientes candidatos a transplantes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Pesquisador: Fabiana Martins de Paula

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61676816.2.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.817.111

Apresentação do Projeto:

Adequada.

Objetivo da Pesquisa:

Realizar a detecção molecular de Blastocystis spp. em pacientes candidatos a transplantes renal, de fígado e de medula óssea atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Objetivo Secundário:

- Identificar os subtipos de Blastocystis spp. presentes em amostras de fezes de pacientes candidatos a transplantes atendidos no HC-FMUSP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos e não há benefícios diretos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa que será realizada em amostras fecais de 155 pacientes candidatos a transplantes, renal, de fígado, e de medula óssea, coletadas em 2011 a 2013 e armazenadas no LIM-06 HC FMUSP pelo projeto intitulado de "Investigação de técnicas diagnósticas para identificação da infecção por S. stercoralis em pacientes com diferentes formas de

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

imunodepressão" que já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob protocolo n° 0123/10. Serão apenas utilizadas amostras com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo paciente ou responsável.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Adequada.

Recomendações:
Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:
Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_770342.pdf	07/11/2016 08:42:20		Aceito
Outros	Cadastro_blastocystis.pdf	21/09/2016 10:48:32	Fabiana Martins de Paula	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_RESPONSABILIDADE_E_SIGILO.pdf	21/09/2016 10:47:51	Fabiana Martins de Paula	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento.pdf	21/09/2016 10:47:36	Fabiana Martins de Paula	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_Blastocystis_Transplantes.pdf	21/09/2016 10:46:28	Fabiana Martins de Paula	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.817.111

Investigador	Projeto_Blastocystis_Transplantes.pdf	21/09/2016 10:46:28	Fabiana Martins de Paula	Aceito
Folha de Rosto	Folha_blastocystis.pdf	21/09/2016 10:44:09	Fabiana Martins de Paula	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 11 de Novembro de 2016

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br