

JULIANA MARTINS

Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana da Baixada Santista, estado de São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da glutamato desidrogenase (*gdh*) e beta-giardina (*bg*)

São Paulo

2010

JULIANA MARTINS

Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana da Baixada Santista, estado de São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da glutamato desidrogenase (*gdh*) e beta-giardina (*bg*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2329
FMVZ

Martins, Juliana

Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana da Baixada Santista, estado de São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da glutamato desidrogenase (gdh) e beta-giardina (bg) / Juliana Martins. -- 2010.
58 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. *Giardia duodenalis*. 2. Glutamato desidrogenase. 3. Beta-giardina. 4. Caracterização molecular. 5. Genótipos. I. Título.

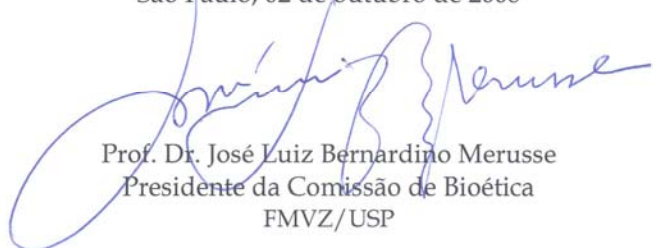


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização molecular de isolados de *Giardia spp* provenientes de amostras fecais de origem humana e animal da Baixada Santista, Estado de São Paulo pela análise de fragmentos do gene codificador da glutamato desidrogenase (gdh) e beta-giardina", protocolado sob o nº1444/2008, utilizando amostras de fezes humana e animal, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01/10/08.

We certify that the Research "Molecular characterization of *Giardia spp* isolates from human and animals fecal samples from Baixada Santista, São Paulo State, by analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) and beta-giardina coding genes", utilizing fecal samples, protocol number 1444/2008, under the responsibility Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/01/08.

São Paulo, 02 de outubro de 2008



Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARTINS, Juliana

Título: Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana da Baixada Santista, estado de São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da glutamato desidrogenase (*gdh*) e beta-giardina (*bg*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

À minha mãe,
Cleonilda de Fátima Martins,
Minha grande professora, da escola da vida.
Exemplo de mãe, pai, mulher e amiga.

Ao meu noivo,
Wagner da Cruz Aguiar,
Meu ponto de equilíbrio...
Pela compreensão, confiança, lealdade...
...e por estar ao meu lado em todos os momentos.

Agradecimentos especiais

A **Deus**,

por iluminar minha caminhada e me dar forças para seguir em frente...
...por colocar em minha vida todas as pessoas que fizeram parte dessa trajetória.

Ao **Profº Rodrigo Martins Soares**,

pelos ensinamentos, confiança, apoio, amizade...

...pela oportunidade.

A **Profª Solange Maria Gennari**,

pelo meu ingresso na Parasitologia.

Pelos ensinamentos, carinho e confiança.

Por fazer um sonho se tornar realidade...

...serei eternamente grata.

Agradecimentos

A Dr^a Hilda Fátima de Jesus Pena, pelos conhecimentos compartilhados e por ser peça fundamental no meu desenvolvimento profissional na área de parasitologia.

Aos professores Leonardo José Richtzenhain e Paulo Eduardo Brandão, pelos ensinamentos, disponibilidade e por me receberem de braços abertos no Laboratório de Biologia Molecular.

Ao funcionário Renato Caravieri, pela amizade, companheirismo e incentivo a correr atrás de meus objetivos.

A colega Eleninha, pela confiança e indicação ao Dr. Sávio Bário.

Ao Dr. Sávio Bário, médico responsável pelo laboratório de análises clínicas do hospital Beneficência Portuguesa, Santos, pela confiança em meu trabalho, cedendo gentilmente as amostras de *G. duodenalis*.

A D. Julia e a Tati, técnica e secretária do laboratório da Beneficência Portuguesa, pela recepção, carinho e paciência em separar as amostras positivas para *G. duodenalis*.

Aos demais professores do VPS, por nos orientar e compartilhar seus conhecimentos.

Aos funcionários Pedrinho e João, pela prontidão em nos ajudar.

Aos funcionários da secretaria do VPS, Danival, Virgínia e Cristina, por toda ajuda prestada.

A secretária da pós-graduação do VPS, Tânia Delonero, pelo apoio, amizade e pelos momentos divertidos.

As amigas do VPS Camila Oliveira, Estela Gallucci, Giselle Ayres, Iracema Barros, Karen Asano, Michelle Klein, Sheila Oliveira, Sueli Santos, Thais Chucri, pela amizade, companheirismo e fazer os dias de trabalho mais prazerosos.

Aos amigos Malheiros e Valdir, pelo carinho, parceria e amizade.

Aos demais pós-graduandos dos laboratórios de Parasitologia e Biologia Molecular, pelo convívio agradável.

Ao meu pai e a minha tia, por todo apoio e amor concebido.

Aos meus irmão e cunhadas, Anderson, Jean, Tati e Lucia, por acreditarem em mim e fazerem parte da minha vida.

As minhas sobrinhas Thamires e Pietra, os anjinhos da minha vida, simplesmente por existirem, fazendo os meus dias mais alegres.

Aos meus sogros Lucia e Estevan, pelo incentivo, compreensão, por me terem como filha.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Muito obrigada.

Sonhe

"Sonhe com aquilo que você quiser.
Vá aonde você queira ir.
Seja o que você quer ser,
Porque você possui apenas uma vida e nela só se tem
Uma chance de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que
Aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância das
Pessoas que passam por suas vidas."

(Clarice Lispector)

A vida é uma peça de teatro que
não permite ensaios. Por isso, cante, chore,
dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche
e a peça termine sem aplausos.

(Charles Chaplin)

RESUMO

MARTINS, J. **Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana da Baixada Santista, estado de São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da glutamato desidrogenase (*gdh*) e beta-giardina (*bg*).** Molecular characterization of *Giardia* spp. From fecal samples of human origin from Baixada Santista, Sao Paulo state, by analysis of fragments of the gene encoding glutamate dehydrogenase (*gdh*) and beta-giardin (*bg*). 2010. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Giardia duodenalis é um protozoário entérico de distribuição mundial responsável por causar a giardíase em uma grande variedade de mamíferos, incluindo os humanos. É considerada uma espécie complexa, no qual os isolados podem ser classificados em sete agrupamentos genéticos distintos apesar de serem morfológicamente indistinguíveis. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genotípica de isolados de *G. duodenalis* provenientes de humanos naturalmente infectados, residentes em cidades do litoral de São Paulo, na Baixada Santista. A caracterização molecular de 43 isolados pelo seqüenciamento parcial de genes codificadores da enzima glutamato-desidrogenase (*gdh*) e da proteína beta-giardina (*bg*) mostrou que o *assemblage* B da *G. duodenalis* é o mais freqüente na região litorânea, ocorrendo em 53,5% (n=23) das amostras, sendo o *assemblage* A identificado em 34,8% (n=15). A maioria das seqüências obtidas pelo gene *gdh* se mostrou polimórfica, caracterizada por picos duplos de nucleotídeos em algumas posições em cromatograma e quando a análise dos dois genes foi combinada cinco isolados apresentaram identidades diferentes. A esses fenômenos duas explicações são atribuídas, infecção mista ou heterozigose de seqüência alélica. As análises filogenéticas mostraram que o gene *bg* é mais conservado que o gene *gdh*, não sendo capaz de discriminar os sub-agrupamentos que constituem os *Assemblages* do parasita. Com base nos resultados apresentados podemos concluir que a participação de genótipos zoonóticos é relevante na epidemiologia das giardíases nos indivíduos residentes das cidades litorâneas do estado de São Paulo e que estudos de caracterização molecular da *G. duodenalis* são indispensáveis para melhor conhecimento da epidemiologia desta infecção.

Palavras-chaves: *Giardia duodenalis*. Glutamato desidrogenase. Beta-giardina.
Caracterização molecular. Genótipos.

ABSTRACT

MARTINS, J. **Molecular characterization of *Giardia* spp. From fecal samples of human origin from Baixada Santista, Sao Paulo state, by analysis of fragments of the gene encoding glutamate dehydrogenase (gdh) and beta-giardin (bg).** Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana da Baixada Santista, estado de São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da glutamato desidrogenase (gdh) e beta-giardina (bg). 2010. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Giardia duodenalis is an enteric protozoa of global distribution responsible for causing giardiasis in a wide range of mammals including humans. Is considered complex specie in which the isolates can be classified in different genetic groups despite to be morphologically indistinguishable. The purpose of this study was evaluating the genetic variability of *G. duodenalis* isolates from humans naturally infected residents in the coast cities of Sao Paulo, in Baixada Santista. The molecular characterization of 43 isolates using the gene encoding glutamate-desidrogenasi enzyme (*gdh*) and beta-giardin protein (*bg*) showed that the *assemblage* B is the most common in the coast region, occurring in 53.5% (n=23) samples, the *assemblage* A was identified in 34.8% (n=15). Most sequences obtained by the *gdh* gene showed polymorphism, characterized for double peaks of nucleotides in some chromatogram positions and when the analysis of two genes was combined five isolates were differently identified. For this phenomena can be attributed two explanations, mixed infections or heterozygosis allelic sequence. The phylogenetic analysis showed that *bg* gene is more conserved than *gdh* gene, not being able to discriminate the sub-groups of parasite *assemblages*. Based on the presented results we can conclude the participation of zoonotic genotypes is important in the epidemiology of giardiasis in residents of the coast cities of Sao Paulo state and molecular characterization studies of *G. duodenalis* are essential for better understanding the epidemiology of this infection.

Keywords: *G. duodenalis*. Glutamato dehydrogenase. Beta-giardin. Molecular characterization. Genótipos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% de fragmentos amplificados a partir do gene <i>gdh</i>	36
Figura 2 – Identificação molecular dos isolados de <i>G. duodenalis</i> provenientes de amostras fecais de origem humana caracterizados pelos genes <i>gdh</i> e <i>bg</i>	37
Figura 3 – Identificação dos genótipos de <i>Giardia duodenalis</i> pertencentes ao <i>Assemblage A</i> , através do gene <i>gdh</i> , baseado na análise de SNPs	38
Figura 4 – Reconstrução filogenética das seqüências de nucleotídeos do gene <i>gdh</i> provenientes de isolados de <i>Giardia duodenalis</i>	39
Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% de fragmentos amplificados a partir do gene <i>bg</i>	41
Figura 6 – Identificação dos genótipos de <i>Giardia duodenalis</i> pertencentes ao <i>Assemblage A</i> , através do gene <i>bg</i> , baseado na análise de SNPs	42
Figura 7 – Reconstrução filogenética das seqüências de nucleotídeos do gene <i>bg</i> provenientes de isolados de <i>G. duodenalis</i>	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Espécies de <i>Giardia</i> reconhecidas atualmente e seus respectivos hospedeiros	18
Quadro 2 – Relação dos <i>Assemblages</i> pertencentes à <i>G. duodenalis</i> com os respectivos hospedeiros	21
Quadro 3 – <i>Sub-assemblages</i> , genótipo multilocus (MLG) e genótipos de <i>Giardia duodenalis</i>	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	AMOSTRAS DE <i>G. duodenalis</i>	27
3.2	PESQUISA DOS CISTOS DE <i>G. duodenalis</i>	27
3.3	RECUPERAÇÃO DOS CISTOS DE <i>G. duodenalis</i>	28
3.4	EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	28
3.4.1	Rompimento dos cistos por choque-térmico.....	28
3.4.2	Purificação e precipitação.....	29
3.5	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE.....	29
3.5.1	Gene codificador da <i>glutamato desidrogenase</i>	29
3.5.2	Gene codificador da <i>beta-giardina</i>	30
3.6	VISUALIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO....	31
3.7	REAÇÃO SE SEQUENCIAMENTO.....	32
3.8	PRECIPITAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO.....	33
3.9	ELETROFORESE DE SEQUENCIAMENTO.....	33
3.10	ANÁLISE DAS SEQUENCIAS.....	34
4	RESULTADOS	35
4.1	PESQUISA DOS CISTOS DE <i>G. duodenalis</i>	35
4.2	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE E ANÁLISE DAS SEQUENCIAS.....	35
4.2.1	Gene codificador da <i>glutamato desidrogenase</i>	35
4.2.2	Gene codificador da <i>beta-giardina</i>	40
4.2.3	ANÁLISE CONJUNTO PELOS GENES <i>gdh</i> e <i>bg</i>	44
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A *Giardia duodenalis* (sinonímia: *G. intestinalis* e *G. lamblia*) é um parasita entérico que afeta uma grande variedade de animais domésticos e selvagens, causando a giardíase inclusive no homem. É uma das causas mais comuns de diarreia por protozoários no mundo, podendo ocorrer tanto em regiões tropicais como em temperadas (THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000; HOMAN; MANK, 2001; CACCIO et al., 2005).

A *Giardia* foi inicialmente descoberta por Van Leeuwenhoek em 1681. Mais tarde, em 1859, o organismo foi descrito em melhor detalhe por Wilhelm Duzan Lambl¹, que encontrou o protozoário nas fezes diarréicas de uma criança e o nomeou de *Cercomonas intestinalis* (apud ADAM, 2001, p. 448). Em 1875, o protozoário foi observado em coelho por Davaine², onde recebeu o nome de *Hexamita duodenalis* (apud MONIS; CACCIO; THOMPSON, 2009, p. 95).

Somente em 1882 o gênero *Giardia* foi estabelecido, após Kunstler³ observar o flagelado no intestino de girinos e denominá-lo *Giardia agilis* (apud MONIS; CACCIO; THOMPSON, 2009, p.95).

De acordo com a ocorrência do parasita no hospedeiro, numerosas espécies de *Giardia* estavam sendo descritas, até que Filice⁴, 1952, baseando-se em critérios morfológicos, mais especificamente, forma dos corpos medianos, comprimento e formato do trofozoíto, sugeriu que apenas três espécies deveriam ser reconhecidas: *Giardia agilis*, parasita de anfíbios; *Giardia muris*, parasita de roedores; e *Giardia duodenalis*, parasita de diversas espécies de mamíferos, incluindo os seres humanos (FILICE, 1952 apud THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000, p.210).

Com as observações de caracteres morfológicos ultra-estruturais, espécies adicionais foram sendo relatadas. Em 1987, foi descrita a *Giardia psittaci*, encontrada em periquitos; em 1990, a *Giardia ardeae*, encontrada em garça azul; e por ultimo, em 1998, a *Giardia microti*, espécie encontrada em roedores

¹ LAMBL, W. Mikroskopische untersuchungen der Darmexcrete. **Vierteljahrsschr. Prakst. Heikunde**, v. 61, p. 1-58, 1859.

² DAVAINÉ, C. Monadiens. **Dictionnaires encyclopedique des sciences medicales**, v. 9, Ser. 2, 1875.

³ KLUSTER, J. Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. **C. R. Seances Soc. Biol. Fil.**, v. 95, p. 347-349, 1882.

⁴ FILICE, F. P. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory. **Univ California Publ Zool**, v. 57, p. 53-146, 1952.

(ERLANDSEN; BEMRICK, 1987; ERLANDSEN et al., 1990; VAN KEULEN et al., 1998).

O quadro 1 reúne as espécies de *Giardia* reconhecidas atualmente e seus respectivos hospedeiros.

Os organismos do gênero *Giardia* são classificados como protozoários flagelados pertencentes ao Filo Sarcomastigophora, Classe Zoomastigophora e a Ordem Diplomonadida, sendo considerado o principal grupo de parasitas da Família Hexamitidae (THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000).

Quadro 1 – Espécies de *Giardia* reconhecidas atualmente e seus respectivos hospedeiros.

Espécies	Hospedeiros
<i>G. duodenalis</i>	Homens e mamíferos domésticos e silvestres
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Roedores

(Adaptado de THOMPSON, 2004; MONIS; CACCIO; THOMPSON, 2009)

A *Giardia* pode ser encontrada de duas formas durante seu ciclo vital, como trofozoíto e como cisto (MONIS; THOMPSON, 2003).

A infecção no hospedeiro é iniciada quando o cisto é transmitido pela via fecal-oral, diretamente através de indivíduos infectados ou indiretamente por alimento ou água contaminados (ROBERTSON et al., 2010). Depois da exposição ao ambiente ácido do estômago, cada cisto libera dois trofozoítos no intestino delgado proximal (processo de excistamento), onde ocorre a multiplicação assexuada. Os trofozoítos de *Giardia* permanecem livres no lúmen intestinal ou ligados à mucosa pelo disco ventral. A transformação dos mesmos em cistos (processo de encistamento) ocorre quando os parasitas estão em direção ao cólon, contudo, dentro de cinco a sete dias de infecção, ambos os estágios podem ser encontrados nas fezes. Apenas os cistos conseguem sobreviver sob condições ambientais (ADAM, 2001; MONIS; THOMPSON, 2003; ANKARKLEV et al., 2010; BALLWEBER et al., 2010).

Os cistos de *Giardia* spp. são resistentes aos processos comuns de filtração e/ou cloração empregados no tratamento da água, assim, águas provenientes das redes públicas constituem um importante fator na disseminação e manutenção do agente (THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993; FURNESS; BEACH; ROBERTS, 2000).

Carmena et al. (2007) analisaram 82 amostras de água de torneiras e identificaram os cistos de *Giardia* spp. em 26,8% delas. No mesmo estudo, amostras de água bruta (n=31) e tratada (n=26) de pequenas estações de tratamento de água também foram investigadas, o protozoário foi detectado em 45,2% e 19,2%, respectivamente.

Um homem infectado com *G. duodenalis* pode excretar até $2,0 \times 10^6$ cistos por grama de fezes (SMITH et al., 2006). Segundo ADAM, 2001, a ingestão de dez cistos é suficiente para causar a giardíase.

Em consequência da giardíase, pode haver perturbação da absorção de gorduras e vitaminas, aparecimento de quadro diarréico, agudo ou crônico, cólicas abdominais, desidratação e perda de peso, entretanto, a grande maioria dos indivíduos apresenta infecção assintomática, atuando estes como importantes reservatórios da doença, contribuindo assim com a propagação da infecção (FAUBERT, 2000; THOMPSON, 2004; SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006).

Apesar da longa história e ubiqüidade do parasita, o entendimento da patogenia da giardíase e a relação do protozoário com seu hospedeiro é limitado, não se sabendo ao certo por que a doença ocorre em alguns indivíduos e não em outros (SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006). De acordo com alguns autores, o quadro da doença é determinado pelo número de cistos ingeridos, idade do hospedeiro e estado nutricional e imunológico do mesmo (FAUBERT, 2000; SCOTT et al., 2002; SAHAGUN et al., 2008).

A prevalência de giardíase humana é de 2 a 7% na Europa e América do Norte, podendo atingir valores como 40% em países em desenvolvimento (SOUSA et al., 2006), contando com 200 milhões de casos sintomáticos na Ásia, África e América Latina e com incidência de 500.000 casos por ano (THOMPSON, 2004).

Em Setembro de 2004 a *Giardia* foi incluída na “Iniciativa de Doenças Negligenciadas” da Organização Mundial da Saúde, que tem como objetivo buscar estratégias de controle para doenças que ocorrem principalmente em países em desenvolvimento (SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006).

A giardíase é um dos maiores risco à saúde entre populações de grupos etários mais jovens, devendo ser a suscetibilidade atribuída aos hábitos de prática de higiene pessoal inadequada, sendo assim, uma maior incidência é observada entre grupos populacionais que apresentam condições higiênicas precárias e em instituições fechadas como, por exemplo, creches (MACHADO et al., 1999; MOHAMMED MAHDY et al., 2009).

Estudos de ocorrência de enteroparasitas em creches das cidades de Botucatu e Presidente Prudente, ambas no estado de São Paulo, demonstraram que a *G. duodenalis* foi um dos parasitas mais encontrados nas fezes das crianças, contando com uma prevalência de 26,8% e 16% respectivamente (DE CARVALHO; DE CARVALHO; MASCARINI, 2006; TASHIMA et al., 2009).

Mascarini e Donalisio, 2006, mostraram que a freqüência da giardíase apresenta diferença quanto à sua distribuição em populações de diferentes faixas socioeconômicas, sendo maior nos indivíduos pertencentes à faixa de renda de dois a quatro salários mínimos, assim como entre as crianças cujas mães possuíam baixo nível de escolaridade.

Embora a taxonomia da *G. duodenalis* esteja ainda em discussão, é geralmente considerada uma espécie complexa, no qual os membros não possuem variações em sua morfologia, mas podem ser diferenciados, por meio de ferramentas moleculares, em sete agrupamentos genéticos distintos, denominados de *assemblages* (classificadas de A a G) (THOMPSON; MONIS, 2004; CACCIO; RYAN, 2008).

Até o momento, apenas os *assemblages* A e B têm sido detectados em humanos e em outros mamíferos, sendo considerados potencialmente zoonóticos (APPELBEE; THOMPSON; OLSON, 2005; LALLE et al., 2005; SOUZA et al., 2007; VOLOTAO et al., 2007; SPRONG; CACCIO; VAN DER GIESSEN, 2009).

O *assemblage* A é um agrupamento cujos isolados podem ser divididos em três diferentes sub-linhagens, denominados sub-*assemblages*: AI, abrangendo um conjunto de amostras provenientes de humanos e animais; AII, consistindo inteiramente de isolados de origem humana e AIII, recentemente reportado apenas em animais ungulados (THOMPSON, 2000; THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000; THOMPSON, 2004; CACCIO; RYAN, 2008).

O *assemblage* B compreende principalmente os sub-*assemblages* BIII e BIV, abrangendo isolados predominantemente humanos com algumas amostras de

origem animal (MONIS et al., 1999; MONIS; THOMPSON, 2003; THOMPSON, 2004). Porém, alguns autores não confirmam essa subdivisão (SOUZA et al., 2007; WIELINGA; THOMPSON, 2007).

Curiosamente, os demais *assemblages* (C a G) parecem estar confinados a hospedeiros específicos (Quadro 2) (MONIS; THOMPSON, 2003; THOMPSON, 2004; CACCIO; RYAN, 2008).

A caracterização molecular dos cistos de *G. duodenalis* vem sendo amplamente utilizada em amostras clínicas e ambientais para auxiliar na taxonomia do parasito e em estudos epidemiológicos da infecção (MONIS et al., 1998; SPRONG; CACCIO; VAN DER GIESSEN, 2009). A maioria dos estudos tem sido realizada através da análise dos seguintes genes: subunidade ribossômica menor (*SSU rRNA*), beta-giardina (*bg*), glutamato desidrogenase (*gdh*), fator de alongação 1- α (*ef1 α*), triose fosfato isomerase (*tpi*), GLORF-C4 (*C4*) e, mais recentemente, região do espaço rRNA intergenômico (CACCIO; RYAN, 2008; SPRONG; CACCIO; VAN DER GIESSEN, 2009).

Quadro 2 – Relação dos *assemblages* de *Giardia duodenalis* e seus respectivos hospedeiros.

Genótipo	Hospedeiro
<i>Assemblage A</i>	Humanos, primatas, animais de produção, cavalos, cães, gatos, porcos, veado, alce, castores
<i>Assemblage B</i>	Humanos, primatas, animais de produção, cavalo, cães, coiotes, chinchilas, castores e ratos
<i>Assemblage C, D</i>	Cães, coiotes, lobos
<i>Assemblage E</i>	Bovino, caprino, suínos e alpaca
<i>Assemblage F</i>	Gato
<i>Assemblage G</i>	Rato doméstico

(Adaptado de CACCIO; SAPRONG, 2010)

No Brasil, poucos estudos têm sido dedicados à identificação molecular de *Giardia* spp. em amostras clínicas. Os estudos de maior expressividade neste tema foram realizados no Rio de Janeiro e em São Paulo (SOUZA et al., 2007; VOLOTAO et al., 2007). Curiosamente, os resultados destas pesquisas são conflitantes, na

medida em que nas amostras de origem humana do Rio de Janeiro o *assemblage* B não foi encontrado, mas apenas os *assemblages* AI e AII, diferentemente do estudo de São Paulo, onde foi possível isolar apenas os agrupamentos AII e B. Também, salienta-se que, no estudo de São Paulo, das amostras de animais de companhia (cães e gatos), apenas os gatos revelaram potencial de eliminação de genótipos zoonóticos, pois somente nestes animais o *assemblage* AI foi detectado, que, no caso do Rio de Janeiro, foram encontrados cães eliminando o agrupamento em questão.

A variação da predominância dos *assemblages* de *G. duodenalis* em determinadas áreas geográficas pode ser explicada pela diferença na dinâmica de transmissão do protozoário (MOHAMMED MAHDY et al., 2009).

São poucos os estudos que determinam a relação entre os *assemblages* do parasita com os sintomas clínicos da giardíase. Tais pesquisas fornecem dados importantes, já que, segundo alguns autores há evidências que os agrupamentos A e B diferem em virulência (THOMPSON, 2004; MOHAMMED MAHDY et al., 2009).

Em 2001, Homan e Mank investigaram 18 pacientes holandeses infectados com *G. duodenalis* e encontraram 100% de correlação entre a severidade da diarreia e o agrupamento do parasita. Isolados do *assemblage* A (n=9) foram unicamente detectados em pacientes com queixa de diarreia intermitente, enquanto isolados do *assemblage* B (n=9) estavam presentes apenas em pacientes com queixa de diarreia persistente. Embora o número de pacientes analisados tenha sido baixo, a correlação entre a sintomatologia clínica e o genótipo pareceu ser forte.

Resultados concordantes com os de Homan e Mank (2001) foram encontrados por Gelanew et al. (2007), onde, em 13 amostras identificadas como *assemblage* B, foi possível observar os sintomas da giardíase em 12, enquanto o *assemblage* A foi detectado em 18 pacientes com a manifestação clínica da doença, em um total de 31.

Em contraste com os estudos de Homan e Mank e Gelanew et al., alguns trabalhos apontam que o agrupamento relacionado com infecções sintomáticas é o *assemblage* A. Em 2002, na Austrália, foi realizado um estudo de genotipagem de isolados de *G. duodenalis* obtidos de crianças com até cinco anos de idade. Análises estatísticas mostraram que crianças infectadas com o *assemblage* A tem mais chance de desenvolver a diarreia do que aquelas infectadas pelo *assemblage* B,

uma vez que, o sintoma foi notado em seis amostras fecais do primeiro agrupamento (n=7) e em apenas três do segundo (n=16) (READ et al., 2002).

A associação entre a presença de infecção sintomática e infecção pelo *assemblage* A em crianças também foi descrita mais recentemente em Zaragoza, onde a giardíase sintomática estava presente em 81.2% (13/16) das infecções por *assemblage* A contra 34% dos casos por *assemblage* B (9/26) (SAHAGUN et al., 2008).

Com destaque nesses estudos, até o momento não há uma conclusão se aspectos ligados geneticamente à *G. duodenalis* são determinantes na severidade da infecção humana por giardíase, fato que deve ser elucidado em estudos futuros (HOMAN; MANK, 2001; MOHAMMED MAHDY et al., 2009).

Um segundo tópico relevante sobre a caracterização molecular de Giárdias diz respeito ao número de marcadores a ser empregado em uma análise. A utilização de apenas um marcador genético, neste tipo de estudo, deve ser avaliada com cautela. Read, Monis e Thompson (2004) ao analisarem amostras fecais de cães e gatos encontraram diferenças entre os resultados dos mesmos isolados quando genotipados com dois marcadores moleculares. Resultados extremamente importantes, uma vez que alguns agrupamentos foram identificados como não zoonóticos (*assemblage* D) quando o locus *SSU rRNA* foi utilizado e como potencialmente zoonóticos (*assemblage* BIV) com o emprego do locus *gdh*.

Outro tópico digno de ser relevado em relação à diversidade molecular em *Giardia* spp. é fenômeno comumente descrito por diferentes grupos de pesquisadores é a alta prevalência de seqüências heterogêneas, caracterizadas por picos duplos de nucleotídeos em posições específicas, reveladas pela análise dos cromatogramas obtidos com produtos de PCR após seqüenciamento automático dos mesmos (CACCIO et al., 2008; LEBBAD et al., 2008; LALLE, M. et al., 2009; SPRONG; CACCIO; VAN DER GIESSEN, 2009).

A essa heterogeneidade presente em seqüências gênicas de *G. duodenalis*, os pesquisadores atribuem duas explicações possíveis: (i) infecções mistas verdadeiras, caracterizadas pela presença de cistos geneticamente distintos em uma única amostra (cada cisto hospedando uma variante da seqüência heterogênea) ou (ii) heterozigose de seqüência alélica (ASH), ou seja, cada organismo pode hospedar simultaneamente as duas variantes (LALLE, MARCO et al., 2005; SPRONG; CACCIO; VAN DER GIESSEN, 2009).

Por fim, além da diferenciação molecular de isolados em *assemblages* e *sub-assemblages*, os isolados pertencentes ao *assemblage* A (AI e AII) foram recentemente subdivididos em genótipos, para cada um dos seguintes marcadores: *bg*, *tpi* e *gdh* (CACCIÒ et al., 2008). Para este *assemblage*, seis diferentes genótipos (A1 a A6) foram definidos para cada um dos três marcadores. A combinação de cada um desses genótipos em um determinado indivíduo permite classificá-lo como genótipo multilocus (do Inglês, MLG). O quadro 3 permite melhor compreensão desta classificação:

Quadro 3 – *Sub-assemblages*, genótipo multilocus (MLG) e genótipos de *Giardia duodenalis*.

<i>Sub-assemblages</i>	MLG	Genótipo		
		<i>bg</i>	<i>tpi</i>	<i>Gdh</i>
AI	AI-1	A1	A1	A1
	AI-2	A5	A5	A5
AII	AII-1	A2	A2	A2
	AII-2	A3	A2	A3
	AII-3	A2	A2	A3
	AII-4	A3	A2	A4
	AII-5	A3	A1	A3
	AII-6	A3	A3	A3
	AII-7	A3	A4	A3
AIII	AIII-1	A6	A6	A6

(Adaptado de CACCIO et al., 2008)

Resultados encontrados nos trabalhos citados anteriormente são importantes, pois ressaltam (i) o alto grau de polimorfismo e os problemas com a corrente nomenclatura para isolados de *G. duodenalis*, (ii) a ocorrência de seqüências heterogêneas e o conseqüente impacto para os estudos de genotipagem, (iii) as dificuldades em assinalar alguns isolados a um específico *assemblage*, devido aos inconsistentes dados obtidos pelo uso de diferentes marcadores genéticos e (iv) a utilidade dos MLGs em estudos de transmissão zoonótica (CACCIÒ et al., 2008).

Finalmente, um destaque no estudo desse protozoário se deu em 2007 com o trabalho de Morrison et al. (2007) que seqüenciaram o genoma do *assemblage* A da

G. duodenalis, isolado WB clone 6, o qual é distribuído em cinco cromossomos e possui o tamanho de 11,7MB.

Em 2009, um grupo de pesquisadores produziu um esboço da seqüência do genoma do *assemblage* B do parasita, isolado GS, e o comparou com o genoma WB. Tais autores reportam diversas diferenças entre a maioria dos genes presentes nesses dois principais agrupamentos que constituem a *G. duodenalis* e apóiam a sugestão de Monis, Caccio e Thompson (2009) de revisar a taxonomia do protozoário, sugerindo que os *assemblages* A e B sejam separados em espécies distintas (FRANZEN et al., 2009; MONIS; CACCIO; THOMPSON, 2009).

Muitas informações sobre a biologia celular e molecular da *G. duodenalis* tem se acumulado durante os últimos anos, contudo, segundo Ankarklev et al. (2010), esse é apenas o começo de um período intensivo de pesquisas onde os protozoários do gênero *Giardia* serão utilizados como modelos para o entendimento do genoma, expressão gênica, biologia celular e resposta imune intestinal dos protozoários.

Estudos moleculares têm se tornados imprescindíveis para um melhor esclarecimento da taxonomia e epidemiologia da *G. duodenalis*, uma vez que, diversas são as dúvidas relacionadas a esse protozoário.

Poucos são os estudos de genotipagem de *G. duodenalis* em amostras de origem humana no Brasil, conseqüentemente, pouco se conhece sobre a distribuição dos diversos *assemblages* em diferentes áreas geográficas em nosso meio.

Neste estudo, amostras de origem humana provenientes de áreas urbanas de municípios da Baixada Santista foram analisadas. Para conhecer a diversidade genética do parasita nesta região, dois marcadores genéticos comumente empregados em pesquisas de caracterização molecular foram utilizados: o gene codificador de *beta-giardina*, uma proteína constituinte da família Giardina, associada com o disco ventral, estrutura unicamente encontrada nos parasitas do gênero *Giardia* (YEE; DENNIS, 1992; WEBER et al., 1996; ELMENDORF; DAWSON; MCCAFFERY, 2003) e o gene codificador da *glutamato desidrogenase*, uma enzima encontrada nas eubactérias e eucariotos, utilizada principalmente para a síntese de glutamato e amônia (MATTAJ; MCPHERSON; WOOTTON, 1982; YEE; DENNIS, 1992).

2 OBJETIVOS

- Avaliar a variabilidade genotípica de isolados de *G. duodenalis* provenientes de amostras fecais de humanos naturalmente infectados, residentes em cidades do litoral de São Paulo, Baixada Santista, pela análise do gene codificador da enzima *glutamato desidrogenase* e da proteína *beta-giardina*.
-

3 MATERIAL E MÉTODOS

O material e a metodologia utilizados neste estudo são descritos a seguir.

3.1 AMOSTRAS DE *G. duodenalis*

As amostras de fezes humanas, provenientes de munícipes residentes nas cidades de Santos, São Vicente, Guarujá e Cubatão, foram gentilmente fornecidas pelo hospital da Beneficência Portuguesa, da cidade de Santos, estado de São Paulo.

A detecção dos cistos de *G. duodenalis* foi previamente realizada pelo laboratório de análises clínicas do hospital empregando-se o método de Hoffmann (LUTZ, 1919; HOFFMANN; PONS; JANER, 1934). Ao sedimento do material foi adicionada uma solução de Bicromato de Potássio a 2% e a suspensão resultante foi armazenada em refrigerador até o processo seguinte.

Um total de 50 amostras contendo cistos de *G. duodenalis* foi coletado em um período de 24 meses (Agosto de 2007 a Agosto de 2009).

3.2 PESQUISA DOS CISTOS DE *G. duodenalis*

As amostras foram submetidas à técnica de centrífugo-flutuação em sacarose (Sheater modificado) (SHEATER, 1923) que constituiu na diluição de aproximadamente 2 mL da solução descrita no item 3.1 em 11 mL de solução sacarose ($d=1,203\text{g/cm}^3$), filtração em uma camada de gaze e centrifugação do filtrado em tubos cônicos de 15 mL a 1500 rpm por 10 minutos. Em seguida uma alíquota da película superficial do material centrifugado foi recuperada com o auxílio de uma alça bacteriológica e disposta em uma lâmina. A preparação foi coberta com

uma lamínula (1x1cm) para a observação dos cistos em microscópio óptico (aumento de 400 x).

3.3 RECUPERAÇÃO DOS CISTOS DE *G. duodenalis*

A recuperação dos cistos foi realizada sobre uma placa de Petri estéril, após a lavagem da lâmina e lamínula onde os cistos foram observados, com 1,5 mL de tampão TE (10mM TrisHCL pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0). O lavado obtido foi transferido da placa para um microtubo de 1,5mL e a seguir centrifugado a 12.000g por 10 minutos. Desprezado o sobrenadante, 1 mL do mesmo tampão foi adicionado e seguiu-se com outra centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo os cistos de *G. duodenalis* foi imediatamente submetido à extração de DNA ou armazenado a -20°C para posterior processamento.

3.4 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Os procedimentos referentes à extração de ácidos nucléicos são descritos a seguir.

3.4.1 Rompimento dos cistos por choque-térmico

Em cada amostra foi adicionado 490 µL do tampão de digestão: 10mM TrisHCl pH 8.0; 100mM NaCl; 25mM EDTA e 1%SDS. Para a ruptura dos cistos foram realizados três ciclos consecutivos de congelamento em gelo seco, ou em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 57°C. A seguir, 10 µL da enzima proteinase K (20mg/mL) foram adicionados a cada amostra e as mesmas foram incubadas em banho-maria por 2 horas a 57°C ou “overnight” a 37°C.

3.4.2 Purificação e precipitação

Para a purificação dos produtos da digestão descrito no item anterior foi adicionado em cada amostra 250 μ L de fenol e 250 μ L de clorofórmio, seguido por homogeneização em *vortex* e centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, para a precipitação, o sobrenadante (400 μ L) foi transferido a novo microtubo de 1,5 mL e em seguida adicionou-se 400 μ L de propanol absoluto. Após a homogeneização em *vortex*, a mistura alcoólica foi estocada por 2 horas em freezer -20 °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 30 minutos a 4°C e em seguida o propanol foi descartado por inversão de tubo. O sedimento foi suspenso em 500 μ L de etanol 70% onde foi novamente centrifugado a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o microtubo deixado em posição invertida até estar completamente seco. Posteriormente, 30 μ L de TE (TrisHCL pH8,0 10mM; EDTA pH8,0 1mM) foram adicionados ao sedimento que após a homogeneização em *vortex* foi incubado a 56°C por 10 minutos, seguindo de homogeneização e armazenamento a -20°C até o momento da amplificação.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

A seguir são descritos os procedimentos relacionados à reação em cadeia pela polimerase.

3.5.1 Gene codificador da *glutamato desidrogenase*

Para a amplificação de um segmento do gene *gdh* foram empregadas as técnicas de PCR e seminested-PCR com a utilização de *primers* descritos previamente por Souza et al. (2007).

Os *primers* utilizados na reação primária visando a amplificação de um fragmento de aproximadamente 890 pb foram:

GdhF-I (senso): 5' AAY GAG GTY ATG CGC TTC TGC CA 3'

#579II (anti-senso): 5' GAT GTT YGC RCC CAT CTG RTA GTT C 3'

O protocolo de reação empregado utilizou 45 µL de mix de reagentes (31,2 µL água mQ; 1 µL dNTP (10mM); 3 µL de cada *primer* (10pmol/ µL); 5 µL de 10X PCR Buffer; 1,5 µL MgCl (50mM); 0,3 µL taq Polimerase (5U/ µL)) e 5 µL de DNA extraído conforme item 3.4, resultando um volume final de 50 µL em cada microtubo que foi levado a máquina termocicladora.

Os parâmetros para o termociclador foram: aquecimento inicial de 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C por 30 segundos; e 72°C por 120 segundos. Por fim seguiu-se um aquecimento final de 72°C por 5 minutos.

Com a finalidade de amplificar um fragmento menor, de 659 pb, foi realizada uma segunda amplificação (seminested-PCR) com a utilização dos seguintes primers:

GdhF-II (senso): 5' ACT TCC TBG AGG AGA TGT GCA AGG A 3'

#579II (anti-senso): 5' GAT GTT YGC RCC CAT CTG RTA GTT C 3'

A seminested-PCR foi realizada nas mesmas condições da PCR, porém com o emprego de 5 µL de produto da amplificação primária.

3.5.2 Gene codificador da *beta-giardina*

Para a amplificação primária, de um fragmento de aproximadamente 753 pb, foram utilizados *primers* descritos por Cacciò; De Giacomo; Pozio (2002), descritos a seguir:

G7 (senso): 5' AAG CCC GAC GAC CTC ACC CGC AGT GC 3'

G759 (anti-senso): 5' GAG GCC GCC CTG GAT CTT CGA GAC GAC 3'

O protocolo de reação empregado utilizou 45 µL de mix de reagente (34,6 µL água mQ; 1 µL dNTP (10mM); 1 µL de cada *primer* (10pmol/ µL); 5 µL de 10X PCR Buffer; 2 µL MgCl (50mM); 0,4 µL taq Polimerase (5U/ µL)) e 5 µL de DNA extraído conforme item 3.4, resultando um volume final de 50 µL em cada microtubo que foi levado a máquina termocicladora.

Os parâmetros para o termociclador foram: aquecimento inicial de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 65°C por 30 segundos; 72°C por 60 segundos, seguidos de um aquecimento final de 72°C por 7 minutos.

Para a amplificação secundária, com o intuito de amplificar um fragmento de aproximadamente 511 pb, foi utilizado um par de *primers* interno em relação aos primeiros, desenvolvidos por Lalle et al. (2005). Os *primers* empregados foram:

BG-Nst-F (senso): 5' GAA CGA ACG AGA TCG AGG TCC G 3'

BG-Nst-R (anti-senso): 5' CTC GAC GAG CTT CGT GTT 3'

O protocolo de reação empregado utilizou 45 µL de mix de reagente (38,6 µL água mQ; 1 µL dNTP (10mM); 1 µL de cada *primer* (10pmol/ µL); 5 µL de 10X PCR Buffer; 2 µL MgCl (50mM); 0,4 µL taq Polimerase (5U/ µL)) e 1 µL do produto da amplificação primária resultando um volume final de 50 µL em cada microtubo que foi levado a máquina termocicladora.

Os parâmetros para o termociclador foram: aquecimento inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos, seguidos de um aquecimento final de 72°C por 7 minutos.

3.6 VISUALIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

Os fragmentos amplificados pela seminested-PCR e nested-PCR, dos genes *gdh* e *bg*, respectivamente, foram visualizados através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em cuba horizontal, previamente imerso em tampão TBE (Tris-Borato 0,045M; EDTA pH 8,0 1mM).

Após a corrida eletroforética, executada a uma voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10V/cm de gel), o gel foi corado em solução de brometo de etídeo a 0,5µg/mL durante 20 minutos. Para a visualização dos produtos amplificados o gel foi observado em transluminador ultravioleta.

As dimensões dos fragmentos amplificados foram comparadas a um padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pb disposto no gel juntamente com as amostras analisadas.

Logo após a separação dos produtos amplificados pela eletroforese, as bandas de interesse foram recortadas do gel e então purificadas com o auxílio de kit comercial, seguindo instruções do fabricante (*GFX Gel extraction system*).

3.7 REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

Para a reação de seqüenciamento automático foi utilizado o *kit* comercial *BigDye™ terminator – cycle sequencing ready reaction – Applied Biosystems*. O DNA obtido de cada produto de PCR após a reação de purificação descrita no item anterior foi utilizado como amostra para a reação de seqüenciamento. Cada produto de PCR foi seqüenciado em duplicata, com os *primers* senso e anti-senso para cada reação.

A reação de seqüenciamento foi executada utilizando-se para cada amostra 4 µL *Sequencing buffer*, 2 µL de *BigDye™* e 1 µL *primer*. A quantidade de DNA colocada foi de 13 µL, totalizando um volume final de 20 µL.

O ciclo de seqüenciamento foi efetuado no termociclador *Mastercycler Gradient Eppendorf* com a utilização do seguinte programa:

Desnaturação inicial: 96°C por 1 minuto

Desnaturação: 96°C por 15 segundos

Rampa: 1,0°C/s

Hibridização: 50°C por 15 segundos

Rampa: 1,0°C/s

Extensão: 60°C por 4 minutos

Rampa: 1,0°C/s

O ciclo foi repetido por 39 vezes a partir da etapa de desnaturação (segunda etapa).

3.8 PRECIPITAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO

Após a reação de seqüenciamento os produtos foram purificados por precipitação em álcool. Em cada amostra foi adicionado 80 µL de isopropanol a 65%, que após a homogeneização, as amostras foram mantidas em local protegida da luz por 30 minutos, em temperatura ambiente, e em seguida centrifugadas a 16.000 rpm por 30 minutos. O isopropanol foi descartado por inversão de tubo e o sedimento foi homogeneizado com 300 µL de etanol a 60%. Uma nova centrifugação foi precedida a 16.000 rpm por 15 minutos. O excesso de etanol foi cuidadosamente aspirado com o auxílio de pipeta e os microtubos foram conduzidos ao banho-seco a 90°C por 5 minutos.

As amostras precipitadas foram mantidas a -20°C até o momento do seqüenciamento.

3.9 ELETROFORESE DE SEQÜENCIAMENTO

As amostras precipitadas foram homogeneizadas com 3,4 µL de formamida e Blue Dextran-EDTA (*Applied Biosystems*) na proporção de 5:1, colocadas em banho seco a 95°C por 3 minutos e depois refrigeradas a 4°C por 2 minutos. Em seguida foram aplicadas na placa de seqüenciamento através do protocolo do manual técnico do equipamento ABI Prism™ 377 DNA Sequencers (*Applied Biosystems*).

3.10 ANÁLISE DAS SEQÜENCIAS

A qualidade dos produtos seqüenciados, bem como a montagem da seqüência final de cada amostra foi realizada utilizando-se o programa *Phred-Phrap*, contido na suíte *Codoncode Aligner*.

Determinadas as seqüências de nucleotídeos de cada amostra, as mesmas foram alinhadas com o auxílio do programa Clustal W, contido na suíte *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999), tomando-se como base seqüências homólogas disponíveis no GenBank.

Com o auxílio do programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007) foi avaliado o grau de diversidade nucleotídica existente entre as seqüências e árvores filogenéticas foram elaboradas empregando-se métodos de distância.

4 RESULTADOS

Os resultados encontrados neste estudo serão descritos a seguir.

4.1 PESQUISA DOS CISTOS DE *G. duodenalis*

Do total de 50 amostras positivas microscopicamente para *G. duodenalis* através do método de Hoffmann, em 49 foi possível a visualização dos cistos de *G. duodenalis* pela técnica de Sheater modificada.

4.2 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE E ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS

Os resultados referentes à reação em cadeia pela polimerase e análise das seqüências são descritos a seguir.

4.2.1 Gene codificador da glutamato desidrogenase (*gdh*)

Das 49 amostras de cistos detectadas por método de Sheater, 40 (81,6%) foram positivas pela técnica de *seminested*-PCR, ocorrendo com êxito a amplificação do fragmento alvo do gene *gdh* como demonstrado na figura 1.

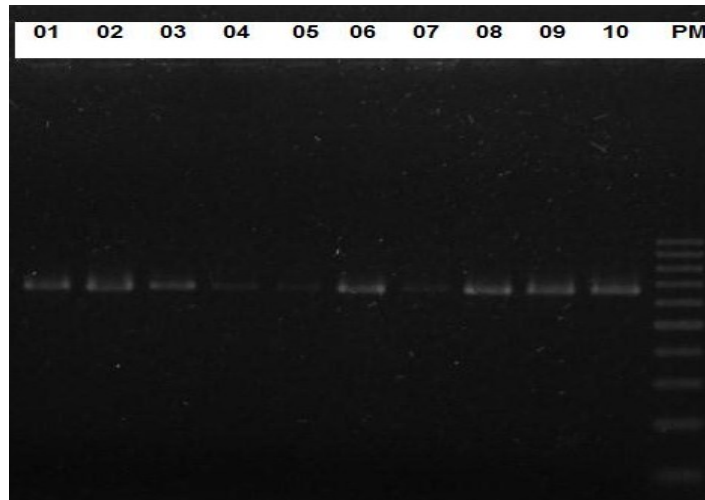


Figura 1- Eletroforese em gel de agarose 1,5% de fragmentos amplificados a partir do gene *gdh*. As linhas de 1 a 10 representam ampliações de 659 pb dos produtos de seminested-PCR purificados a partir de amostras fecais de hospedeiros naturalmente infectados com *G. duodenalis*. PM: Peso molecular, múltiplos de 100 pares de bases

O seqüenciamento dos produtos de PCR se fez possível em 34 amostras de *G. duodenalis*, não ocorrendo com sucesso nas seis amostras remanescentes.

As 34 seqüências foram alinhadas entre si e comparadas com outras seqüências representativas dos diversos *Assemblages* de *G. duodenalis*. Esta análise permitiu a identificação molecular de dois agrupamentos genéticos, o *Assemblage A* e o *Assemblage B*.

O *Assemblage A* foi detectado em 17 isolados, enquanto 17 foram pertencentes ao *Assemblage B*, conforme ilustra a figura 2.

Isolados	<i>gdh</i>	<i>bg</i>	Isolados	<i>gdh</i>	<i>bg</i>
J1	All	A3	J26	A2	A3
J2	B	B	J27	B	B
J3	B	B	J28	NA	NA
J4	NS	A2	J29	NS	B
J5	B	B	J30	NA	NA
J6	All	A3	J31	NS	B
J7	All	A3	J32	NS	B
J8	B	A2	J33	B	NA
J9	B	B	J34	B	B
J10	A2	A3	J35	A2	NS
J11	B	B	J36	NA	NA
J12	B	B	J37	B	B
J13	A2	NP	J38	All	A2
J14	B	NP	J39	B	B
J15	B	B	J40	NA	B
J16	A2	A3	J41	NA	B
J17	All	A2	J42	B	B
J18	B	B	J43	NS	B
J19	A2	A3	J44	NS	B
J20	A4	A2	J45	A4	B
J21	NEG	NEG	J46	NA	NA
J22	NA	NA	J47	NA	B
J23	A2	B	J48	A4	A2
J24	NA	NA	J49	B	A3
J25	A2	A3	J50	A2	B

Figura 2 – Identificação molecular dos isolados de *Giardia duodenalis* provenientes de amostras fecais de origem humana caracterizados pelos genes *gdh* e *bg*. **NS**: não seqüenciado e positivo pela PCR; **NP**: não testado pela PCR; **NEG**: negativo pela técnica de *Sheater*; **NA**: negativo pela PCR

Todos os isolados caracterizados como *assemblage* A pelo marcador em tela foram pertencentes ao sub-agrupamento All. De acordo com a análise de *single nucleotide polymorphism* (SNP), proposta por Cacció et al. (2008) para diferenciação de genótipos, dois genótipos foram identificados, A2 e A4, que diferem entre si pela substituição de um único nucleotídeo, localizado na posição 699 (Figura 3)

	570	603	621	633	636	672	675	678	685	687	690	699	720	723	753	771	786	790	807	825	831	861	867	870	885	894	902	909	912	915	921	924	946	993	1050	1080	1131	1209	1223	1233	1256	1257	1259	1260	1266			
A1 M84604	C	T	C	C	T	C	T	G	G	T	G	T	T	C	C	C	C	A	C	G	C	T	T	T	C	C	C	C	G	C	G	T	A	G	T	T	T	C	G	C	A	G	A	G	G			
A5 EF685693
A2 AY178737	.	C	T	C	.	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	G	.	C	A		
A3 EU278608	.	C	T	A	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	G	.	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#		
? J1	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	.	.	R	.	G	.	R	C	#	
? J6	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	G	.	C	#		
? J7	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	G	.	C	#		
A2 J10	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	C	.	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	G	.	C	Y	#	#	#	#	#	#	#	#		
A2 J13	#	#	#	#	#	#	#	#	#	C	.	T	.	.	T	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	.	R	.	G	.	C	#	#	#	#	#	#	#	#	#		
A2 J16	#	#	#	#	#	#	K	.	R	C	.	T	.	R	T	R	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	.	.	G	.	C	.	.	Y	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#		
? J17	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	G	.	C	.	.	Y	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#		
A2 J19	.	C	T	C	.	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	G	.	C	#		
All A2 J23	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	C	.	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	.	R	.	G	.	C	A			
A2 J25	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	C	.	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	G	.	C	.	.	T	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#		
A2 J26	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	C	.	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	G	.	C	.	K	.	S	#	#	#	#	#	#	#	#	#		
A2 J35	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	C	.	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	G	.	C	#		
A2 J50	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	C	.	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	.	R	.	G	.	C	A				
A4 AY826194	.	C	T	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#		
A4 AB195223	.	C	T	T	.	.	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#		
A4 J20	.	C	T	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	G	.	C	.	T	A	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#		
? J38	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	G	.	C	.	T	A	Y	#	#	#	#	#	#	#	#	#		
A4 J45	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	.	R	.	G	.	C	.	K	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#			
A4 J48	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	T	.	.	T	.	T	.	T	C	C	C	.	T	T	.	.	G	.	K	.	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#			
All A6 EU637582	T	C	.	T	C	T	C	.	C	.	C	C	T	.	A	T	C	C	T	T	.	T	A	T	.	C	G	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#				
All A6 DQ100288	T	C	.	T	C	T	C	.	G	C	.	C	C	T	.	A	T	C	C	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#		

Figura 3 – Identificação dos genótipos de *Giardia duodenalis* pertencentes ao *Assemblage* A, através do gene *gdh*, baseado na análise de SNPs. Substituições de nucleotídeos (em negrito) numeradas a partir do códon ATG de cada gene; pontos indicam identidade ao genótipo A1 (seqüência de referência); #: sítios não determinados; **K (T ou G)** e **R (A ou G)**: sítios com dois caracteres possíveis

Das 17 amostras identificadas como *assemblage* All, nove são genótipo A2, três são genótipo A4 e em cinco a determinação do genótipo não foi possível por não ter sido contemplado os sítios que permitem a discriminação de genótipos (sítios 685 e 699 (Figura 3).

Heterogeneidade de seqüência foi notada nos isolados J01, J13, J16, J23, J26, J45, J48 e J50, caracterizado pela observação de duplos picos de nucleotídeo em cromatograma (Figura 3).

A identificação molecular das seqüências pertencentes ao *assemblage* B foi realizada por inferência filogenética, como pode ser verificado pela observação das topologias das árvores genealógicas ilustradas na figura 4:

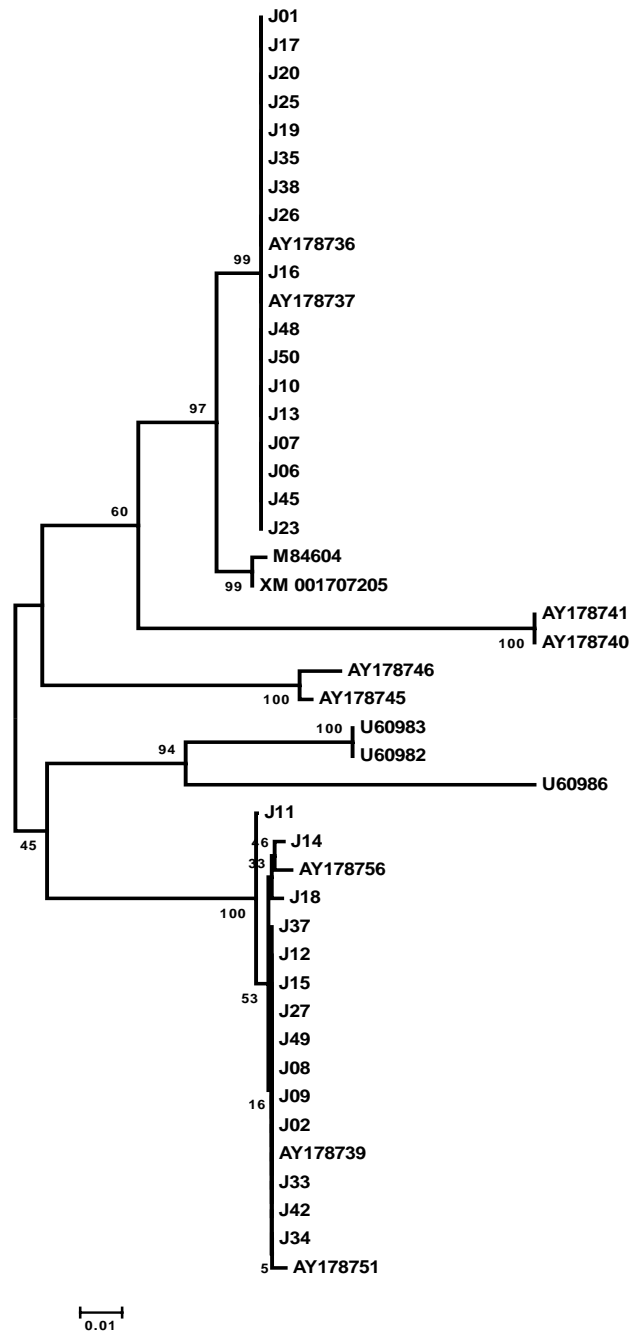


Figura 4 Reconstrução filogenética das seqüências de nucleotídeos do gene *gdh* provenientes de isolados de *Giardia duodenalis*. Reconstrução inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

De acordo com análise em cromatograma foi possível indentificar alguns sitios polimórficos nas seqüências dos seguintes isolados identificados como *Assemblage* B: J2, J5, J12, J14, J18, J27, J33, J37, J42 e J49.

Seqüências de referência de isolados de *G. duodenalis* representando os *Assemblages* C (U60983; U60982), D (U60986), E (AY178741; AY178740), G (AY178746; AY178745) e o sub-agrupamento AI (M84604; XM001707205), foram incluídas na análise filogenética demonstrando a formação de grupos distintos em relação às amostras avaliadas nesse estudo.

A reconstrução filogenética destes isolados, pelo gene codificador do *gdh*, demonstrou a ocorrência de duas linhagens genéticas distintas, os *Assemblages* All e B, agrupamentos sustentados por ramos com valores de *bootstraps* consistentes, conforme ilustrado na figura 2. Duas sub-linhagens são observadas dentro do grupo nomeado como *Assemblage* A, o sub-agrupamento All (referências AY178737 e AY178736), onde 17 isolados analisados foram reunidos, e o sub-agrupamento AI, contemplando apenas os isolados de referência.

O *Assemblage* B formou um único agrupamento, consistindo dos 15 isolados restantes analisados juntamente com as seqüências de referências incluídas na análise (AY178756; AY178751; AY178739).

4.2.2 Gene codificador da beta giardina (*bg*)

Das 49 amostras positivas microscopicamente para *G. duodenalis*, 47 foram submetidas à extração de DNA e reação de amplificação pelo gene *bg*. Em 40 (85,1%) foi possível a amplificação do fragmento alvo (Figura 5). Nas outras sete amostras o fragmento esperado no gel de agarose não foi observado.

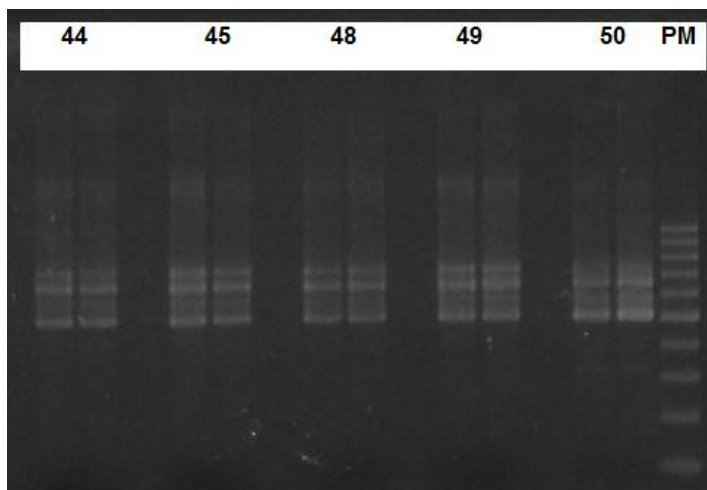


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% de fragmentos amplificados a partir do gene *bg*. Cada coluna dupla representa ampliações dos produtos de nested-PCR de aproximadamente 511pb, a partir de amostras fecais de hospedeiros naturalmente infectados com *G. duodenalis*. PM: Peso molecular, múltiplos de 100 pares de bases

Das 40 amostras amplificadas pelo gene *bg*, em 39 (97,5%) foi possível seqüenciar o produto amplificado.

De acordo com a análise molecular dois agrupamentos genéticos foram identificados, o *Assemblage A* em 15 isolados e o *Assemblage B* nas 24 amostras restantes (Figura 2).

Através da análise de SNPs, dois genótipos (A2 e A3) foram identificados dentre os isolados caracterizados como *Assemblage A*. Estes genótipos são diferenciados por substituições em duas posições, 421 e 429 (Figura 6).

		52	162	255	354	378	411	421	429	444	462	502	534	564	567	582	690
AI	A1 EU014390	A	C	C	T	T	C	C	T	T	A	G	G	T	C	A	A
	A5	.	T	.	.	.	T
AII	A2 EU014393	C	T	.	G
	A2 J4	#	#	#	#	#
	A2 J8	#	#	#	#	#
	A2 J17	#	T	.	#
	A2 J20	#	T	.	#
	A2 J38	#	T	#	#
	A2 J48	#	T	.	#
	A3 EU014381	C	T	C	T	.	G
	A3 J1	#	T	C	T	#	#
	A3 J6	#	T	C	T	.	#
	A3 J7	#	#	T	C	T	.	#
	A3 J10	#	T	C	T	.	#
	A3 J16	#	T	C	T	.	#
	A3 J19	#	T	C	T	.	#
	A3 J25	#	T	C	T	.	#
	A3 J26	#	T	C	T	.	#
	A3 J49	#	T	C	T	.	#
	A4 AB195223	#	A
	AIII	A6	.	.	T	C	C	.	C	C	G	.	A	C	.	G	.

Figura 6 – Identificação dos genótipos de *Giardia duodenalis* pertencentes ao *Assemblage* A, através do gene *bg*, baseado na análise de SNPs. Substituições de nucleotídeos (em negrito) numeradas a partir do códon ATG de cada gene; pontos indicam identidade ao genótipo A1 (seqüência de referência); #: sítios não determinados

Das 15 amostras caracterizadas como *Assemblage* A, seis foram idênticas ao genótipo A2, nove apresentaram identidade ao genótipo A3.

A identificação molecular das seqüências pertencentes ao *Assemblage* B foi realizada por inferência filogenética, como pode ser verificado pela observação das topologias das árvores genealógicas ilustradas na figura 7.

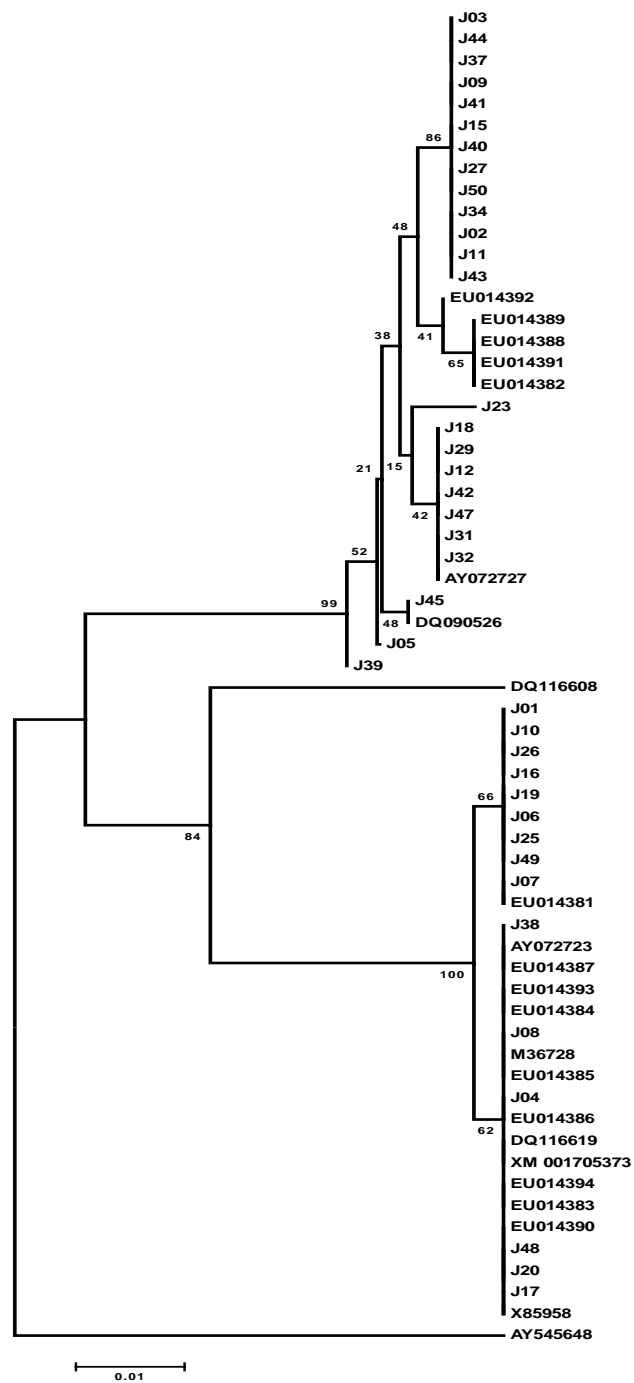


Figura 7 – Reconstrução filogenética das seqüências de nucleotídeos do gene *bg* provenientes de isolados de *G. duodenalis*. Reconstrução inferida por método de distância *neighbor-joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood*. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

Em seqüência de *bg* do isolado J47, identificado como *Assemblage* B, foi observado um sítio polimórfico, caracterizado por picos duplos de nucleotídeos na posição 186. Este foi o único evento de polimorfismo identificado em seqüências de *bg* nas amostras deste experimento.

Seqüências de referência de isolados de *G. duodenalis* representando os *Assemblages* D (AY545648) e E (DQ116608) foram incluídas na análise filogenética demonstrando a formação de grupos distintos em relação às amostras avaliadas nesse estudo.

Dois cladogramas distintos são identificados com a reconstrução filogenética obtida com o gene *bg*. Em um deles, 24 isolados estão associados ao *assemblage* B juntamente com as seqüências de referência (EU014392; EU014389; EU014388; EU014391; EU014382; AY072727; DQ090526) e no outro, 15 isolados referentes ao *Assemblage* A, agrupados com os de referência (EU014381; AY072723; EU014387; EU014393; EU014384; M36728; EU014385; EU014386; DQ116619; XM001705373; EU014394; EU014383; EU014390; X85958).

4.2.3 Análise conjunta dos resultados gerados pelas PCRs direcionadas à *gdh* e *bg*

Considerando as amostras positivas pela técnica de Sheater, em 37 a amplificação por ambas as PCRs ocorreu com êxito. Uma amostra foi amplificada somente pela PCR direcionada ao gene *gdh*, três apenas pela PCR direcionada ao gene *bg* e seis não foram amplificadas por nenhuma das duas PCRs. Pela análise da estatística *Kappa* (*k*), as técnicas de PCRs tiveram boa concordância ($k = 0,70$).

Cinco isolados apresentaram identidades diferentes quando a análise dos dois genes foi combinada. Três isolados pertencentes ao *Assemblage* A pela análise do gene *gdh* foram agrupados como *Assemblage* B, após análise do gene *bg* (isolados J23, J45 e J50). A situação inversa foi observada em dois isolados (J8 e J49) (Figura 2).

5 DISCUSSÃO

Atualmente, diversas ferramentas moleculares têm sido utilizadas para melhor esclarecer a epidemiologia e taxonomia do protozoário *G. duodenalis*, que apesar de apresentar isolados morfologicamente indistinguíveis ainda podem ser classificados em diferentes agrupamentos genéticos. Esse é o principal motivo que tem levado diversos grupos de pesquisadores considerarem este grupo de organismos como uma espécie complexa, apesar de sua longa história e ubiquidade.

Nesta pesquisa, isolados de *G. duodenalis* provenientes de amostras fecais de origem humana da Baixada Santista foram caracterizados molecularmente através da análise de fragmentos dos genes codificadores da *gdh* e *bg*, se tornando este, o primeiro estudo a fornecer devidas informações genéticas do protozoário na região geográfica.

A amplificação dos isolados de *G. duodenalis* foi possível em 87,7% (43/49) das amostras microscopicamente positivas, por pelo menos um ou ambos os genes utilizados. A não amplificação dos seis isolados remanescentes pode ter ocorrido devido a pouca quantidade de cistos presentes ou à perda dos mesmos no processo de recuperação. Uma maneira de tentar aumentar positividade da PCR nestes casos poderia ser a utilização de outro método para a recuperação dos cistos nas amostras onde os mesmos são escassos.

Em 37 isolados, a amplificação ocorreu com sucesso com ambos os genes utilizados, visto que, uma amostra foi amplificada somente pelo PCR direcionada ao *gdh* e três foram amplificadas apenas pela PCR baseada em *bg*. A razão para tal é desconhecida, mas resultados similares são observados por diversos grupos de pesquisadores (ROBERTSON et al., 2006; ROBERTSON et al., 2007; GEURDEN et al., 2009; LALLE et al., 2009). Contudo, pela análise estatística *Kappa* as técnicas de PCRs apresentaram boa concordância. É possível que, pelo fato de o gene *bg* ser mais conservado que *gdh*, a PCR direcionada a este último marcador tenha falhado em razão de diversidade nas amostras negativas (no local de ancoragem dos *primers*). Outro fator importante pode ser decorrente das diferentes dimensões de produtos amplificados gerados pelas duas PCRs em questão, pois quanto menor o fragmento amplificado, mais sensível a PCR tende a ser.

Em nossos resultados pode ser observado que 34 isolados foram seqüenciados pelo gene *gdh* e 39 pelo gene *bg*. Nas demais amostras a amplificação foi bem sucedida, porém as seqüências se mostraram de baixa qualidade, não sendo possível a comparação com outras representativas na literatura com conseqüente identificação molecular.

A identificação molecular dos 43 isolados mostrou que o *assemblage* B da *G. duodenalis* é o mais freqüente na região litorânea, ocorrendo em 53,5% (n=23) das amostras, sendo que o *Assemblage* A foi identificado em 34,8% (n=15). Em cinco (11,6%) foi observada infecção mista (Figura 2).

Estudos realizados em diferentes localizações geográficas confirmam que apenas os *assemblages* A e B são associados com infecção em humanos e a prevalência de cada agrupamento varia consideravelmente de país para país. Nossos resultados, com a predominância do *assemblage* B, diferem dos estudos provenientes da Nova Zelândia, Egito, Etiópia, Itália e México, onde o *assemblage* A foi o mais encontrado (CEDILLO-RIVERA et al., 2003; LALLE et al., 2005; GELANEW et al., 2007; WINKWORTH et al., 2008; HELMY; ABDEL-FATTAH; RASHED, 2009).

Aparentemente, o *assemblage* B ocorre com maior freqüência do que o *assemblage* A, porém, fortes relações não podem ser assinaladas (CACCIO; RYAN, 2008). Em Bangladesh a prevalência do *assemblage* B foi extremamente relevante, estando presente em 247 infecções, contra 36 do *assemblage* A (HAQUE et al., 2005). Na Austrália e Bélgica um alto índice também foi observado, contando com 75% e 74,4%, respectivamente (GEURDEN et al., 2009; YANG et al., 2010). Na Espanha, Itália, Holanda e Tailândia, o agrupamento B também se mostrou mais freqüente que o *assemblage* A (VAN DER GIESSEN et al.; 2006; SAHAGUN et al., 2008; CALDERARO et al., 2010; KOSUWIN, et al., 2010).

No Brasil, em apenas duas regiões (São Paulo e Rio de Janeiro) foram realizados estudos em nível molecular objetivando a identificação dos *assemblages* de *G. duodenalis* em amostras de origem humana. Em São Paulo, de um total de 37 amostras analisadas, o *assemblage* B foi identificado em apenas oito e, curiosamente, no estado do Rio de Janeiro este agrupamento não foi encontrado em nenhuma das 62 amostras caracterizadas (SOUZA et al., 2007; VOLOTÃO et al., 2007).

O *sub-assembly* AI é considerado o agrupamento de maior poder zoonótico (THOMPSON, 2004), porém, em nossos isolados o mesmo não foi encontrado. Em São Paulo, o *assembly* AI também não foi detectado em nenhuma das amostras de origem humana analisadas por Silvio et al. (2007).

Nossos resultados demonstram alto grau de polimorfismo gênico (presença de seqüências heterogêneas) entre os isolados caracterizados pelo locus *gdh*. Em 52,9% (n=34) das seqüências foram observado picos duplos em posições específicas do gene e, inesperadamente, esse fenômeno foi encontrado em oito amostras caracterizadas como *assembly* A. Morrison et al. (2007) seqüenciaram o genoma completo do *assembly* A e relatam que polimorfismo gênico é um achado pouco comum em seqüências de *assembly* A.

Ao contrário do agrupamento A, a ocorrência de sítios duplos de nucleotídeo tem sido comumente relatada em isolados pertencentes ao *assembly* B (GELENEW et al, 2007; LEBBAD et al., 2008; SPRONG et al., 2009). No trabalho presente, o gene *gdh* mostrou mais ocorrência de polimorfismo gênico do que o *bg*, com sítios duplos ocorrendo em 58,8 e 4,1%, respectivamente, nas seqüências pertencentes ao agrupamento B. Recentemente, Lalle et al. (2009) mostraram que o polimorfismo em *gdh* ocorreu em 90% dos isolados contra 50% de isolados com polimorfismos em seqüências de *tpi*. No trabalho de Caccio et al. (2008), o fenômeno foi observado em 75% das seqüências de *gdh* e em 36% de *bg*.

Em nossos resultados, 16,6% (n=5) dos isolados apresentaram identidades diferentes quando a análise dos dois genes foi combinada. A discordância entre locus tem se tornado cada vez mais aparente e alguns autores recomendam cautela na utilização de apenas um marcador molecular para estudos de genotipagem (READ; MONIS; THOMPSON, 2004; SPRONG et al., 2009).

Os dois eventos, a saber, ocorrência de polimorfismo gênico e diferença na caracterização molecular pela utilização de mais de um locus podem ser explicados por dois principais mecanismos: (i) heterozigose de seqüência alélica (ASH) e (ii) infecções mistas, caracterizado pela presença de cistos geneticamente distintos na mesma amostra, tendo um genótipo preferencialmente amplificado em relação aos demais. Segundo alguns autores, a ocorrência de ASH varia para os diferentes agrupamentos, sendo muito mais comum em isolados pertencentes ao *Assembly* B do que ao *Assembly* A (COOPER et al., 2007; CACCIO; RYAN, 2008; FRANZEN et al., 2009). A análise molecular de um único cisto esclareceria qual dos

dois eventos citados acima seria o responsável pelo registro de seqüências heterogêneas e/ou pelo registro de *assemblages* recombinantes (como exemplo de *assemblage* recombinante indica-se aquele que é determinado como A por um lócus e B por outro).

As seqüências de isolados pertencentes ao *assemblage* All pelo gene *gdh*, foram idênticas às seqüências previamente publicadas por Cacciò et al. (2008). De acordo com a análise de SNPs é possível observar que os genótipos A2, A3 e A4 diferem entre si pela substituição de apenas dois nucleotídeos, localizados nas posições 685 e 699. Em nossos resultados, duas amostras são classificadas como genótipo A4 em *gdh*. Essas amostras diferem dos demais genótipos (A2 e A3) em dois sítios polimórficos inéditos, observados nas posições 1209 e 1233. É possível que esses sítios sejam marcadores adicionais para o genótipo A4. Porém, para tal afirmação mais estudos serão necessários, até que mais seqüências tenham estas posições determinadas.

Robertson et al. (2006) ao encontrarem sítios polimórficos inéditos em seqüências por eles analisadas, citaram os autores Lalle et al. (2005) que descreveram um novo genótipo baseado em apenas um SNP e assim levantaram a questão de quais seriam os critérios adequados para a classificação de novos genótipos dos *Assemblages* de *G. duodenalis*.

Em relação aos genótipos pertencentes ao agrupamento A pela análise do gene *bg*, todos apresentaram identidade com os encontrados na literatura, sendo os A2 e A3 diferenciados entre si pela substituição de apenas dois nucleotídeos, localizados nas posições 421 e 429.

Ainda a respeito do trabalho realizado pelo grupo de pesquisadores do Cacciò (2008), sete MLGs foram identificados dentro do *Assemblage* All com a combinação dos genótipos *bg*, *tpi* e *gdh*. Em nosso trabalho, dois MLGs inéditos foram encontrados, representados pela combinação dos genótipos A2/A3 e A4/A2 (para *gdh* e *bg*, respectivamente). Nossos resultados indicam que mais MLGs devem ser registrados, conforme mais genes sejam pesquisados.

Em relação às análises filogenéticas realizadas no presente projeto, a árvore genealógica reconstruída com dados de *gdh* demonstrou que os *Assemblages* AI e All são claramente identificados, pois dois ramos diferenciando-os foram formados com valores consistentes de *bootstrap*. Em contraste, essa diferenciação não foi observada com a reconstrução baseada em *bg*.

Os sub-agrupamentos AI e All possuem diversos sítios polimórficos específicos no gene *gdh* que nos permite essa diferenciação, porém, o gene *bg* por ser mais conservado, não possui substituições claras o suficiente para a determinação dos mesmos (WIELINGA; THOMPSON, 2008).

As subdivisões intra *Assemblage* B não foram confirmadas pelas inferências filogenéticas com nenhum dos dois loci utilizados neste estudo, demonstrando assim que esse agrupamento não possui polimorfismos basais específicos para tal identificação. Por esse mesmo motivo a análise a partir de SNPs não foi realizada neste agrupamento. Embora alguns autores dividam o *Assemblage* B em dois grupos, BIII e BIV (MONIS et al., 1999; MONIS; THOMPSON, 2003; THOMPSON, 2004), neste trabalho, assim como no de Souza et al. (2007), esta sub-estruturação não foi observada.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que:

- A participação de genótipos zoonóticos de *G. duodenalis* pertencentes ao *assemblage* B é relevante na epidemiologia das giardiases nos indivíduos residentes nas cidades litorâneas do estado de São Paulo.
- Nenhum isolado de *G. duodenalis* classificado como *assemblage* A teve o perfil genotípico compatível com o perfil zoonótico AI.
- A PCR direcionada ao gene *bg* apresentou mais eficiência na detecção de *Giardia duodenalis* do que a PCR direcionada ao gene *gdh*.
- O fragmento de gene *bg* analisado neste estudo não permite discriminar os sub-agrupamentos pertencentes aos *assemblages* de *G. duodenalis* sendo filogeneticamente menos informativo que o fragmento *gdh*.
- Associações inéditas de genótipos *gdh* e *bg* foram encontradas nas amostras analisadas neste estudo, indicando diversidade nos isolados do Brasil, em relação a isolados de outras partes do mundo.

REFERÊNCIAS

- ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 447-475, 2001.
- ANKARKLEV, J.; JERLSTROM-HULTQVIST, J.; RINGQVIST, E.; TROELL, K.; SVARD, S. G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 413-422, 2010.
- APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife--current status and future needs. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 370-376, 2005.
- BALLWEBER, L. R.; XIAO, L.; BOWMAN, D. D.; KAHN, G.; CAMA, V. A. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 180-189, 2010.
- CACCIO, S. M.; DE GIACOMO, M.; POZIO, E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 1023-1030, 2002.
- CACCIO, S. M.; BECK, R.; LALLE, M.; MARINCULIC, A.; POZIO, E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1523-1531, 2008.
- CACCIO, S. M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 2, p. 75-80, 2008.
- CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 9, p. 430-437, 2005.
- CALDERARO, A.; GORRINI, C.; MONTECCHINI, S.; PERUZZI, S.; PICCOLO, G.; ROSSI, S.; GARGIULO, F.; MANCA, N.; DETTORI, G.; CHEZZI, C. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the laboratory diagnosis of giardiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 3, p. 261-267, 2010.

CARMENA, D.; AGUINAGALDE, X.; ZIGORRAGA, C.; FERNÁNDEZ-CRESPO J. C.; OCIO, J. A. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 619-629, 2007.

CEDILLO-RIVERA, R.; DARBY, J. M.; ENCISO-MORENO, J. A.; ORTEGA-PIERRES, G.; EY, P. L. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. **Parasitology Research**, v. 90, n. 2, p. 119-123, 2003.

COOPER, M. A.; ADAM, R. D.; WOROBEY, M.; STERLING, C. R. Population genetics provides evidences for recombination in *Giardia*. **Current Biology**, v. 17, p. 1984-1988, 2007.

DE CARVALHO, T. B.; DE CARVALHO, L. R.; MASCARINI, L. M. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (Sao Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 48, n. 5, p. 269-273, 2006.

ELMENDORF, H. G.; DAWSON, S. C.; MCCAFFERY, J. M. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 1, p. 3-28, 2003.

ERLANDSEN, S. L.; BEMRICK, W. J. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. **Journal of Parasitology**, v. 73, n. 3, p. 623-629, 1987.

ERLANDSEN, S. L.; BEMRICK, W. J.; WELLS, C. L.; FEELY, D. E.; KNUDSON, L.; CAMPBELL, S. R.; VAN KEULEN, H.; JARROLL, E. L. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). **Journal of Parasitology**, v. 76, n. 5, p. 717-724, 1990.

FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 35-54, 2000.

FRANZEN, O.; JERLSTROM-HULTQVIST, J.; CASTRO, E.; SHERWOOD, E.; ANKARKLEV, J.; REINER, D. S.; PALM, D.; ANDERSSON, J. O.; ANDERSSON, B.; SVARD, S. G. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, p. e1000560, 2009.

- FURNESS, B. W.; BEACH, M. J.; ROBERTS, J. M. Giardiasis surveillance--United States, 1992-1997. **MMWR CDC Surveillance Summaries**, v. 49, n. 7, p. 1-13, 2000.
- GELANEW, T.; LALLE, M.; HAILU, A.; POZIO, E.; CACCIO, S. M. Molecular characterization of human isolation of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. **Acta Tropica**, v. 102, n.2, p. 92-99, 2007.
- GEURDEN, T.; LEVECKE, B.; CACCIO, S. M.; VISSER, A.; DE GROOTE, G.; CASAERT, S.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. **Parasitology**, v. 136, n. 10, p. 1161-1168, 2009.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAQUE, R.; ROY, S.; KABIR, M.; STROUP, S. E.; MONDAL, D.; HOUP, E. R. *Giardia* Assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 12, p. 2171-2173, 2005.
- HELMY, M. M.; ABDEL-FATTAH, H. S.; RASHED, L. Real-time PCR/RFLP assay to detect *Giardia intestinalis* genotypes in human isolates with diarrhea in Egypt. **Journal of Parasitology**, v. 95, p. 1000-1004, 2009.
- HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. **Puerto Rico Journal of Public Health Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-291, 1934.
- HOMAN, W. L.; MANK, T. G. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 822-826, 2001.
- KOSUWIN, R.; PUTAPORNTIP, C.; PATTANAWONG, U.; JONGWUTIWES, S. Clonal diversity in *Giardia duodenalis* isolates from Thailand: evidence for intragenic recombination and purifying selection at the beta giardin locus. **Gene**, v. 449, n. 1-2, p. 1-8, 2010.
- LALLE, M.; BRUSCHI, F.; CASTAGNA, B.; CAMPA, M.; POZIO, E.; CACCIO, S. M. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 8, p. 834-838, 2009.

- LALLE, M.; POZIO, E.; CAPELLI, G.; BRUSCHI, F.; CROTTI, D.; CACCIÒ, S. M. Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 207-213, 2005.
- LEBBAD, M.; ANKARKLEV, J.; TELLEZ, A.; LEIVA, B.; ANDERSSON, J. O.; SVARD, S. Dominance of *Giardia* assemblage B in Leon, Nicaragua. **Acta Tropica**, v. 106, n. 1, p. 44-53, 2008.
- LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, n. 1, p. 121-155, 1919.
- MACHADO, R. C.; MARCARI, E. L.; VECHIATO, S. D. F.; CARARETO, C. M. A. Giardíase e helmintíases em crianças de creches e escolas de 1° e 2° grau (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 697-704, 1999.
- MASCARINI, L. M.; DONALISIO, M. R.. Giardíase e Cryptosporidiose em crianças intitucionalizadas em creches no estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 577-579, 2006.
- MATTAJ, I. W.; MCPHERSON, M. J.; WOOTTON, J. C. Localisation of a strongly conserved section of coding sequence in glutamate dehydrogenase genes. **FEBS Letters**, v. 147, n. 1, p. 21-25, 1982.
- MOHAMMED MAHDY, A. K.; SURIN, J.; WAN, K. L.; MOHD-ADNAN, A.; AL-MEKHLAFI, M. S.; LIM, Y. A. *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. **Acta Tropica**, v. 112, n. 1, p. 67-70, 2009.
- MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. **Molecular Biology Evolution**, v. 16, n. 9, p. 1135-1144, 1999.
- MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; MACKRILL, J.; KULDA, J.; ISAAC-RENTON, J. L.; EY, P. L. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. **Parasitology**, v. 116, (P. 1), p. 7-19, 1998.
- MONIS, P. T.; CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 93-100, 2009.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 233-244, 2003.

MORRISON, H. G.; MCARTHUR, A. G.; GILLIN, F. D.; ALEY, S. B.; ADAM, R. D.; OLSEN, G. J.; BEST, A. A.; CANDE, W. Z.; CHEN, F.; CIPRIANO, M. J.; DAVIDS, B. J.; DAWSON, S. C.; ELMENDORF, H. G.; HEHL, A. B.; HOLDER, M. E.; HUSE, S. M.; KIM, U. U.; LASEK-NESELQUIST, E.; MANNING, G.; NIGAM, A.; NIXON, J. E. J.; PALM, D.; PASSAMANECK, N. E.; PRABHU, A.; REICH, C. I.; REINER, D. S.; SAMUELSON, J.; SVARD, S. G.; SOGIN, M. L. Genomic Minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Science**, v. 317, n. 5846, p. 1921-1926, 2007.

READ, C. M.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 125-130, 2004.

READ, C.; WALTERS, J.; ROBERTSON, I. D.; THOMPSON, R. C. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 229-231, 2002.

ROBERTSON, L. J.; FORBERG, T.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B. K.; LANGELAND, N. Molecular characterisation of *Giardia isolates* from clinical infections following a waterborne outbreak. **Journal of Infection**, v. 55, n. 1, p. 79-88, 2007.

ROBERTSON, L. J.; HANEVIK, K.; ESCOBEDO, A. A.; MORCH, K.; LANGELAND, N. Giardiasis--why do the symptoms sometimes never stop? **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 75-82, 2010.

ROBERTSON, L. J.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B. K.; STRAND, E.; ALVSVAG, J. O.; LANGELAND, N. Application of Genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 2212-2217, 2006.

SAHAGUN, J.; CLAVEL, A.; GONI, P.; SERAL, C.; LLORENTE, M. T.; CASTILLO, F. J.; CAPILLA, S.; ARIAS, A.; GOMEZ-LUS, R. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 81-83, 2008.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.

- SCOTT, K. G.; MEDDINGS, J. B.; KIRK, D. R.; LEES-MILLER, S. P.; BURET, A. G. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. **Gastroenterology**, v. 123, n. 4, p. 1179-1190, 2002.
- SHEATER, A. L. The detection of intestinal protozoa and man-geparasites by a flotation technique. **Journal of Comparative Pathology**, v. 36, p. 266-275, 1923.
- SMITH, H. V.; CACCIO, S. M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 160-167, 2006.
- SOUSA, M. C.; MORAIS, J. B.; MACHADO, J. E.; POIARES-DA-SILVA, J. Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. **Journal of Eukaryot Microbiology**, v. 53, p. S174-176, 2006. Suppl 1.
- SOUZA, S. L.; GENNARI, S. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; PENA, H. F.; FUNADA, M. R.; CORTEZ, A.; GREGORI, F.; SOARES, R. M. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 258-264, 2007.
- SPRONG, H.; CACCIO, S. M.; VAN DER GIESSEN, J. W. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, p. e558, 2009.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.
- TASHIMA, N. T.; SIMOES, M. J.; LEITE, C. Q.; FLUMINHAN, A.; NOGUEIRA, M. A.; MALASPINA, A. C. Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 1, p. 19-24, 2009.
- THOMPSON, R. C. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1259-1267, 2000.

THOMPSON, R. C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 15-35, 2004.

THOMPSON, R. C.; HOPKINS, R. M.; HOMAN, W. L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 210-213, 2000.

THOMPSON, R. C.; MONIS, P. T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**, v. 58, p. 69-137, 2004.

THOMPSON, R. C.; REYNOLDSON, J. A.; MENDIS, A. H. *Giardia* and giardiasis. **Advances in Parasitology**, v. 32, p. 71-160, 1993.

VAN DER GIESSEN, J. W. B.; DE VRIES, A.; ROOS, M.; WIELINGA, P.; KORTBEEK, L. M.; MANK, T. G. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 849-858, 2006.

VAN KEULEN, H.; FEELY, D. E.; MACECHKO, P. T.; JARROLL, E. L.; ERLANDSEN, S. L. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 294-300, 1998.

VOLOTAO, A. C.; COSTA-MACEDO, L. M.; HADDAD, F. S.; BRANDAO, A.; PERALTA, J. M.; FERNANDES, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. **Acta Tropica**, v. 102, n. 1, p. 10-19, 2007.

WEBER, K.; SCHNEIDER, A.; MULLER, N.; PLESSMANN, U. Polyglycylation of tubulin in the diplomonad *Giardia lamblia*, one of the oldest eukaryotes. **FEBS Letters**, v. 393, n. 1, p. 27-30, 1996.

WIELINGA, C. M.; THOMPSON, R. C. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. **Parasitology**, v. 134, n. pt 12, p. 1795-1821, 2007.

WINKWORTH, C. L.; LEARNMONTH, J. J.; MATTHAEI, C. D.; TOWNSEND, C. R. Molecular characterization of *Giardia* isolates from calves and humans in a region in which dairy farming has recently intensified. **Applied and Environment Microbiology**, v. 74, n. 16, p. 5100-5105, 2008.

YANG, R.; LEE, J.; NG, J.; RYAN, U. High prevalence *Giardia duodenalis* assemblage B and potentially zoonotic subtypes in sporadic human cases in Western Australia. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 3, p. 293-297, 2010.

YEE, J.; DENNIS, P. P. Isolation and characterization of a NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene from the primitive eucaryote *Giardia lamblia*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7539-7544, 1992.