

ALANIS CARDOSO COSTA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *GIARDIA DUODENALIS*,
CRYPTOSPORIDIUM spp. E *BLASTOCYSTIS spp.* COM POTENCIAL
ZONÓTICO EM CÃES DA CIDADE DE BELÉM, PARÁ

BELÉM
2023

ALANIS CARDOSO COSTA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *GIARDIA DUODENALIS*,
CRYPTOSPORIDIUM spp. E *BLASTOCYSTIS spp.* COM POTENCIAL
ZONÓTICO EM CÃES DA CIDADE DE BELÉM, PARÁ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marcelo Rodriguez Málaga. Departamento de Parasitologia – ICB – UFPA

BELÉM
2023

ALANIS CARDOSO COSTA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *GIARDIA DUODENALIS*,
CRYPTOSPORIDIUM spp. E *BLASTOCYSTIS spp.* COM POTENCIAL
ZONÓTICO EM CÃES DA CIDADE DE BELÉM, PARÁ

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do Curso
de Bacharelado em Ciências
Biológicas, Modalidade Biologia da
Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para a obtenção do
grau de Bacharel em Biologia.

Belém, ____ de _____ de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: _____
Prof. Dr. Sérgio Marcelo Rodriguez Málaga.
Departamento de Parasitologia – ICB – UFPA

Avaliadora: _____
Profa. Dra. Maristela Gomes da Cunha.
Laboratório de Imunologia – ICB – UFPA

Avaliadora: _____
Profa. Dra. Lucimar Di Paula do Santos Madeira.
Laboratório de Microbiologia – ICB – UFPA

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito.” (Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu agradeço a mim, por todo o esforço e dedicação que empreguei nesse trabalho e por ter persistido em frente aos problemas que surgiram durante à graduação.

Aos meus pais, por todo o apoio, incentivo e amor que me deram durante toda a minha vida, por acreditarem nos meus sonhos e por todo investimento que fizeram na minha educação.

Ao meu orientador, professor Sérgio Málaga, por todos os conselhos e ideias que me ajudaram a fazer esse TCC e que com certeza me fizeram uma melhor pesquisadora, e por toda paciência que teve com os meus momentos de desânimo em frente aos problemas que surgiram durante a pesquisa.

Aos meus amigos de turma, em especial à Agatha, Marcio, Felipe, Henrique, Walber, Vinicius, João, Priscila, Duane e Amanda que me fizeram rir e descontrair quando estava estressada, desmotivada e que fizeram perceber que não estava sozinha nessa luta. E aos meus amigos do laboratório de zoologia e ecologia de vertebrados (LABEV) que além das risadas que também tiraram de mim, me aconselham e me inspiram todos os dias a ser cientista, em especial, à Silvita que está me inspirando desde o início da minha graduação.

E por último, mas não menos importante, eu agradeço ao Centro de Controle de Zoonoses pela parceria que me ajudou na realização desta pesquisa e à Universidade Federal do Pará, por me introduzir no meio acadêmico, me dando uma diversidade de oportunidades em pesquisa e extensão, e por me proporcionar aprender com professores incríveis durante a graduação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>GIARDIA DUODENALIS</i>	2
1.2. <i>CRYPTOSPORIDIUM SPP.</i>	4
1.3. <i>BLASTOCYSTIS SPP.</i>	7
2. OBJETIVOS	9
2.1. OBJETIVO GERAL.....	9
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. ASPECTOS ÉTICOS E TIPO DE ESTUDO	9
3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	9
3.3. COLETA DE AMOSTRAS E PROCESSAMENTO POR TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS	10
3.4. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	10
3.5. REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR).....	11
3.6. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	11
5. DISCUSSÃO	15
6. CONCLUSÃO	17
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

RESUMO

Devido à ausência de dados de caracterização molecular dos protozoários intestinais: *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e *Blastocystis* spp. em Belém, que permitam avaliar o risco de transmissão destes patógenos para seres humanos, e ao fato de serem patógenos zoonóticos, ou seja, transmissíveis de animais para humanos, é que esse estudo teve como objetivo determinar a prevalência da infecção em cães acolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Belém, assim como a caracterização filogenética destes protozoários. Para isso, foram obtidas 74 amostras de fezes de cães acolhidos no CCZ do município de Belém, as quais foram analisadas por PCR para a detecção de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e *Brastocystis* spp. Os nossos resultados mostraram que 37 amostras foram positivas para *G. duodenalis*, enquanto que *Cryptosporidium* spp. e *Blastocystis* spp. houve apenas resultados negativos. Em relação às amostras que resultaram positivas para *G. duodenalis*, foram obtidas 10 sequências correspondente ao gene da β -*giardina*, com as quais conseguiu se estabelecer que os protozoários pertenciam aos agrupamentos tipo A, tipo C e tipo D. Quando comparadas as amostras pertencentes ao agrupamento A com amostras coletadas a partir de seres humanos, conseguiu-se estabelecer uma correlação entre as sequências, indicando que existe transmissão zoonótica de *G. duodenalis* no município de Belém. Tal resultado é preocupante, justificado, principalmente, pelo saneamento precário da cidade de Belém e região metropolitana. Portanto, se faz necessário a criação de medidas educativas e de controle que visem o diminuir da transmissão deste protozoário para população.

Palavras-chave: *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium*, *Blastocystis*, Cães, Belém.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional de cães errantes e domiciliados em todo Brasil, associado ao fácil acesso destes animais a espaços públicos destinados às atividades recreativas, esportivas e educativas, aumentam o risco de transmissão de zoonoses no ambiente urbano (SOTERO-MARTINS et al., 2014). As zoonoses são definidas como todas as doenças infecciosas transmitidas naturalmente entre animais vertebrados e seres humanos (WHO, 2018) e vários estudos têm demonstrado que essas estão entre o grupo de doenças tropicais negligenciadas, apresentando significativo impacto na saúde pública, em especial para as crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas (NOORALDEEN, 2015; MELIN-COLOMA et al., 2016; PEÑA et al., 2017).

Dados da Organização Mundial da Saúde (2018) estimam que, somente no Brasil, existam cerca de 30 milhões de animais abandonados. Destes, 10 milhões correspondem a gatos e 20 milhões a cães, reforçando o papel destes animais como reservatórios de várias parasitoses de potencial zoonótico, constituindo fonte de infecção para humanos e outros animais, configurando assim um problema de saúde pública e veterinária.

A transmissão das zoonoses para o ser humano pode ocorrer de forma direta, ocorre através do contato direto com secreções (urina, fezes, sangue, ou outros fluidos corporais), ou ocorre por meio da mordedura ou arranhadura de animais contaminados com o agente etiológico, bem como entre seres humanos contaminados, por meio de contato com secreções; ou indiretamente, por meio da exposição à vetores representados por animais do filo Arthropoda, como as pulgas, ácaros, carrapatos ou outros animais que carregam o agente etiológico (GOMES et al., 2022). De acordo com Westgarth et al. (2007), cães e gatos podem albergar de 30 a 40 agentes zoonóticos, que são transmitidos por diferentes vias. Nesse sentido, as infecções causadas por parasitos intestinais, especialmente helmintos e protozoários, têm se destacado como a principal causa de morbidade nestes animais, causando, geralmente, má-absorção, vômitos, diarreia, anemia e perda de peso (VITAL, BARBOSA, ALVES, 2012; FUNADA et al., 2007).

De acordo com Quadros (2015), a presença destas infecções é principalmente relatada em animais errantes, canis, abrigados, lojas de animais, ou cães domiciliados, principalmente em condições de superpopulação e de imunossupressão. Nesse sentido, Os Centros de Controle de Zoonoses, cujas

funções são a prevenção e o controle de zoonoses nos municípios do Brasil e a instrução da responsabilidade dos tutores sobre a manutenção dos animais em condições adequadas, tem um papel relevante para estudos e monitoramento de zoonoses já que dentre as suas ações está a de prevenir, reduzir e eliminar as causas de sofrimento aos animais; e preservar a saúde e bem-estar da população (BARROSO & LIMA, 2013).

Até o momento, temos, ao todo, identificadas 1.415 espécies de organismos patogênicos ao homem, dos quais 61% podem ser transmitidos entre animais e seres humanos (LIMA & LUNA, 2012). Dentre estes patógenos zoonóticos, três grupos de protozoários intestinais, que apresentam relevância para a Saúde Pública, são o foco deste trabalho, são estes: *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e *Blastocystis* spp.

1.1. GIARDIA DUODENALIS

Com relação a *G. duodenalis* (Diplomonadida: Hexamitidae), também encontrado na literatura como *Giardia lamblia* ou *Giardia intestinalis*, é um microrganismo unicelular eucariótico flagelado, agente causador da giardíase, infecção intestinal de caráter cosmopolita (ADAM, 2001). Apresenta um ciclo direto ou monoxênico (Figura 1), apresentando dois estágios de desenvolvimento: cistos e trofozoítos (Figura 2). Os cistos (de forma oval, com 8–12 µm de comprimento e com quatro núcleos), ambientalmente resistentes, responsáveis pela transmissão de *G. duodenalis*, sendo eliminados em grande número nas fezes do hospedeiro e podem permanecer infecciosos por meses na água ou em áreas frias e úmidas. Estes estágios são adquiridos através da via fecal-oral, incluindo contato direto com fezes humanas ou animais ou através do consumo de água ou alimentos contaminados. Após a passagem pelo ambiente ácido do estômago, os cistos desencistam no intestino delgado, liberando dois trofozoítos móveis e binucleados (cada um com quatro pares de flagelos e um disco adesivo para fixação às células epiteliais intestinais), que se reproduzem assexuadamente por fissão binária longitudinal antes do encistamento em resposta à presença de sais biliares e pH levemente alcalino liberados no intestino. Estes últimos colonizarão a região proximal do intestino delgado e correspondem ao estágio vegetativo, responsável pela reprodução, expressão dos principais fatores de virulência e as conseqüentes manifestações clínicas (NEVES, 2016; ANKARKLEV et al., 2010; DIXON, 2021).

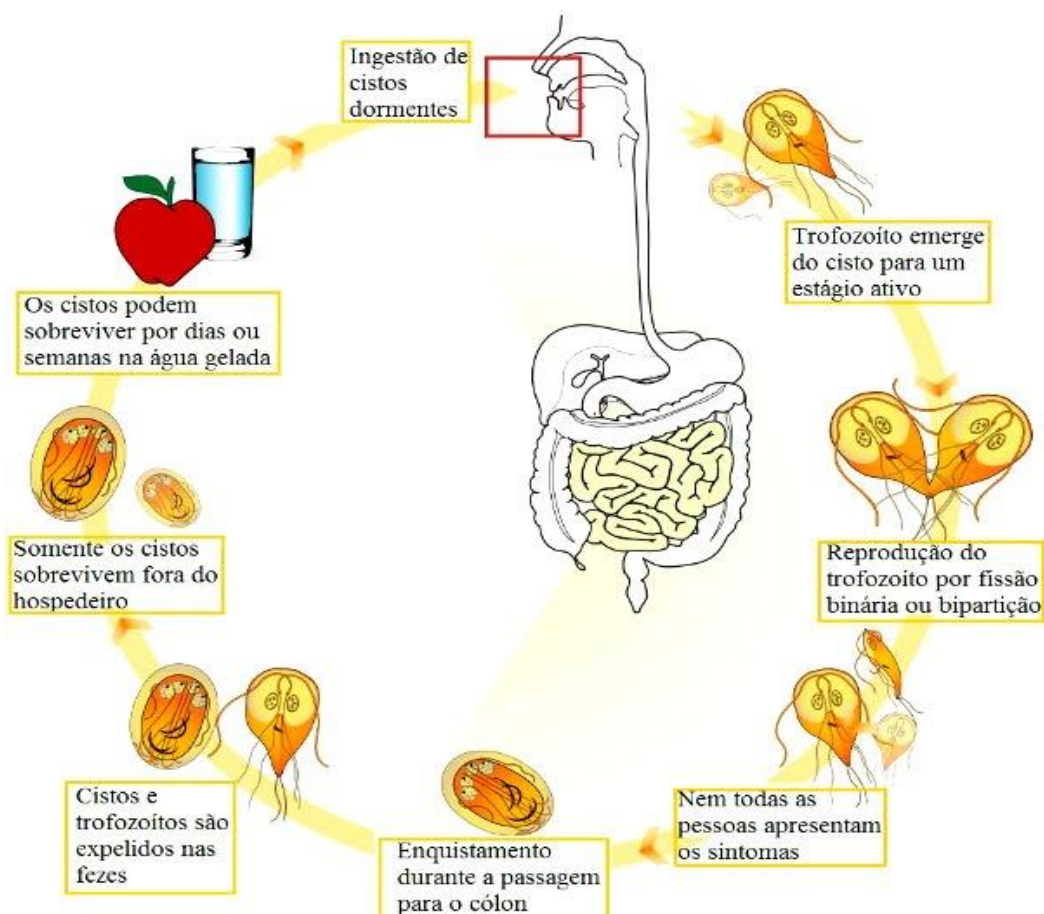


Figura 1: Ciclo biológico da *Giardia duodenalis*, onde observa-se as fases de ingestão, reprodução e saída do hospedeiro, com o estágio de desenvolvimento respectivo a essas do protozoário sendo demonstradas na imagem também. (Fonte: Adaptado de pngwing.com)

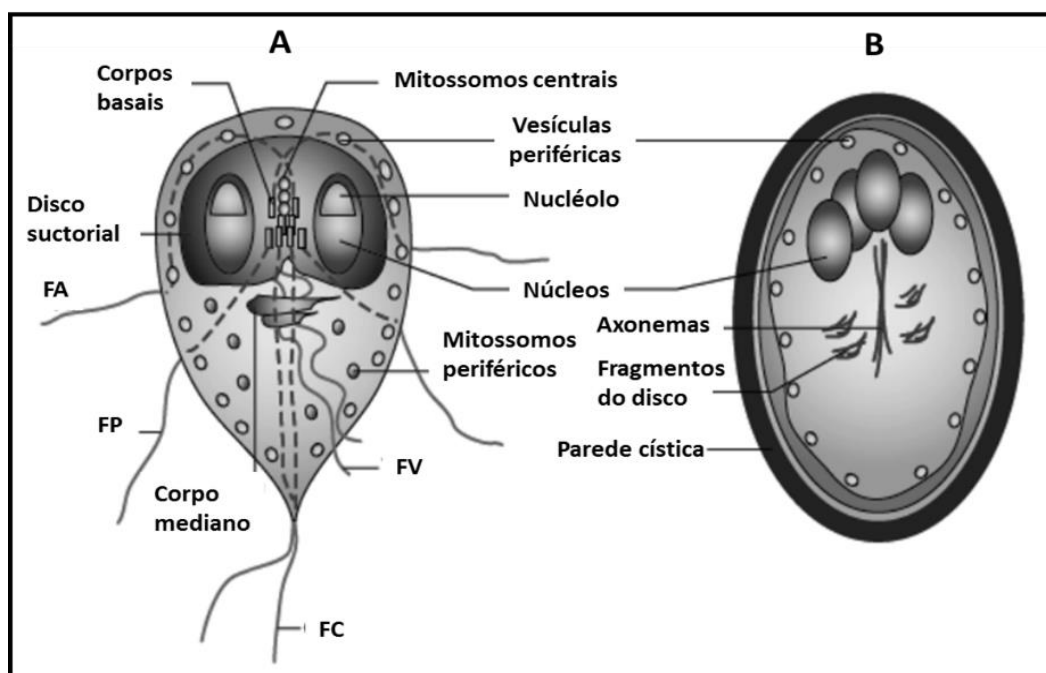


Figura 2: Estágios de desenvolvimento de *Giardia duodenalis* em Trofozoíto (A) com 4 pares de flagelos e presença de disco suctorial com finalidade de adesão à parede intestinal do indivíduo, e Cisto (B) com parede cística que o torna ambientalmente resistente. (Fonte: Adaptado de Ankarklev et al., 2010).

Na primeira metade do século XX, dezenas de espécies de giárdias foram descritas baseado em discretas diferenças morfológicas ou nos diferentes hospedeiros nos quais foram isoladas (FERREIRA; FORONDA, 2012). Assim, em 1952 passaram a serem reconhecidas somente três espécies morfológicamente diferentes: *G. duodenalis*, encontrada na maioria dos mamíferos, incluindo seres humanos e animais domésticos, *G. agilis*, que ocorre em anfíbios e *G. muris*, encontrada em roedores (FILICE, 1952), sendo posteriormente adicionadas mais duas espécies isoladas em aves (*G. psittaci* e *G. ardeae*).

Baseado em evidências filogenéticas e moleculares, *G. duodenalis* é considerada uma espécie composta por oito grupos genéticos diferentes ou agrupamentos, denominadas pelas letras A-H, que não apenas demonstram diferentes padrões de especificidade de hospedeiros, mas também diferem em uma série de outros aspectos fenotípicos (FENG & XIAO, 2011). Embora os estudos específicos dos agrupamentos de giárdias demonstram que os genótipos C e D são específicos para cães, os agrupamentos A e B foram encontradas nas infecções humanas e em outros mamíferos (incluindo cães e gatos) sendo reconhecidos como genótipos zoonóticos.

A giardiase em cães tem distribuição cosmopolita e prevalência com índices variáveis dependendo da região geográfica, idade, condição sanitária da população canina e técnica de diagnóstico empregada (QUADROS et al., 2015). Nos animais acometidos, o espectro de manifestações clínicas da giardiase é variável, podendo ocorrer desde uma infecção leve e autolimitada, até quadros clínicos severos, com desidratação, anorexia e dor abdominal, podendo apresentar retardo no crescimento e perda de peso (SCORZA; TANGTRONGSUP, 2010; BALLWEBER et al., 2010).

Segundo Balassiano (2007), a infecção entérica provocada pela giárdia nestes animais, geralmente, está associada a fatores causadores de estresse, como desmane, condições de superpopulação/confinamento, estado nutricional e imunológico do hospedeiro e doenças concomitantes, sendo frequente em animais jovens e/ou debilitados mantidos em ambientes fechados, como canis e abrigos.

1.2. *CRYPTOSPORIDIUM* spp.

Por outro lado, protozoários do gênero *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Conoidasida) são parasitos intracelulares obrigatórios, responsáveis por infecções intestinais de severidade variável que afetam humanos e animais (EDERLI et al.,

2008). A criptosporidiose vem sendo considerada uma doença emergente e oportunista, principalmente em indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e imunocomprometidos, o que torna a caracterização das espécies deste gênero de extrema relevância do ponto de vista da saúde pública, levando-se em consideração o potencial zoonótico de determinadas espécies (FAYER, 2004).

O ciclo biológico é do tipo monoxênico e se inicia após ingestão de oocistos esporulados, presentes na água e alimentos. Este protozoário apresenta um complexo ciclo biológico (Figura 3), que inclui: (i) excitação dos oocistos com liberação de esporozoítos no intestino delgado do hospedeiro, seguido da invasão das células epiteliais do intestino e formação de vacúolo parasitóforo, (ii) merogonia, correspondente à reprodução assexuada com três divisões celulares, originando gerações de merontes, (iii) gametogonia, com formação de macro e microgametas, (iv) fecundação, (v) formação dos oocistos de parede delgada, responsáveis pela autoinfecção, e os de parede espessa, eliminados nas fezes e responsáveis pela transmissão do parasito (TZIPORI; GRIFFTHS, 1998).

Estudos filogenéticos identificaram 38 espécies de *Cryptosporidium*, sendo 17 classificadas como zoonóticas ou identificadas em infecções humanas e 61 genótipos acometendo uma diversidade de hospedeiros, incluindo aves, répteis, peixes e mamíferos (CONDLOVÁ, 2018). Até o início da década de 90, *C. parvum* era considerada a principal espécie encontrada em amostras fecais de humanos e outros mamíferos, porém, com os avanços das técnicas moleculares, o *C. parvum* foi subdividido em dois genótipos distintos: genótipo I, denominado *C. hominis*, encontrado em amostras humanas de transmissão antroponótica, e o genótipo II, denominado *C. parvum*, encontrado em amostras humanas e bovinas, de transmissão zoonótica (PENG et al., 1997).

Diversos subtipos de *Cryptosporidium* spp. vêm sendo caracterizados através do uso de ferramentas moleculares, permitindo a identificação de seis subtipos de *C. hominis*, representados pela designação I (Ia, Ib, Id-Ig), e onze subtipos descritos para *C. parvum*, representado com o número II (IIa até IIk e III), dos quais os subtipos IIa e IIk foram identificados como zoonóticos (WALDRON & POWER, 2011; BRESCIANI et al., 2013).

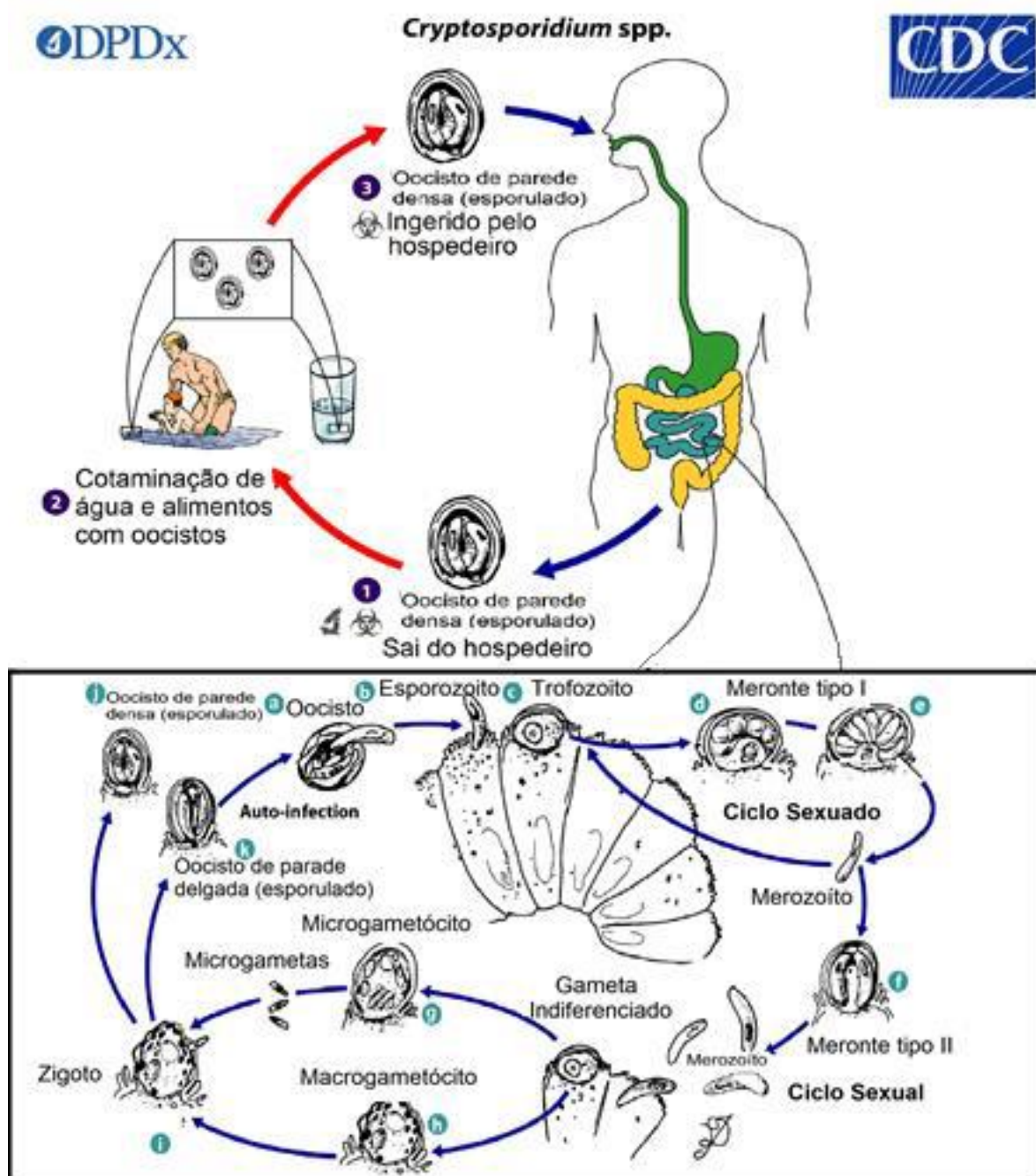


Figura 3: Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp., apresentando a complexidade dos seus estágios de desenvolvimento desde a infecção do hospedeiro até a saída do hospedeiro das formas infectantes para o meio ambiente. (Fonte: Adaptado de CDC, 2019).

A criptosporidiose em cães geralmente é assintomática, porém, quando sintomático, caracteriza-se por episódios recorrentes de caráter agudo de diarreia líquida, profusa e fétida, anorexia, má-absorção, febre moderada e enfraquecimento progressivo. Nos animais imunocompetentes e adultos, a infecção assume um caráter autolimitada, entretanto, de forma similar à giardíase, fatores ambientais, como

estresse, deficiências nutricionais e condições de superlotação em canis, podem induzir queda na resistência, acarretando no animal a instalação de infecção subclínica crônica (THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008). Por outro lado, animais jovens e/ou imunossuprimidos apresentam-se mais susceptíveis a infecção, sendo registrada alta taxa de letalidade (BRESCIANI et al., 2013).

1.3. *BLASTOCYSTIS* spp.

Da mesma forma, a blastocistose é causada por protozoários do gênero *Blastocystis*, organismos anaeróbios estritos que conseguem colonizar o intestino grosso, correspondendo ao parasito eucariótico mais frequentemente encontrado em pesquisas parasitológicas, infectando o ser humano e uma grande variedade de hospedeiros, incluindo animais domésticos (cães, gatos, galinhas, bovinos) e silvestres (anfíbios, répteis, aves) (CLARK et al., 2013). Um outro fato interessante sobre este protozoário é que está incluído no grupo dos Stramenopila, um grupo complexo de organismos heterotróficos e fotossintéticos, sendo assim, o único protozoário deste grupo que consegue parasitar o ser humano (WAWRZYNIAK et al., 2013).

Segundo Stenzel & Boreham (1996), *Blastocystis* spp. é um organismo polimórfico que apresenta quatro formas no seu desenvolvimento: a forma vacuolar, a granular, a ameboide e a cística (Figura 4). Entre estas, a vacuolar é o formato mais comumente encontrado em amostras clínicas, o seu tamanho é altamente variável, indo de 2 a 200 μm de diâmetro (média de 4 a 15 μm), apresentando formato esférico, um grande vacúolo central, que pode ocupar 90% do volume da célula, com conteúdo granular fino ou floculento, que parece ter uma função de armazenamento.

Desde o ponto genético, *Blastocystis* spp. apresenta uma elevada diversidade. Os isolados deste protozoário são divididos em 17 subtipos (ST) com base nas regiões polimórficas do gene da subunidade menor do RNA ribossomal (STENSVOLD et al., 2007), sendo encontrados em diferentes hospedeiros ou exclusivamente em infecções humanas. Nesse sentido, os genótipos ST1 ao 9, além do ST12 são encontrados em seres humanos. Destes o ST 1, 2, 3 e 4 são encontrados em amostras clínicas da Europa e os ST 1, 2 e 3, comumente encontrados nas amostras clínicas do continente Americano (JIMÉNEZ, JAIMES, RAMÍREZ, 2019).

errantes com o risco de transmissão zoonótica destes protozoários aos seres humanos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência da infecção por *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e *Blastocystis* spp. em cães acolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Belém, assim como a caracterização genética dos protozoários.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR) de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e *Blastocystis* spp., a partir de fezes de cães acolhidos pelo CCZ.
- Descrever a prevalência destes protozoários na população de animais estudados.
- Caracterizar filogeneticamente a população dos 3 protozoários citados anteriormente, isolados de fezes de cães do CCZ.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ASPECTOS ÉTICOS E TIPO DE ESTUDO

As amostras de fezes dos cães foram obtidas por coletas ativas no canil do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Belém. Para isso foram realizadas no período de janeiro de 2021 a maio de 2022, contando com a autorização do Comitê de Ética em Utilização de Animais da UFPA (CEUA nº 3359210920). O número de amostras por cada coleta teve variação por depender do número de cães recém acolhidos pelo CCZ. Como o número de ingresso de animais no CCZ não é constante e realizado em diferentes épocas do ano, foi estimado que, no período de estudo, seria possível coletar um número mínimo de 100 amostras de fezes individuais de cada cão. As coletas de amostras não interferiram na rotina de adaptação dos animais (banho de sol, alimentação, etc.), assim como na rotina de trabalho do CCZ.

3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos os cães acolhidos pelo CCZ que estejam em alojamentos individuais, com o intuito de identificar cada animal amostrado. Foram incluídos cães de diferentes idades, raças e tamanhos, que não apresentaram problemas de locomoção para evitar, desta forma, desconforto nesses animais. Foram excluídos os animais que não se enquadrem nos critérios de inclusão.

3.3. COLETA DE AMOSTRAS E PROCESSAMENTO POR TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS

As amostras de fezes foram coletadas das instalações individuais do CCZ no período da manhã, antes da lavagem do canil (07:30 h), para evitar contaminação ou perda total de amostras. Cada amostra foi coletada em tubos plásticos de 50 ml, colocadas em suporte térmico para transporte e encaminhadas para o Laboratório de Parasitologia do ICB UFPA. Cada amostra foi identificada com a informação de ingresso de cada animal (raça, tamanho aproximado, idade aproximada e peso). Foi coletada apenas uma amostra por cada animal.

As amostras foram submetidas às técnicas de Hoffman e de Willis que consisti em ressuspender as amostras, individualmente, em 50 mL de água destilada e posteriormente filtradas em gazes cirúrgicas para remoção de resíduos. Posteriormente, 15 mL da suspensão de cada amostra foi centrifugada a 2.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante resultante foi descartado. O precipitado de cada amostra foi ressuspendido em 15 ml de uma solução de cloreto de sódio saturada e centrifugado novamente a 1.000 rpm. Após este procedimento, 4 mL do sobrenadante foram transferidos para um tubo novo e diluído com água destilada até completar 15 mL. As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado contendo amostras concentradas de cistos e oocistos foi utilizado para a extração de DNA genômico.

3.4. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As amostras contendo cistos e oocistos dos protozoários foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante resultante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 500 µL de tampão de lise celular (NaCl 0.4M, EDTA 0.12M, SDS 20%, água destilada), submetidos a agitação suave e fervidos por 5 minutos. Após o procedimento, foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (Life Technology) e agitados vigorosamente por 30 segundos. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas novamente a 11.000 rpm por 15 minutos e, posteriormente, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo no qual foi adicionado um volume 1:1 de isopropanol. Os tubos foram agitados suavemente para facilitar a precipitação do DNA genômico. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o precipitado correspondente ao DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado a 11.000 rpm por 5 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA seco a temperatura ambiente.

Cada amostra foi ressuspensa em 30 µL de água ultrapura e estocada em freezer a -20°C até o momento da análise.

3.5. REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

Todas as amostras foram analisadas por PCR utilizando os seguintes oligonucleotídeos:

Para detecção de *G. duodenalis* foram utilizados os oligonucleotídeos descritos por Cacciò et al.(2002) que amplificam 384 bp do gene da *β-giardina*, G376 (5'-CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA-3') e G759 (5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'). As reações foram realizadas com o seguinte protocolo, após uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 94 °C, um conjunto de 35 ciclos foi executado, cada um consistindo em 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C e 60 segundos a 72°C, seguido de uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

No caso de *Cryptosporidium* spp. foi utilizado um *nested PCR* que amplifica um fragmento de 611 bp do gene 18S do RNA ribossomal (SILVA e t al., 2013). Os primers da primeira reação foram SHP1 (5'-ACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTAT-3') e SHP2 (5'-TTCTCATAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG-3') e os primers da segunda reação foram SHP3 (5'-ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACA-3') e SSU-R3 (5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'). Ambas as reações foram desenvolvidas utilizando o mesmo protocolo, 94°C por 3 min, 39 ciclos de 94°C por 45 s, 56°C por 45 s e 72°C por 60 s, seguido de uma extensão final de 72 °C por 10 min.

Por último, a detecção de *Blastocystis* spp. foi realizada utilizando os oligonucleotídeos RD5 (5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') e BhRDr (5'-GAGCTTTTTAACTGCAACAACG-3') (SCICLUNA et al., 2006) que amplificam um fragmento de aproximadamente 600 bp. As condições de amplificação consistiram em 5 min de desnaturação inicial, seguidas de 35 ciclos de 1 min cada a 94, 59 e 72 °C, com extensão final adicional de 10 min. O resultado de todas as amplificações foi observado em gel de agarose 1%.

3.6. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Após a reação de amplificação, os fragmentos de PCR foram purificados utilizando Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega) e sequenciados usando BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit. As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa EditSeq do pacote de programas Lasergene (DNASTar) e alinhadas com sequências de referência utilizando o programa CLUSTAL W.

Posteriormente, foi construído um dendograma através do método Neighbor-Joining utilizando software MEGA v.11 (TAMURA et al. 2021) e as distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura de 2 parâmetros (bootstrap 1000-réplicas).

4. RESULTADOS

Foram obtidas 74 amostras de fezes do CCZ do município de Belém para realização de PCR. Destas, tanto para *Cryptosporidium* spp. (Figura 5) quanto para *Blastocystis* spp. (Figura 6) não houve amplificação do material gênico, enquanto que para *G. duodenalis* resultaram 37 amostras (50% de prevalência) positivas (Figura 7), das 74 amostras. Foi realizado PCR para os três protozoários utilizando-se da mesma extração de DNA, o que mostrou apenas a presença de *G. duodenalis* nas fezes dos cães acolhidos.

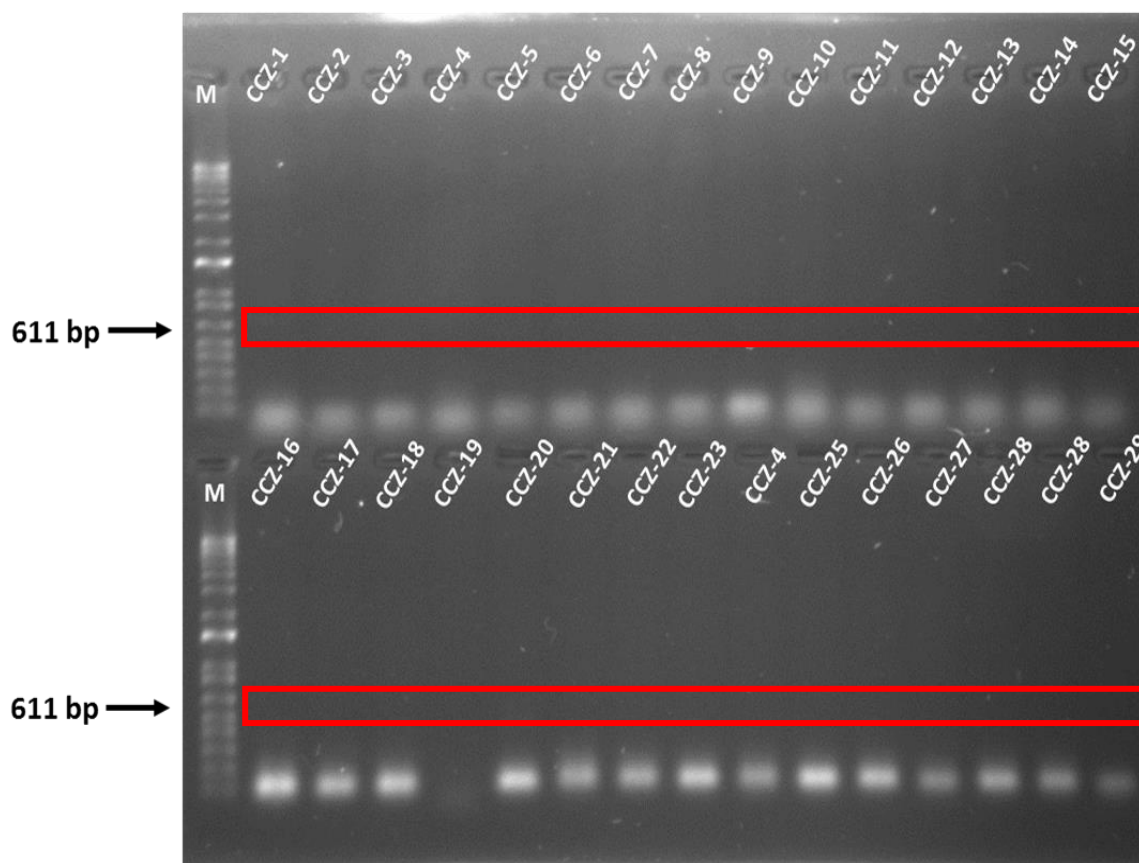


Figura 5: Eletroforese das PCRs realizadas para *Cryptosporidium* spp. Observa-se que não houve a amplificação esperada de 611 pares de base que corresponderia a resultados positivos para o protozoário em questão.

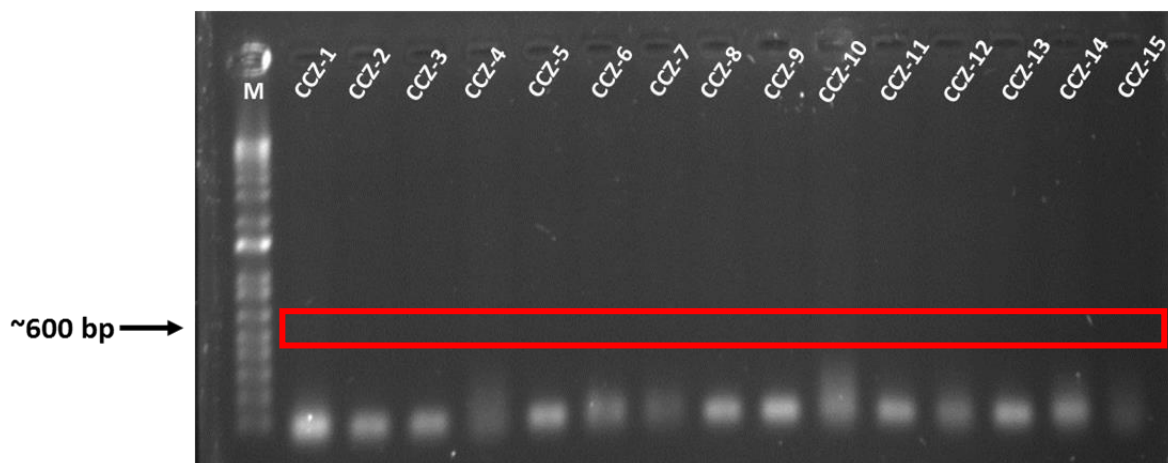


Figura 6: Eletroforese das PCRs realizadas para *Blastocystis* spp. Observa-se que não houve a amplificação esperada de 600 pares de base que corresponderia a resultados positivos para o protozoário em questão.

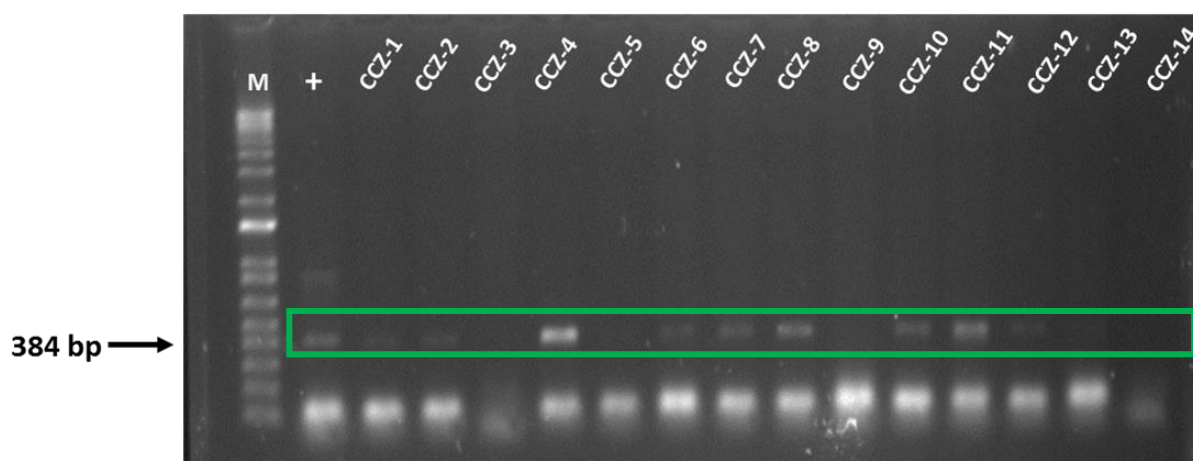


Figura 7: Eletroforese das PCRs realizadas para *G. duodenalis*. Observa-se que há uma quantidade significativa de amostras que amplificaram 384 pares de base, que resulta na amplificação correspondente à *Giardia duodenalis*, além de estar em comum acordo com o controle positivo, validando assim as amplificações obtidas.

Quanto as amostras que resultaram positivas para *G. duodenalis*, foi realizada o sequenciamento de 10 das 37 amostras, escolhidas aleatoriamente, das quais quatro obtivemos sequências de *G. duodenalis* referentes aos agrupamentos do tipo A, tipo C e tipo D (Figura 8), o que sugere que os cães acolhidos no CCZ chegaram infectados em vez de ter adquirido a doença somente no local. Quanto às sequências obtidas do agrupamento A, após compará-las com amostras já sequenciadas anteriormente pelo Laboratório de Parasitologia do ICB-UFGA de *G. duodenalis* em humanos do estado do Pará, descobriu-se que se tratava do mesmo sub genótipo, o All, o que revelou a similaridade das amostras encontradas em cães com as infectantes de humanos (Figura 9).

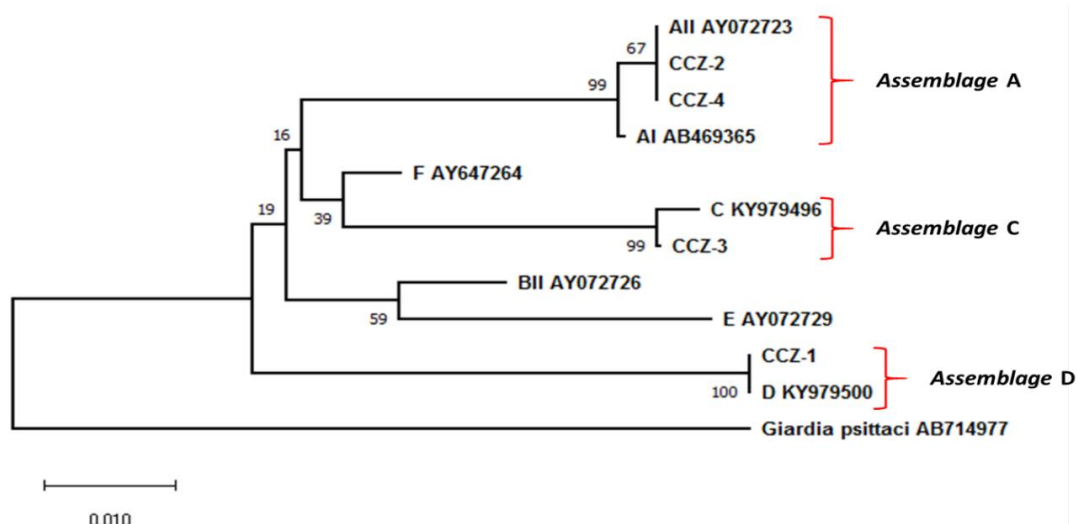


Figura 8: Classificação filogenética das quatro sequências obtidas de *G. duodenalis* em comparação com as sequências padronizadas para cada agrupamento em que se divide este protozoário. Observa-se que a sequência CCZ-1 corresponde ao agrupamento D, a CCZ-3 corresponde ao agrupamento C e as sequências CCZ-2 e CCZ-4 ao agrupamento A, mais especificamente no sub genótipo AII.

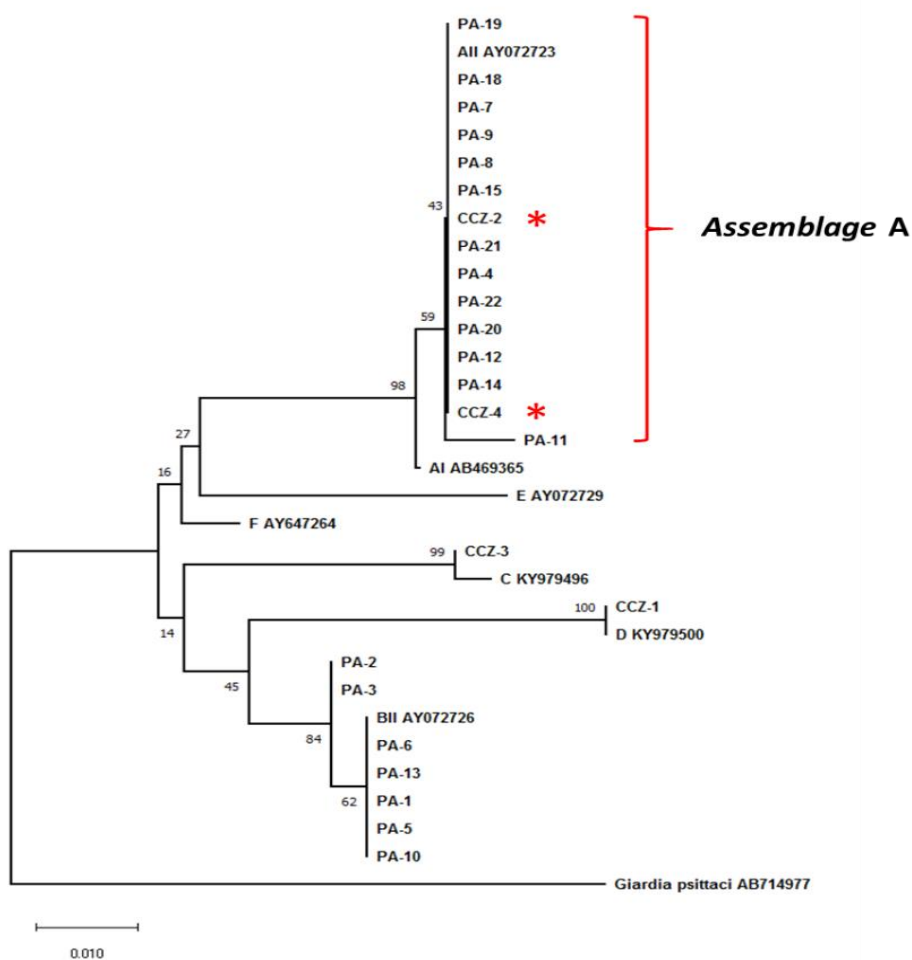


Figura 9: Comparação das sequências CCZ-2 e CCZ-4 com as sequências de agrupamento AII, coletadas pelo Laboratório de Parasitologia do ICB-UFPA, em humanos da região metropolitana de Belém, comprovando que há similaridade entre as sequências.

5. DISCUSSÃO

Os resultados negativos para *Cryptosporidium* spp. e *Blastocystis* spp. podem ser consequência da escolha da PCR como técnica de diagnóstico nesta pesquisa. Eymael et al. (2010) observou que, vários estudos indicam que os métodos de sedimentação espontânea ou de flutuação, que foram utilizados nesse trabalho como preparo para a extração de DNA, são ineficazes na busca de *Blastocystis* spp. nas fezes, pois o contato deste protozoário com água acarretaria a lise celular do mesmo, produzindo assim, resultados falso-negativos.

Uma alternativa para melhorar o desempenho destas técnicas poderia ser a conservação prévia das mesmas com formol ou outro tipo de conservante. Com isso, podemos ter como uma das suposições, para a falta de resultados positivos neste trabalho, que durante as técnicas parasitológicas foi causado a lise celular de *Blastocystis* spp. Ainda segundo Eymael et al. (2010) há vários outros autores que propõem técnicas diferenciadas para detecção de *Blastocystis* spp., entre elas, as mais citadas são técnicas de coloração para análise em microscopia, como a coloração por tricrômio, hematoxilina férrica, Giemsa, Gram ou Wright.

Quanto ao *Cryptosporidium* spp., há uma grande variedade de métodos utilizados no diagnóstico da criptosporidiose, sendo a maioria relacionada à detecção direta de oocistos por meio de microscopia. As técnicas mais conhecidas para este fim são: coloração por Kinyoun, Ziehl-Neelsen modificado, safranina azul de metileno, verde malaquita, visualização microscópica em contraste de fase em solução de Sheather e reação de imunofluorescência direta (TEIXEIRA, 2010). Além disso, Madrid (2015) relata que somente o DNA de *C. parvum*, *C. hominis* e *C. meleagridis* e as espécies ou genótipos próximos a eles são amplificadas e que a utilidade é limitada na genotipagem de *Cryptosporidium* spp. de animais por causa da pequena especificidade, podendo ser apenas utilizadas para identificar infecções mistas de *C. hominis* ou *C. parvum* em humanos.

Além disso, também pode ter sido a escolha da técnica empregada, Monis e Saint (2001) fizeram um experimento com genotipagem de *Cryptosporidium* spp. no qual foi realizado um nested PCR, afim de aumentar a especificidade dos resultados obtidos. Portanto, é possível que o problema para a total negatividade dos resultados ainda esteja vinculado com a falta de primers específicos para a maioria dos genótipos de *Cryptosporidium* spp., tendo assim a não identificação deste protozoário nas fezes caninas do CCZ.

Dessa forma é provável que as técnicas moleculares para ambos os protozoários já mencionados acima precisassem ter sido outras, com, talvez, o uso de outros oligonucleotídeos, afim de comprovar qual estaria sendo mais sensível e específico nas ampliações dos protozoários estudados, e fazer adição de outras técnicas de análise, além da molecular, como análises microscópicas para se ter um resultado definitivo e evitar as suspeitas de falso-negativos.

Quanto aos resultados de *G. duodenalis*, o encontro de agrupamentos dos tipos C e D, era esperado, pois são agrupamentos de ocorrência específica no gênero *Canis*. Agora, em relação à presença do agrupamento do tipo A, é um dado interessante, já que esse grupo genético é caracterizado como zoonótico e encontrado em vários mamíferos, incluindo os humanos, além de já ter sido encontrado resultados semelhantes em outras cidades do Brasil. Volotão (2007) e Fantinatti (2018) fizeram coletas em cidades do estado do Rio de Janeiro que mostravam a circulação do agrupamento A em cães, sendo os subgenótipos desta, do tipo AI e AII, encontrados em amostras humanas.

Já nas coletas realizadas em regiões diversificadas do Estado de São Paulo, observou-se que em sua maioria, os cães estavam infectados com o agrupamento A, mas também foi detectado o agrupamento B em algumas coletas (VOLOTÃO, 2011; DURIGAN, 2014; DAVID, 2015). Ao comprovarem a presença de *G. duodenalis* em cães, tais pesquisas também trouxeram comparações com amostras coletadas de humanos que evidenciavam possível transmissão de cão para humano (VOLOTÃO, 2007, 2011).

Além de amostras humanas e caninas, em algumas regiões, também foi feito junto a estas, coletas ambientais em fontes de águas (rios, córregos urbanos, esgotos hospitalares, estação de tratamento de águas residuais e em local de captação de água do rio Atibaia para cidades), onde revelou-se ter um alto grau de diversidade genética para *G. duodenalis*, o que sugere a possibilidade de múltiplas fontes de infecções; o que pode ocasionar em um ciclo contínuo de transmissão na população humana e canina destas regiões estudadas (DURIGAN, 2014). Com esse trabalho assemelhando-se à outras pesquisas de regiões diferentes do Brasil, na questão de técnicas de coleta, análise de dados e resultados; o cenário em que se encontra a região metropolitana de Belém torna-se preocupante.

O agravante se dá, devido à 59% da população brasileira possuir um cão ou um gato como animal doméstico. Além disso, em grande parte, esses animais são

adquiridos vindo das ruas, já que a adoção de animais domésticos é frequente no Brasil; porém, ao mesmo tempo que há adoções, também há um número alto de abandonos, ocasionado pela falta de compreensão das necessidades e do comportamento natural destes animais pelos seus tutores. Tal situação, gera como consequência uma superpopulação de cães nas ruas (LIMA&LUNA, 2012). Somado a isso, temos o saneamento básico desestruturado da região metropolitana de Belém, onde segundo o Ranking do Saneamento do Instituto Trata Brasil (2023), Belém ocupa a 95ª posição, ficando entre as 20 piores cidades no quesito saneamento básico, o que só colabora para os casos de reinfecção dos caninos abandonados nas ruas e pela população que transita pela cidade.

É necessário que se continue esta pesquisa a fim de poder monitorar a prevalência de *G. duodenalis* na população canina por mais um tempo, além de também acrescentar a isto, o monitoramento da população belenense e do ambiente, para maiores deduções sobre o assunto e afim de chamar a atenção para o problema da negligência deste protozoário.

6. CONCLUSÃO

A partir disso, podemos concluir que, os cães da região metropolitana de Belém são possíveis transmissores de *G. duodenalis* para humanos, já que o sub genótipo All foi encontrado em amostras de fezes destes e é também a variação encontrada infectando humanos na região, além do fato de haver encontro de mais de um tipo de agrupamento de *G. duodenalis*, sugerindo que os cães acolhidos chegaram infectados ao CCZ. Quanto aos resultados negativos de *Blastocystis* spp. e *Cryptosporidium* spp., tem-se a probabilidade de serem falso-negativos, portanto seria interessante refazer as análises para estes, e tentar um possível monitoramento dos três protozoários, estudados neste trabalho, na região de Belém, pois como podemos perceber, apesar do progresso nos últimos anos na taxonomia e epidemiologia molecular desses parasitos, ainda há muito a ser pesquisado e poucos grupos de pesquisa no Brasil tratando com relevância essas doenças, principalmente, por que estudos sobre a transmissão em humanos e animais são muito dificultados por falta de ferramentas adequadas para subtipagem de espécies. Com isso, este trabalho vem a ser um estudo pioneiro na região de Belém e vim não só a contribuir com a comunidade, mas também incentivar mais pesquisadores a estudarem esse assunto.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, R. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin Microb Rev.** v. 14, n. 3, p. 447–475, 2001.

AMATO, Vicente Neto et al. Blastocistose: controvérsias e indefinições. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [online]**. 2003, v. 36, n. 4.

ANKARKLEV, Johan et al. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 6, p. 413-422, 2010.

BALASSIANO, Bianca Chiganer Cramer et al. Fatores associados à infecção natural de cães por parasitos gastrintestinais. 2007.

BALLWEBER, L. R. et al. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. **Trends Parasitol.**, v.26, p.180-189, 2010.

BARROSO, J. E. M., & LIMA, E. E. D. (2013, May). O Centro de Controle de Zoonoses e sua Importância para a Saúde Pública do Município de Catalão, GO. In **Anais da Conferência Internacional de Estratégia em Gestão, Educação e Sistemas de Informação (CIEGESI)** (Vol. 1, No. 1, pp. 846-859).

BRESCIANI, S. et al. Criptosporidiose em animais domésticos: aspectos epidemiológicos. **Semina: Ciênc. Agrár.** v. 34, n. 5, pp. 2387-2402, 2013.

CACCIÒ, S. M., DE GIACOMO, M., & POZIO, E. (2002). Sequence analysis of the β -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**, 32(8), 1023–1030. doi:10.1016/s0020-7519(02)00068-1

CLARK, C. Graham et al. Desenvolvimentos recentes na pesquisa Blastocystis. **Avanços em parasitologia**, v. 82, p. 1-32, 2013.

CONDLOVÁ, S. et al. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. **Eur. J. Protistol.** v. 63, p. 1-12, 2018.

DAVID ÉB, GUIMARÃES S, DE OLIVEIRA AP, DE OLIVEIRA-SEQUEIRA TCG, BITTENCOURT GN, NARDI ARM, ET AL. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. **Parasit Vectors.** 2015; 8: 103.

DIXON, Brent R. *Giardia duodenalis* in humans and animals–transmission and disease. **Research in veterinary science**, v. 135, p. 283-289, 2021.

DURIGAN M, ABREU AG, ZUCCHI MI, FRANCO RM, DE SOUZA AP. Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: multilocus genotyping reveals zoonotic potential

between clinical and environmental sources in a metropolitan region of Brazil. **Plos One**. 2014; 9(12): e115489.

EDERLI, B. B. et al. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium sp.* em cães domiciliados na cidade de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.17, p. 260-266, 2008.

EYMAEL, D.; SCHUH, G.M. e TAVARES, R.G. Padronização do diagnóstico de *Blastocystis hominis* por diferentes técnicas de coloração. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [online]**. 2010, v. 43, n. 3.

FANTINATTI M, CASECA AC, BELLO AR, FERNANDES O, DA-CRUZ AM. The presence of *Giardia lamblia* assemblage A in dogs suggests an anthroozoonotic cycle of the parasite in Rio de Janeiro, Brazil. **Infect Genet Evol.** 2018; 65: 265-9.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Vet. Parasitol.** v.126, p.37–56, 2004.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 24, p.110–140, 2011.

FERREIRA, M. U. Parasitologia contemporânea. In: FERREIRA, M. U.; FORONDA, A. S. Protozoários Intestinais. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2012, p. 48-56.

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

FUNADA, M. R. et al. Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital escola veterinário da cidade de São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 59, n. 5, p.1338-1340, 2007.

GOMES, L.G.O. et al. Zoonoses: as doenças transmitidas por animais. **Revista Brasileira Multidisciplinar-ReBraM**, v. 25, n. 2, p. 158-174, 2022.

INSTITUTO TRATA BRASIL. Ranking do Saneamento do Instituto Trata Brasil de 2023 (snis 2021). 2023.

JIMÉNEZ, Paula Andrea; JAIMES, Jesús Eduardo; RAMÍREZ, Juan David. A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2019.

LIMA A. F. M.; LUNA S. P. L. Algumas causas e consequências da superpopulação canina e felina: acaso ou descaso? / **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP.** v. 10, n. 1, p. 32–38, 2012.

MADRID, Darling Mélaney; BASTOS, Thiago; JAYME, Valéria. Emergência da criptosporidiose e impactos na saúde humana e animal. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, 2015.

MELIN-COLOMA, M. et al. Estudio de la presencia de huevos de *Toxocara* sp. en suelos de áreas públicas de la ciudad de Chillán, Chile. **Rev Chil Infectol.** v. 33(4), p. 428-32, 2016.

MONIS, P. T.; SAINT, C. P. Desenvolvimento de um ensaio nested-PCR para a detecção de *Cryptosporidium parvum* em água acabada. **Pesquisa sobre água**, v. 35, n. 7, pág. 1641-1648, 2001.

NEVES, D. P. et al. Parasitologia humana. In: VIANA, S. G. F.; SOGAYAR, M. I. T. L. Giardíase. 13ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2016, p. 129-136.

NOORALDEEN, K. Contamination of public squares and parks with parasites in Erbil city, Iraq. **Ann Agric Environ Med.** v. 22(3), p. 418-20, 2015.

PEÑA, I.G. et al. Zoonosis parasitarias causadas por perros y gatos, aspecto a considerar en salud pública de Cuba. **Rev Electron Vet.** v.18(10), p. 1-11, 2017.

PENG, M. M. et al. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. **Emerg. Infect. Dis.** v.3, p.567–573, 1997.

QUADROS, R. M. et al. Ocorrência de *Giardia duodenalis* em cães domiciliados e apreendidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Lages, Santa Catarina, Brasil. **Rev. Port. Ciênc. Vet.** v.110, p. 127-132, 2015.

SCICLUNA, S. M., TAWARI, B., & CLARK, C. G. (2006). DNA Barcoding of *Blastocystis*. **Protist**, 157(1), 77–85. doi:10.1016/j.protis.2005.12.001

SCORZA, V; TANGTRONGSUP, S. Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp infections in dogs and cats. **Top. Companion Anim. M.** v. 25, p.163-169, 2010.

SILVA, S. O. S., RICHTZENHAIN, L. J., BARROS, I. N., GOMES, A. M. M. C., SILVA, A. V., KOZERSKI, N. D., ... SOARES, R. M. (2013). A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. **Experimental Parasitology**, 135(3), 551–557. doi:10.1016/j.exppara.2013.09.003

SOTERO-MARTINS, A. et al. Controle da qualidade microbiológica e parasitária em áreas de recreação. **Rev Eletronica Gest Saude.** v. 5(3), p. 2059-78, 2014.

STENSVOLD, C. Rune et al. Detecção de *Blastocystis* usando métodos parasitológicos e baseados em DNA: um estudo comparativo. **Microbiologia diagnóstica e doenças infecciosas**, v. 59, n. 3, pág. 303-307, 2007.

STENZEL DJ, BOREHAM PF. *Blastocystis hominis* revisited. **Clin Microbiol Rev.** 1996;9(4):563-584. doi:10.1128/CMR.9.4.563

TAMURA, Koichiro; STECHER, Glen; KUMAR, Sudhir. MEGA11: análise genética evolutiva molecular versão 11. **Biologia molecular e evolução**, v. 38, n. 7, pág. 3022-3027, 2021.

TEIXEIRA, Weslen Fabricio Pires. Padronização da reação de imunofluorescência direta para detecção de oocistos de *cryptosporidium parvum* em amostras fecais de bezerros. 2010. 55 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/94698>>.

THOMPSON, R.C.A.; PALMER, C. S; O`HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **Vet. J.**, v.177, p.18-25, 2008.

TZIPORI, S.; GRIFFITHS, J.K. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. **Adv. Parasitol.** v. 40, n. 5, p. 4-36, 1998.

VITAL, T. E.; BARBOSA, M. R. A.; ALVES, D. S. M. M. A. Ocorrência de parasitos com potencial zoonótico em fezes de cães e gatos do Distrito Federal. **Ensaio e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 16, p. 9-23, 2012.

VOLOTÃO AC, COSTA-MACEDO LM, HADDAD FS, BRANDÃO A, PERALTA JM, FERNANDES O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using *beta-giardin* gene: a phylogenetic analysis. **Acta Trop.** 2007; 102(1): 10-9.

VOLOTÃO AC, RAMOS NM, FANTINATTI M, MORAES MV, NETTO HA, STORTI-MELO LM, et al. Giardiasis as zoonosis: between proof of principle and paradigm in the Northwestern region of São Paulo State, Brazil. **Braz J Infect Dis.** 2011; 15(4): 382-3.

WALDRON, L.S.; POWER, M. L. Fluorescence analysis detects gp60 subtype diversity in *Cryptosporidium* infections. **Infect. Genet. Evol.** v. 11, p. 1388-1395, 2011.

WAWRZYNIAK, Ivan et al. Blastocystis, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. **Therapeutic advances in infectious disease**, v. 1, n. 5, p. 167-178, 2013.

WESTGARTH, C. et al. Factors associated with dog ownership and contact with dogs in a UK community. **BMC Veterinary Research**, v. 3 (5), p.1-9, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Zoonoses: managing public health risks at the human-animal environment interface. Geneva: World Health Organization; 2018 [acesso 25 abr 2019]. Disponível em:<https://www.who.int/zoonoses/en/>



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PROTOZOÁRIOS COM POTENCIAL ZONÓTICO PRESENTES EM FEZES DE CÃES DA CIDADE DE BELÉM.", protocolada sob o CEUA nº 3359210920 (ID 001535), sob a responsabilidade de **Sérgio Rodriguez Málaga** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 29/10/2020.

We certify that the proposal "GENETIC CHARACTERIZATION OF PROTOZOANS WITH ZOO NOTIC RISK FOUND IN DOGS FEACES IN BELÉM-PA.", utilizing 200 Dogs (males and females), protocol number CEUA 3359210920 (ID 001535), under the responsibility of **Sérgio Rodriguez Málaga** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 10/29/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **11/2020** a **12/2021**

Área: **Instituto de Ciências Biológicas**

Origem: **Não se aplica**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e**
Fêmeas

idade: **2 a 10 anos**

N: **200**

Linhagem: **Não se aplica**

Peso: **10 a 20 kg**

Local do experimento: As coletas de fezes serão realizadas nas instalações individuais dos animais no Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Belém com a utilização de espátula de madeira descartável e frasco plástico com a identificação do animal. Posteriormente, as amostras serão direcionadas ao Instituto de Ciências Biológicas da UFPA para o procedimento de purificação de protozoários e DNA genômico.

Belém, 15 de maio de 2023

Profa. Dra. Barbarella de Matos Macchi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará



Belém, 26 de agosto de 2021

CEUA N **3359210920**

(ID 000924)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Sérgio Rodriguez Málaga

Área: Instituto De Ciências Biológicas

Título da proposta: "CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PROTOZOÁRIOS COM POTENCIAL ZONÓTICO PRESENTES EM FEZES DE CÃES DA CIDADE DE BELÉM."

CERTIFICADO (Emenda versão de 25/agosto/2021)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 25/agosto/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Encaminhado para análise a solicitação de prorrogação do prazo de entrega do relatório final. "

Nova previsão de término da proposta: **06/2022**

Comentário da CEUA: O término do projeto "CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PROTOZOÁRIOS COM POTENCIAL ZONÓTICO PRESENTES EM FEZES DE CÃES DA CIDADE DE BELÉM.", coordenado pelo Prof. Dr. Sérgio Rodriguez Málaga, fica adiado para 30 de junho de 2022, devido às interferências que a Pandemia de COVID-19 trouxe à rotina de trabalho de docentes/pesquisadores do Instituto de Ciências Biológicas - ICB da Universidade Federal do Pará - UFPA.

Prof. Dra. Barbarella de Matos Macchi

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal do Pará

Prof. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal do Pará