

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

IDENTIFICAÇÃO DE ASSINATURAS GENÉTICAS EM REGIÃO
CODIFICADORA DA MENOR UNIDADE RIBOSSÔMICA DE
CRYPTOSPORIDIUM SPP: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE AMOSTRAS DE MAMÍFEROS E AVES

ANAÍÁ DA PAIXÃO SEVÁ

SÃO PAULO
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANAÍÁ DA PAIXÃO SEVÁ

Identificação de assinaturas genéticas em região codificadora da menor unidade ribossômica de *Cryptosporidium* spp: caracterização molecular de amostras de mamíferos e aves

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

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.2096
FMVZ

Sevá, Anaiá da Paixão

Identificação de assinaturas genéticas em região codificadora da menor unidade ribossômica de *Cryptosporidium* spp: caracterização molecular de amostras de mamíferos e aves / Anaiá da Paixão Sevá. – São Paulo : A. P. Sevá, 2009.

96 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2009.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. *Cryptosporidium*. 2. Caracterização molecular. 3. Assinaturas genéticas. 4. Aves silvestres. 5. Animais domésticos. I. Título.

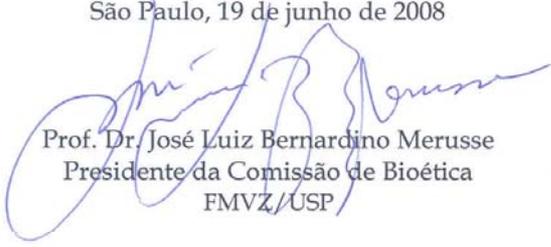


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização molecular de *Cryptosporidium spp.* oriundos de animais domésticos, aves silvestres e humanos", protocolado sob o nº1391/2008, utilizando amostras de fezes (bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, caninos e felinos), 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 na reunião do dia 18 de junho de 2008.

We certify that the Research "Molecular characterization of *Cryptosporidium spp.* of domestic animals, wild birds and human beings", protocol number 1391/2008, 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 06/18/08.

São Paulo, 19 de junho de 2008


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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SEVÁ, Anaiá da Paixão

Título: Identificação de assinaturas genéticas em região codificadora da menor unidade ribossômica de *Cryptosporidium* spp: caracterização molecular de amostras de mamíferos e aves

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

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Assinatura _____

Instituição _____
Julgamento _____

Prof. Dr. _____
Assinatura _____

Instituição _____
Julgamento _____

Prof. Dr. _____
Assinatura _____

Instituição _____
Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo que me deu todo apoio a estrutura e a oportunidade de realizar este e outros trabalhos.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pela orientação, paciência, amizade e confiança.

Ao Prof. Paulo Brandão pela amizade, apoio e auxílio nas horas de apuros e questionamentos.

À Dra. e amiga Alessandra Nava que apoiou minha entrada no departamento, ajudou na formação e continuidade do trabalho inicial e acompanhou todo o processo do trabalho do mestrado.

À Profa. Dra. Solange pela confiança e pelo auxílio nas horas necessárias.

À Dra. Marta Brito e o Ambulatório de Aves pelo apoio no trabalho e gentil fornecimento de grande parte das amostras.

Ao Instituto de Pesquisas Ecológicas – IPE, bem como as pessoas que nele trabalham e pela estrutura fornecida no momento de coletas de amostras.

Aos funcionários do VPS, FMVZ-USP, em especial a Sheila, o Renato e o Pedrinho, pela ajuda e companhia.

À funcionária Tânia Delonero, da Secretaria de Pós Graduação do VPS, pela atenção e ajuda.

Ao meu noivo Ricardo. Companheiro especial que eu amo. Apoiou, respeitou e incentivou durante todo o período de desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais que sempre me acompanharam, apoiaram e incentivaram minhas decisões, inclusive profissionais.

Aos meus queridos irmãos queridos que estão sempre por perto.

À minha madrinha Juju que desde pequena me acompanha e apóia em tudo. Devido à ela e as milhões de idas na fazenda aprendi que veterinária é uma linda profissão.

Aos meus amigos de faculdade em especial as amigas eternas, Fi, Strup, Mi e Patê, que moraram comigo durante todo o curso de graduação, e Fernanda.

À minha prima e amiga Carol bióloga e nossa coleta de pedras brancas na infância incentivadoras dessa pesquisa.

Aos pós-graduandos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da USP que me acompanharam ou me ajudaram quando foi preciso, em especial Mikaela, Sibebe, Guacyara, Jonas, Guilherme, Vanessa Salgado, Rafael, Maria, Enio, Alex, Thaísa, Richard, Mi, Ju e Estelinha (Rodriguetes).

Ao CNPq pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos que participaram positivamente acreditando neste trabalho direta ou indiretamente.

DEDICATÓRIA

A ciência consiste em fornecer uma representação do mundo, dos seres e das coisas, que nos liberte, tanto quanto possível, das ilusões que a natureza dos nossos sentidos e do nosso cérebro nos impõe.

F. Jacob, biólogo francês

RESUMO

SEVÁ, A. P. **Identificação de assinaturas genéticas em região codificadora da menor unidade ribossômica de *Cryptosporidium* spp: caracterização molecular de amostras de mamíferos e aves.** [Genetic signatures identification in coding region of *Cryptosporidium* spp. less ribosomal unit: molecular characterization of mammals and birds samples]. 2009. 96f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Este trabalho teve como objetivos a identificação de sequências 18S rDNA amplificadas de *Cryptosporidium* spp. de diversas espécies de hospedeiros e avaliar variabilidade em sequências gênicas deste locus, com vistas ao desenho de sondas moleculares com melhor eficiência diagnóstica para detecção e identificação deste parasito. Foram coletadas 392 amostras de animais domésticos (bovinos, eqüinos, suínos, ovinos, cães e felinos) de 98 propriedades rurais do município de Teodoro Sampaio, Estado de São Paulo, 474 de aves silvestres de cativeiro de diversas famílias, provenientes de criadouros comerciais do Estado de São Paulo e criadas como estimação, 141 de sagüis de cativeiro do Estado de São Paulo, e 24 de humanos imunodeprimidos provenientes de hospital do município de São Paulo. As amostras foram submetidas a prova coproparasitológica e molecular para detecção e identificação de *Cryptosporidium*. Alinhamentos múltiplos obtidos de sequências 18S rDNA de *Cryptosporidium* spp. determinadas neste estudo e de sequências recuperadas do Genbank foram analisados visualmente para a definição das regiões polimórficas. Após a definição das regiões polimórficas, foram realizadas análises filogenéticas empregando-se separadamente cada uma delas. Pelo exame coproparasitológico foi encontrado positividade em amostras de nove (4,57%) bovinos, três (11,11%) cães, 41 (8,64%) aves silvestres, 13 (9,20%) sagüis e todas as de humanos. As outras espécies de animais domésticos não apresentaram positividade para o parasita no exame coproparasitológico. Nos bovinos foi encontrado o *Cryptosporidium andersoni*, em cães o *Cryptosporidium canis*, em sagüis o *Cryptosporidium parvum* e em humanos, *C. parvum*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium felis* e *C. canis*. Dentre as amostras de aves nenhuma foi identificada como *Cryptosporidium meleagridis*. As amostras de curiós (*Oryzoborus angolensis*) foram classificadas como *Cryptosporidium galli*, com exceção de uma, identificada como *Cryptosporidium baileyi*. *C. galli* foi encontrado também em um Sabiá Laranjeira (*Turdus rufiventris*), um Picharro (*Saltator similis*), dois canários e um Pintassilgo (*C. carduelis*). *C. baileyi* foi encontrado em um pintassilgo (*Carduelis carduelis*) um Pichochó (*Sporophila frontalis*), um Galo da

Campina (*Paroaria dominicana*) e dois Canários (*Sicalis flaveola*). Pelos resultados, duas regiões polimórficas em sequência 18S rDNA de *Cryptosporidium* spp. (denominadas regiões 1 e 3) permitiram discriminar as diferentes espécies neste gênero de parasita, podendo ser utilizadas isoladamente como marcadores moleculares para identificação molecular dentro deste gênero. Saguis (*Chalitrix* spp.) de cativeiro são espécies susceptíveis a infecção por *Cryptosporidium parvum* apresentando-se como um hospedeiro de importância epidemiológica para esta zoonose. Curiós (*O. angolensis*) de cativeiro são espécies susceptíveis a infecção por *Cryptosporidium galli* apresentando-se como hospedeiro de importância epidemiológica para esta espécie de parasito. A não detecção de *Cryptosporidium parvum* em animais domésticos na região de Teodoro Sampaio, Estado de São Paulo, mostra uma condição sanitária favorável, já que este agente é causador de importante zoonose. A presença de espécies de *Cryptosporidium* spp. adaptadas a animais domésticos (como o *C. felis* e o *C. canis*) em humanos na cidade de São Paulo mostra que estes animais podem desempenhar importante papel na cadeia epidemiológica da criptosporidiose humana.

Palavras-Chave: *Cryptosporidium*. Caracterização molecular. Assinaturas genéticas. Aves silvestres. Humanos. Animais domésticos.

ABSTRACT

SEVÁ, A. P. **Identification of genetic signatures in coding region of the small subunit ribosomal RNA of *Cryptosporidium* spp.: molecular characterization of samples from mammals and birds.** [Identificação de assinaturas genéticas em região codificadora da menor unidade ribossômica de *Cryptosporidium* spp: caracterização molecular de amostras de mamíferos e aves.]. 2009. 96f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The objectives of this study were to identify 18S rDNA sequences of *Cryptosporidium* spp. From various species of hosts and to evaluate the variability in gene sequences of this locus, aiming the design of molecular probes with better diagnostic efficiency for the detection and identification of this parasite. It was collected 392 samples of domestic animals (cattle, horses, pigs, sheeps, dogs and cats) of 98 rural properties of Teodoro Sampaio city, São Paulo State, 474 captive wild birds of various families, from pet and comercial breeding in São Paulo State, 141 captive marmosets, of São Paulo State, and 24 immunossupressed humans from a São Paulo city hospital. The samples were submitted to coproparasitological and molecular tests for the detection and identification of *Cryptosporidium*. Multiple alignment of *Cryptosporidium* 18S rDNA sequences, that was determinated in this study and other download from GenBank were visually inspected in order to define polymorphic regions. After the definition of polymorphic regions, phylogenetic trees were reconstructed using each polymorphic region. *Cryptosporidium* spp. Were found by using coproparasitological tests in nine (4,57%) samples of cattle, tree (11,11%) dogs, 41 (8,64%) wild birds, 13 (9,20%) marmosets and all human samples. The other animal species were negative by coproparasitological tests. In cattle it was found *Cryptosporidium andersoni*, in dogs *Cryptosporidium canis*, in marmosets *Cryptosporidium parvum* and in humans, *C. parvum*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium felis* e *C. canis*. Among the samples of birds *Cryptosporidium meleagridis* was not found. All the samples of lesser seed-finch (*Oryzoborus angolensis*) were classified as *Cryptosporidium galli*, except for that from one individual with was identified as *Cryptosporidium baileyi*. *Cryptosporidium galli* was also found in one rufous-bellied thrush (*Turdus rufiventris*), one green-winged saltator (*Saltator similis*), two saffron finch (*Sicalis flaveola*) and one eurasian goldfinch (*Carduelis carduelis*). *C. baileyi* was found in one eurasian goldfinch (*C. carduelis*), one buffy-fronted seedeater (*Sporophila Frontalis*), one red-cowled cardinal (*Paroaria dominicana*) and two saffron finch (*S. flaveola*).

From the results two polymorphic regions within 18S rDNA sequences of *Cryptosporidium* spp. (named as regions 1 and 3) enabled the discrimination of the different species in this genera, and then could be used alone as molecular markers for identification within this genera. Captive marmosets (*Chalitrix* spp.) are susceptible species for *Cryptosporidium* infection, presenting itself as an important source of infection for this zoonosis. Captive lesser seed-finch (*Oryzoborus angolensis*) are susceptible species for *Cryptosporidium galli* infection presenting itself as an epidemiologic important host for this parasite. The absence of *Cryptosporidium parvum* in domestic animals of Teodoro Sampaio, São Paulo State, is indicative of a favorable health condition, as *C. parvum* is an agent causative of an important zoonosis. The presence of *Cryptosporidium* spp. species adapted to domestic animals (as *C. felis* and *C. canis*) in humans at São Paulo State indicate that these animals could play an important role in the epidemiology of human cryptosporidiosis.

Key words: *Cryptosporidium*. Molecular characterization. Genetic signatures. Wild birds. Humans. Domestic animals.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Plotagem de similaridade entre seqüências codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp. Superior: plotagem das 56 seqüências da Tabela 3, entre completas e incompletas. Inferior: plotagem das 34 seqüências completas da Tabela 3. Caixas 1, 2, 3, 4, 5: regiões polimórficas..... 45
- Figura 2- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 38 taxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *p-distance* utilizando 257 nucleotídeos da região polimórfica 1 do gene codificador de 18S rRNA. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4..... 46
- Figura 3- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 50 taxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *p-distance* utilizando 90 nucleotídeos da região polimórfica 2 do gene codificador de 18SrRNA. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4..... 47
- Figura 4- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 47 taxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *p-distance* utilizando 254 nucleotídeos da região polimórfica 3 do gene codificador de 18SrRNA. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4..... 49
- Figura 5- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 31 taxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *p-distance* utilizando 260 nucleotídeos da região polimórfica 3 do gene codificador de 18SrRNA. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4..... 50

- Figura 6- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 38 taxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *p-distance* utilizando 215 nucleotídeos da região polimórfica 4 do gene codificador de 18SrRNA. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4..... 51
- Figura 7- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 38 taxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *p-distance* utilizando 124 nucleotídeos da região polimórfica 5 do gene codificador de 18SrRNA. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4..... 52
- Figura 8- Posição dos *primers* empregados neste estudo e dos fragmentos de 18S rRNA amplificados a partir das amostras de aves no alinhamento geral entre seqüências homólogas de *Cryptosporidium* spp. As barras horizontais acima da régua indicam as regiões polimórficas. As posições dos *primers* F1, F2, R1 e R2 na régua acima são respectivamente, 158 – 177; 196 – 223; 1501 – 1521 e 1048 – 1069..... 56
- Figura 9- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 26 taxons de origem aviária (gene codificador de 18Sr RNA), inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood* utilizando 194 nucleotídeos (entre as posições 259 e 460 do alinhamento disposto no Anexo). Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4..... 57
- Figura 10- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 34 taxons de origem aviária (gene codificador de 18SrRNA), inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood* utilizando 229 nucleotídeos (entre as posições 458 e 702 do alinhamento disposto no Anexo). Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4..... 58

- Figura 11- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 39 taxons de origem aviária (gene codificador de 18SrRNA), inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood* utilizando 119 nucleotídeos (entre as posições 709 e 852 do alinhamento disposto no Anexo). Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4..... 59
- Figura 12- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 29 taxons de origem aviária (gene codificador de 18SrRNA), inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood* utilizando 349 nucleotídeos (entre as posições 458 e 852 do alinhamento disposto no Anexo). Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4..... 60
- Figura 13- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 20 taxons de origem aviária (gene codificador de 18SrRNA), inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood* utilizando 677 nucleotídeos (entre as posições 259 e 987 do alinhamento disposto no Anexo). Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4..... 61
- Figura 14- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 12 taxons de mamíferos (gene codificador de 18SrRNA), inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood* utilizando 695 nucleotídeos (entre as posições 259 e 987 do alinhamento disposto na Figura X). Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4..... 63
- Anexo A- Alinhamento múltiplo entre seqüências codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp. A: assinatura genética contendo substituições discriminatórias entre as espécies *C. hominis* e *C. parvum*, localizada na região polimórfica 1. Não há dados homólogos a esta região disponíveis em bancos de dados para seqüências de *Cryptosporidium* genótipos aviários. B: assinatura genética contendo substituições discriminatórias entre as espécies *C. hominis* e *C. parvum*, localizada na região polimórfica 3 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	<i>Cryptosporidium</i> spp. em seus respectivos hospedeiros.....	22
Tabela 2-	Espécies de <i>Cryptosporidium</i> spp. descritas com base em estudos fenotípicos e genotípicos e seus principais sítios de infecção.....	26
Tabela 3-	Seqüências codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico de <i>Cryptosporidium</i> spp empregadas para as análises de regiões polimórficas, respectivos números de acesso GenBank, identificação e data de depósito.....	43
Tabela 4-	Posições das regiões polimórficas utilizados neste estudo em relação ao alinhamento múltiplo das seqüências de <i>Cryptosporidium</i> spp indicado no Anexo.....	45
Tabela 5-	Seqüências codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico de <i>Cryptosporidium</i> spp obtidas de amostras de aves e respectivos hospedeiros em que foram encontradas.....	55
Tabela 6-	Seqüências codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico de <i>Cryptosporidium</i> spp obtidas de amostras de mamíferos e respectivos hospedeiros em que foram encontradas.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
RNAr	Acido ribonucléico ribossômico
18S RNAr	Gene da Subunidade 18S do gene do RNA ribossômico
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
TE	Tampão Tris-EDTA
M	Molar
mM	Milimolar
pM	Picomol
ml	Mililitros
μl	Microlítros
g	Gravidade
mg	Miligramas
ng	Nanogramas
KCl	Cloreto de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
pb	Pares de bases
min	Minutos
seg	Segundos
rpm	Rotações por minuto

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
-	Menos
+	Mais
° C	Graus Celsius
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	HOSPEDEIRO.....	20
1.2	TAXONOMIA.....	22
1.3	CICLO BIOLÓGICO.....	23
1.4	PATOGENIA E SINAIS CLINICOS.....	24
1.5	EPIDEMIOLOGIA.....	27
1.6	DIAGNÓSTICO.....	30
2	OBJETIVOS.....	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1	AMOSTRAS.....	35
3.2	EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS.....	36
3.3	PURIFICAÇÃO DE OOCISTOS.....	37
3.4	EXTRAÇÃO DE DNA.....	37
3.5	PCR – REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE.....	38
3.6	OBTENÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO.....	39
3.7	PURIFICAÇÃO.....	39
3.8	QUANTIFICAÇÃO DO DNA PURIFICADO.....	40
3.9	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	40
3.10	PRECIPITAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO.....	40
3.11	SEQUENCIAMENTO.....	41
3.12	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS.....	41
3.13	IDENTIFICAÇÕES DE REGIÕES POLIMÓRFICAS E ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	42
4	RESULTADOS.....	44
4.1	IDENTIFICAÇÕES DE REGIÕES POLIMÓRFICAS.....	44
4.2	EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS E PCR.....	52
4.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	54
4.3.1	Identificação molecular de amostras de aves	54

4.3.2	2	Identificação molecular de amostras de mamíferos	61
5		DISCUSSÃO	64
5.1		IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES POLIMÓRFICAS.....	64
5.2		DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> EM AMOSTRAS DE MAMÍFEROS E AVES.....	66
6		CONCLUSÕES	72
		REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

A Criptosporidiose é uma doença causada por coccídios do gênero *Cryptosporidium* que pode acometer humanos e muitas outras espécies de vertebrados entre mamíferos, aves, répteis e peixes (CHERMETTE; BOUFASSA-OUZROUT, 1988; SMITH et al., 2007). A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na população animal é considerada um problema de saúde pública devido ao potencial zoonótico de algumas espécies pertencentes a este gênero.

Cryptosporidium spp. é um dos principais causadores de doença diarréica em humanos no mundo e vem sendo reconhecido como uma causa predominante de doenças veiculadas por água (KARANIS et al., 2007). Os protozoários parasitas do trato gastrointestinal, incluindo o *Cryptosporidium*, provocam manifestações clínicas variadas, como diarreia, perda de peso, mal-nutrição, anemia e algumas vezes morte (MCDONALD, 2003).

O primeiro relato do *Cryptosporidium* foi feito por Ernest Edward Tyzzer em 1907, descrevendo o *Cryptosporidium muris* em glândulas gástricas de ratos de laboratório (TYZZER¹, 1907, apud XIAO et al., 2004, p. 76). Três anos mais tarde, Tyzzer (TYZZER², 1910, apud DUBEY et al., 1990, p. 2) publicou o ciclo de vida e, subsequentemente, propôs o *Cryptosporidium* como um novo gênero e *C. muris* como uma nova espécie.

Em 1912, Tyzzer nomeou o *Cryptosporidium parvum* como segunda espécie do gênero, após encontrá-lo no intestino delgado de camundongos e distingui-lo de *C. muris* através de descrições de detalhes morfológicos e de infecção experimental em camundongos (TYZZER³, 1929, apud DUBEY et al., 1990, p. 2).

Desde a época das primeiras descrições do *C. muris* e *C. parvum* em roedores até o ano de 1997, foram relatadas por volta de 20 espécies de *Cryptosporidium*. Dentre elas,

¹ TYZZER, E. E. A sporozoon found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 5, p. 12-13, 1907.

² TYZZER, E. E. An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (Gen. et. sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. **The Journal of Medical Research**, v. 23, p. 487-509, 1910.

³ TYZZER, E. E. Coccidiosis in *gallinaceous* birds. **American Journal of Hygiene**, v. 10, p. 269, 1929.

somente oito foram tidas como válidas (FAYER et al., 1997). Posteriormente, considerando características genóticas, de patogenicidade e epidemiológicas foram reconhecidas 10 espécies do parasita (FAYER et al., 2000). Até o ano de 2000, foram considerados como hospedeiros 152 espécies de mamíferos (FAYER et al., 2000) e mais de 30 espécies de aves (MORGAN et al., 2000a).

Atualmente, a partir de dados obtidos com experimentos de transmissão cruzada entre espécies e com o uso da biologia molecular, como genotipagem e estudos filogenéticos, aceita-se a existência de vários genótipos e de pelo menos 20 espécies dentro do gênero *Cryptosporidium* (SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008).

1.1 HOSPEDEIROS

Em geral as espécies de *Cryptosporidium* são morfologicamente muito similares e apresentam baixa especificidade de hospedeiros (XIAO et al., 2000b).

No homem, o *Cryptosporidium* foi encontrado pela primeira vez em 1976, em uma criança imunocompetente que apresentava diarreia aguda auto-limitada e em um adulto com diarreia persistente recebendo tratamento imunossupressor (NIME et al., 1976).

Hoje, é sabido que humanos podem ser infectados por diversas espécies tais quais *C. hominis*, *C. parvum*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium andersoni* e *Cryptosporidium muris* (XIAO et al., 2001a; AKIYOSHI et al., 2003). O *Cryptosporidium hominis*, que foi previamente conhecido como *C. parvum* genótipo humano (ou genótipo I) (MORGAN-RYAN et al., 2002), tem os humanos como hospedeiros preferenciais, enquanto *C. parvum* genótipo bovino, ou genótipo II (hoje formalmente conhecido por *C. parvum*) é conhecido por infectar muitos hospedeiros mamíferos (FAYER et al., 2000). O *C. hominis* já foi reportado em cordeiros e bovinos, sendo que leitões podem ser infectados experimentalmente com alta carga parasitária (MORGAN et al., 2000g; EBEID et al., 2003).

Diversos genótipos distintos existem dentro do gênero *Cryptosporidium* e suas relações e especificidades hospedeiras são ainda amplamente desconhecidas (XIAO et al., 2002). A tabela a seguir (Tabela 1) apresenta alguns dos diversos hospedeiros de *Cryptosporidium* e os respectivos genótipos e espécies de parasitos que mais os acometem. Pelas informações contidas na tabela 1, percebe-se que muitos genótipos acometem uma ampla diversidade de hospedeiro

Cryptosporidium em aves foi descrito primeiramente por TYZZER em 1929. O *C. meleagridis* foi reportado por Slavin (SLAVIN⁴, 1955, apud XIAO et al., 2004, p. 79), tendo sido encontrado em perus e causando mortalidade em indivíduos jovens. Em 1986, Current, Upton e Haynes publicaram o isolamento e a descrição do *Cryptosporidium baileyi* em frangos (SRÉTER; VARGA, 2000). Em 2003, RYAN descreveu o *Cryptosporidium galli* infectando diversas espécies de aves (RYAN et al., 2003). Atualmente, outros genótipos de *Cryptosporidium* divergentes das espécies citadas acima, vêm sendo descritos em diversas espécies de aves (NG, 2006).

Em aves silvestres e domésticas, a criptosporidiose está frequentemente associada a infecções por *C. galli*, *C. baileyi* e *C. meleagridis*. Hospedeiros confirmados de *C. galli* incluem aves da família Spermestidae e Fringilidae e galinhas domésticas (*Gallus gallus*). Huber et al. (2007) estudaram *Cryptosporidium* em algumas aves domésticas no Brasil e detectaram patos e codornas com *C. baileyi* e galinhas com *C. meleagridis*. Oocistos morfologicamente similares vêm sendo observados em uma variedade de aves silvestres exóticas e nativas, incluindo membros das famílias Phasianidae e Icteridae e passeriformes (RYAN et al., 2003). Ng et al. (2006) estudaram 430 aves australianas e encontraram, além do *C. galli* e do *C. baileyi*, *Cryptosporidium* de genótipos geneticamente distintos das espécies e dos genótipos já encontrados, utilizando-se PCR para o gene codificador da subunidade 18S do RNAr e da actina (NG et al., 2006). Estes genótipos foram nomeados de I a IV.

⁴ SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 65, p. 261-79, 1955.

Tabela 1 - *Cryptosporidium* spp. em seus respectivos hospedeiros

Hospedeiros	Parasitas principais	Parasitas secundários
Humanos	<i>C. hominis</i> e <i>C. parvum</i>	<i>C. meleagridis</i> , <i>C. felis</i> , <i>C. canis</i> , <i>C. muris</i> , Genótipo de cervo, Genótipo de porco I
Vaca	<i>C. parvum</i> , <i>C. andersoni</i>	Genótipo de bovino B, Genótipo de veado, <i>C. felis</i>
Ovelha	<i>C. parvum</i> , <i>C. andersoni</i>	Genótipo de bovino B, Genótipo de cervo, <i>C. andersoni</i> , <i>C. hominis</i>
Cabra	<i>C. parvum</i> , <i>C. andersoni</i>	<i>C. muris</i>
Camelo	<i>C. parvum</i> , <i>C. andersoni</i>	Genótipo de porco II
Porco	<i>C. suis</i>	<i>C. parvum</i>
Cavalo	Genótipo de cavalo	
Cão	<i>C. canis</i>	
Gato	<i>C. felis</i>	
Rato	<i>C. muris</i> , genótipo de rato	
Esquilo	<i>C. muris</i> , genótipo de esquilo	
Veado	<i>C. parvum</i> , genótipo de veado (<i>C. ryanaea</i>)	Genótipo de cervo
Rato almiscarado	Genótipo de rato almiscado I	Genótipo de rato almiscado II
Gambá	Genótipo de gambá I e II	
Raposa	<i>C. canis</i> genótipo de raposa	Genótipo de raposa II, <i>C. canis</i> genótipo de cão
Galinha	<i>C. baileyi</i>	<i>C. meleagridis</i> , <i>C. galli</i>
Peru	<i>C. baileyi</i> , <i>C. meleagridis</i>	
Ganso e Pato	Genótipo de ganso I e II	<i>C. baileyi</i> , Genótipo de pato
Cobra	<i>C. serpentis</i>	<i>C. saurophilum</i> , Genótipo de cobra (W11)
Lagarto	<i>C. serpentis</i> , <i>C. saurophilum</i>	Genótipo de lagarto
Tartaruga	Genótipo de tartaruga	

Fonte: XIAO et al., 2004

1.2. TAXONOMIA

Cryptosporidium spp. são protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina, Família Cryptosporidiidae, contendo um único gênero, o *Cryptosporidium* (SRÉTER; VARGA, 2000). Filogeneticamente, as espécies e os genótipos de *Cryptosporidium* formam praticamente dois grupos, definidos por seu local de encontro primário, sendo no intestino ou no estômago. Cada grupo contém parasitas de mamíferos, aves e répteis (XIAO; FENG, 2008).

Nos anos atuais, estudos de caracterização molecular de *Cryptosporidium* tem esclarecido algumas confusões na taxonomia do parasita e validado a existência de múltiplas espécies nas diversas classes de vertebrado (LINDSAY et al., 2000; FAYER et al., 2001; MORGAN-RYAN et al., 2002). De fato, estudos moleculares recentes têm revelado extensa diversidade genética no gênero *Cryptosporidium* (XIAO et al., 2002; DA SILVA et al., 2003).

Diferenças moleculares tem sido um elemento essencial para definir novas espécies de *Cryptosporidium* como *C. andersoni*, *C. canis*, *C. hominis* e *C. galli*. Até agora, a diversidade genética encontrada nas espécies de *Cryptosporidium* spp. correlaciona-se bem com outras características biológicas como o espectro de hospedeiros naturais e a infectividade nos estudos de transmissão cruzada. Características genéticas podem auxiliar no delineamento e definição do gênero *Cryptosporidium* (XIAO et al., 2004) entretanto, é necessário distinguir diferenças interespecies, de diversidade alélica intraespecífica e o modo como muitas ênfases podem ser colocadas em resultados de análises moleculares (XIAO et al., 2004).

Algumas vezes um alto grau de similaridade genética pode existir mesmo quando lidamos com gêneros separados. Por isso, quando as diferenças moleculares são pequenas os estudos biológicos (desenvolvimento biológico, especificidade hospedeira em estudos de transmissão cruzada, sítios de predileção, período patente e pré-patente, intensidade da liberação de oocistos, virulência, etc.) de múltiplos isolados são necessários para complementar as informações geradas a partir de dados moleculares (XIAO et al., 2004).

1.3. CICLO BIOLÓGICO

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* completam seu ciclo biológico nas microvilosidades da superfície de células epiteliais dos tratos gastrointestinal, respiratório e urinário (SMITH et al., 2007), dependendo da espécie de parasito considerada. Cada espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* tem uma predileção por sítios diferentes (Tabela 2).

Oocistos esporulados são eliminados pelas fezes de hospedeiros infectados ou diretamente no trato respiratório. Quando os oocistos são ingeridos, de alimentos, água de bebida ou de recreação e materiais contaminados ou quando são inalados por hospedeiros susceptíveis, esporozoítas existem e penetram nas células epiteliais (FAYER; UNGAR, 1986).

Nas células epiteliais os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos, iniciando a reprodução assexuada ou merogonia (CURRENT, 1999), originando os merontes do tipo I,

com oito merozoítos em seu interior. Estes merontes liberam formas invasivas capazes de infectar novas células e originar os merontes do tipo II, com quatro merozoítos em seu interior. Merozoítas emergentes de merontes tipo II infectarão novas células e se desenvolverão até estágios sexuais, os macrogametócitos e microgametócitos (CURRENT et al., 1986; SMITH et al., 2007).

Os macrogametócitos, após serem fecundados pelos microgametócitos, desenvolvem-se em oocistos, com quatro esporozoítos livres em seu interior. Dois tipos de oocistos são formados, os de parede fina e os de parede grossa. Os oocistos de parede fina são envoltos por somente uma membrana. Estes existem “*in situ*” e iniciam ciclos de auto-infecção, sendo necessário um pequeno número de oocistos ingeridos para seguir severas infecções. Os oocistos de parede grossa, envolto por múltiplas camadas, deixam o hospedeiro para transmitir a infecção para outros suscetíveis (CURRENT et al., 1986).

Current, em 1986, descreveu o ciclo de vida do *C. baileyi* em galinhas e mostrou que o *C. baileyi* possui um terceiro tipo de meronte, o meronte tipo III, originado por merozoítas emergentes do meronte do tipo II (CURRENT et al., 1986) os quais se desenvolverão até os estágios sexuais.

1.4. PATOGENIA E SINAIS CLINICOS

Indivíduos infectados apresentam um amplo espectro de sinais clínicos, variando de acordo com o local de infecção do parasita adquirido (epitélios dos tratos gastrointestinal, respiratório e urinário) (SMITH et al., 2007). A patogenicidade do *Cryptosporidium* varia de acordo com a espécie do parasito envolvido, dose infectante e características dos hospedeiros, como espécie, idade e *status* de imunidade (XIAO; FAYER, 2008). Em muitos indivíduos, a infecção por *Cryptosporidium* não está associada a sinais clínicos ou, em alguns casos, é associada somente a fase aguda ou a doença auto-limitante (XIAO et al., 2004).

A patogenia do *Cryptosporidium* está relacionada com inflamação e atrofia das vilosidades, devido à destruição dos enterócitos e hiperplasia das células da cripta intestinal,

com subsequente má-absorção. Em altos graus de inflamação o nível de eliminação de oocistos também é alto (GUERRANT et al., 1999). Argenzo em 1993 revelou um componente secretório, induzido pelo parasita, com aumento da secreção de cloro, diminuindo a digestão e o transporte de nutrientes (ARGENZIO et al., 1993).

A presença do parasita no trato digestivo provoca diarreia que pode ser branda ou severa, causando desidratação, anorexia, letargia e, em infecções severas, morte por desidratação e colapso cardio-vascular (OLSON et al., 2004a).

Em humanos imunocompetentes o parasita causa infecção aguda no trato digestivo, mas em pacientes imunocomprometidos causa infecção crônica com risco de morte (XIAO et al., 1999). Infecções comuns por *Cryptosporidium* em crianças podem explicar o atraso no desenvolvimento (LIMA et al., 2000), carência no crescimento e disfunção cognitiva (GUERRANT et al., 1999). Em pacientes HIV positivos em Lima, Peru, a infecção com *C. canis* e *C. felis* está mais associada com diarreia e a infecção com *C. parvum* está mais associada com vômitos (CAMA et al., 2007). A intensidade de eliminação dos oocistos em crianças no Brasil é maior quando infectadas com *C. hominis* do que com *C. parvum* (BUSHEN et al., 2004).

Em animais de produção o parasita causa desordens no sistema digestivo e respiratório, conduzindo para uma condição de saúde deficiente e perdas econômicas significantes (XIAO et al., 1999). *C. parvum*, a principal espécie zoonótica, causa diarreia neonatal em animais de produção com conseqüentes perdas econômicas (SMITH et al., 2007).

As aves podem apresentar sintomatologia respiratória ou do trato digestivo (XIAO et al., 2004). Manifestações da doença respiratória podem aparecer de duas maneiras: um envolvimento no sistema superior, que inclui sinusite (cabeça inchada); e no baixo sistema que inclui colonização da traquéia, brônquios, sacos aéreos e pulmões (SRÉTER; VARGA, 1999).

Um vasto leque de aves podem ser infectadas por *C. baileyi*, e este apresenta alta morbidade e mortalidade em infecção respiratória, especialmente em frangos (LINDSAY; BLAGBURN, 1990). *C. baileyi* e *C. meleagridis* são diferentes em termos de virulência e local de infecção. O *C. baileyi* se estabelece na mucosa do epitélio de uma ampla variedade de

órgãos, como a traquéia e a bursa de Fabrícus enquanto que o *C. meleagridis* se localiza no intestino delgado e ceco (ZHA; JIANG, 1994; BERMUDEZ et al., 1987). O *C. galli* parece estar associado com doença clínica e alta mortalidade (PAVLA' SEK, 1991; RYAN et al., 2003), provocando alterações no proventrículo uma vez que o parasito se desenvolve nas células epiteliais deste órgão e não acomete os intestinos e nem o trato respiratório (PAVLAS' EK, 1991).

Em répteis, infectados com *Cryptosporidium serpentis*, a infecção é frequentemente crônica e pode, eventualmente, ser letal. (XIAO, et al., 2004). Antunes e colaboradores estudaram e sugeriram que sinais clínicos e epidemiológicos da infecção por *C. serpentis* em cobras mostram-se similares à infecção por *C. galli* em aves silvestres (ANTUNES⁵ et al., 2008).

Tabela 2 - Espécies de *Cryptosporidium* spp. descritas com base em estudos fenotípicos e genotípicos e seus principais sítios de infecção

Espécie	Hospedeiro	Autor
<i>C. andersoni</i>	Bovino (A)	LINDSAY et al., 2000
<i>C. bovis</i>	Bovino (ID)	FAYER et al., 2005
<i>C. canis</i>	Canino (ID)	FAYER et al., 2001
<i>C. felis</i>	Felino (ID)	Iseki, 1979
<i>C. hominis</i>	Humanos (ID)	MORGAN-RYAN et al., 2002
<i>C. muris</i>	Roedor (E)	TYZZER, 1910
<i>C. parvum</i>	Camundongo, Bovino, Humano (ID)	TYZZER, 1912
<i>C. suis</i>	Suíno (ID, IG)	RYAN et al., 2004
<i>C. wrairi</i>	Cobaio (<i>Cavia porcellus</i>) (ID)	Vetterling et al., 1991
<i>C. serpentis</i>	Lagarto, Serpente (E)	Levine, 1980; Brownstein et al., 1977
<i>C. saurophilum</i>	Lagarto (E, ID)	Koudela & Moudri, 1998
<i>C. baileyi</i>	Galinha (B, C)	Current et al., 1986
<i>C. meleagrides</i>	Perú, Humano (ID)	SLAVIN, 1955
<i>C. galli</i>	Várias espécies de aves (P)	Pavlassek, 1999; RYAN, 2003
<i>C. molnari</i>	Peixe (E)	Alvarez-Pellitero & Sitja-Bobadilla, 2002
<i>C. ryananae</i>	Bovino (D)	FAYER et al., 2008
<i>S. schophthalmi</i>	Peixe (E, ID)	Alvarez-Pellitero et al., 2004
<i>C. macropodum</i>	Canguru gigante (<i>Macropus giganteus</i>) (D)	Power & RYAN, 2008
<i>C. varanii</i>	Monitor esmeralda (<i>Varanus prasinus</i>) (D)	Plavasek et al., 1995
<i>C. fayeri</i>	Canguru vermelho (<i>Macropus rufus</i>) (D)	RYAN et al., 2008

- Baseado em FAYER et al. (1997; 2000; 2001; 2004a AleT; 2006a), Monis e Thompson (2003), MORGAN et al. (1999), XIAO et al. (2000; 2004 AleT).

- A) Abomaso, ID) Intestino Delgado, E) Estômago, IG) Intestino grosso, B) Bursa de Fabrícus, C) Cloaca, P)Pró-ventrículo, D) Desconhecido.

⁵ ANTUNES R. G.; SIMÕES, D. C.; NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. Natural Infection with *Cryptosporidium galli* in Canaries (*Serinus canaria*), in a Cockatiel (*Nymphicus hollandicus*), and in Lesser Seed-Finches (*Oryzoborus angolensis*) from Brazil. *Avian Diseases*, V. 52, 04-01.3d, 2008. aceite para publicação: 18/8/08

1.5 EPIDEMIOLOGIA

O estágio infectante do *Cryptosporidium* é o oocisto, eliminado nas fezes do indivíduo infectado. Os oocistos apresentam três recursos que contribuem para sobrevivência e dispersão no organismo. Primeiro, os oocistos são imediatamente infectantes para o próximo hospedeiro quando eliminado nas fezes (FAYER et al., 1997), caracterizando a transmissão fecal-oral. Segundo, os oocistos são bastante resistentes no meio ambiente e podem se manter infectantes por dois meses ou mais dependendo das condições apropriadas (SMITH; ROSE, 1998), em 20°C suportam até seis meses (FAYER et al., 1998). Por último, os oocistos apresentam um tamanho pequeno (4 a 6 µm de diâmetro) e resistem à desinfecção com níveis normais de cloro utilizados em água de tratar plantas e sistemas de distribuição, conseqüentemente seguem para a infecção em água de bebida (SMITH; ROSE, 1998). Oocistos de *Cryptosporidium* spp. resistem aos mais variados métodos usados em tratamentos de água (KORISH et al., 1990), seja cloração, ozonização, ou incompleta remoção de oocistos pelo método de filtração.

Diante destas características a veiculação hídrica torna-se uma eficiente via de transmissão da criptosporidiose, e este meio de transmissão é preocupante uma vez que é capaz de atingir um grande contingente da população (LIMA; STAMFORD, 2003).

Dentre os grupos de risco para a criptosporidiose estão crianças, pessoas mal-nutridas e indivíduos imunocomprometidos, receptores de transplantes e pacientes que recebem quimioterapia para tratamento de neoplasias (FAYER et al., 2000).

O primeiro surto de criptosporidiose por veiculação hídrica, confirmado por testes sorológicos, ocorreu em 1984 em Braun Station, Texas, nos Estados Unidos da América (CACCIO et al., 1999). Um episódio marcante na história da criptosporidiose foi a ocorrência de um surto que afetou 403.000 pessoas em 1993 identificado como transmissão hídrica em Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos (MACKENZIE et al., 1994). Devido à abrangência e frequência de surtos, a criptosporidiose vem sendo considerada um sério problema mundial de saúde pública e as autoridades de saúde em países desenvolvidos e em desenvolvimento questionam uma reavaliação das normas microbiológicas em água de beber (Araújo et al., 2008).

Estima-se, na América Latina 50.000 casos de infecções em humanos por ano (YASON; RIVERA, 2007). No Brasil já foram realizados diversos estudos de criptosporidiose em uma ampla variedade de espécies hospedeiras, inclusive foi constatado que as regiões mais afetadas pela criptosporidiose são Nordeste e Sudeste (CRT, 1997).

Em um estudo realizado na cidade de São Paulo com amostras de fezes de 224 crianças de uma creche no período de março à maio de 2001 foram encontradas 29 (12,9%) com *Cryptosporidium hominis* (GOLÇALVES et al., 2006). Gonçalves também estudou fezes de humanos no estado de São Paulo durante os anos de 2000 à 2006 e diagnosticou 233 casos positivos para *Cryptosporidium* em 2410 indivíduos no exame corpoparasitológico, e no exame de PCR somente 37,2% (82/233) foram positivas e 52 (88,5%) destas foram caracterizadas molecularmente como *C. hominis* (GOLÇALVES, 2007).

Entre julho de 1990 e junho de 1997, Capuano examinou 3340 amostras de fezes, apresentando diarreia ou não, de 1833 pacientes soropositivos para o HIV, na Seção de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, e encontraram 207 (11,3%) pacientes parasitados com *Cryptosporidium* sp (CAPUANO et al., 2001). Nos meses de setembro de 1996 até abril de 1997, foram coletadas amostras de fezes de 200 pacientes HIV positivos do Hospital da Universidade Federal do Estado de São Paulo e do Instituto de Infectologia Emilio Ribas e foram encontradas 14 com *Cryptosporidium* sp. (7%), sendo que destes pacientes 11 apresentavam-se diarreicos (CIMERMAN et al., 1999).

Na cidade de São Paulo-SP, GENNARI e colaboradores encontraram 2,8% de positividade do parasita em fezes de 353 cães e 14,4% em 187 amostras de gatos (GENNARI et al., 1999). Foi encontrado *C. parvum* em 1,4% das amostras de fezes de gatos em São Paulo e Guarulhos-SP (RAGOZO et al., 2002). Funada et al. (2006) encontraram 2,4% de positividade de *Cryptosporidium* sp. em 1.755 amostras de cães e 11,3% em 327 amostras de gatos, coletados entre janeiro de 2000 à dezembro de 2004 na cidade de São Paulo. Thomaz (2006) encontrou 2,8% e 12,5% de positividade para o *C. parvum* em 106 amostras de fezes de gatos e 120 cães, respectivamente, no estado de São Paulo. Em Londrina, estado do Paraná, 2,2% de amostras de cães foram positivas para *Cryptosporidium* sp. (NAVARRO et al., 1997) e no Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro, a positividade de amostras de fezes de cães foi de 2,4% (HUBER et al., 2005).

Thomaz encontrou 17,1% (em 123) amostras positivas para *Cryptosporidium* sp. em bovinos, bezerros e jovens, no Estado de São Paulo (THOMAS, 2006). Foi encontrado em 2004 21,2% de positividade para *Cryptosporidium* sp. em 203 amostras de fezes de bezerros em Botucatu-SP (LANGONI et al., 2004).

Aves selvagens podem desempenhar um importante papel na epidemiologia da doença causada pelo *Cryptosporidium*. Exemplificando com o caso do ganso do Canadá (*Branta Canadensis*), o *Cryptosporidium* é um importante patógeno para esta ave, que por ter hábitos migratórios tem potencial para disseminar o parasito em diversos ambientes aquáticos.

No Brasil poucos trabalhos dedicaram-se a relatar a ocorrência de *Cryptosporidium* em aves. Nakamura (2008) encontrou 10,3% de positividade em 436 amostras de fezes de aves domésticas e 7,4% de positividade em 27 amostras de fezes de aves exóticas no estado de São Paulo. Em um estudo realizado no Brasil com 488 amostras de aves silvestres foram identificadas 20 amostras positivas (4,7%) (SIMÕES⁶ et al., no prelo).

O *Cryptosporidium* sp. já foi isolado de água utilizada para irrigação de verduras e frutas e pode ser encontrados em até 100% de amostras de água de superfície (Thurston-Enriquez et al., 2002). Em Viçosa-MG, foi realizado um estudo em água de mananciais de captação tendo sido encontrado 79,5% de amostras positivas (HELLER et al., 2004).

No rio Atibaia, no estado de São Paulo, foram encontradas amostras positivas para *Cryptosporidium* (FRANCO et al., 2001). Na cidade de São Paulo foram estudados 24 amostras de esgotos e o *Cryptosporidium* estava presente em todas elas (FARIAS et al., 2002). Na Itália também foram realizados estudos em águas de superfície e foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* em 100% de amostras de rios, 65,2% de amostras de cursos d'água e 33,3% de amostras de lagos (GIANGASPERO et al., 2007).

Devido à característica zoonótica do *Cryptosporidium*, ao acontecimento de surtos e da presença do parasita já registrada em mais de 90 países, torna-se fundamental sua genotipagem para melhor entendimento das espécies de risco para a saúde pública e sua dinâmica de transmissão e da relação hospedeiro-parasita (MORGAN et al., 1999).

⁶ SIMÕES, D. C.; ANTUNES, R. G.; NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em aves selvagens Brasileiras. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, no prelo, 2008.

1.6 DIAGNÓSTICO

A criptosporidiose pode ser diagnosticada por métodos diretos e indiretos. Entre os métodos diretos estão incluídos aqueles dependentes da visualização do parasita nos seus diversos estágios e os métodos moleculares como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

Métodos indiretos, menos empregados, baseiam-se na detecção e identificação dos anticorpos Anti-*Cryptosporidium* sp. Exposições prévias ao parasita podem ser demonstradas pelo teste de anticorpos específicos aos *Cryptosporidium* no soro sanguíneo, porém a não especificidade destes métodos pode ser problemática devido à reação cruzada com outros microorganismos (FAYER et al., 2000).

Dentre o filo Apicomplexa, os oocistos das espécies pertencentes ao gênero *Cryptosporidium* estão entre os menores. Os oocistos de *Cryptosporidium* que habitam o estômago são maiores do que os que habitam o intestino, de modo que o tamanho dos maiores varia entre 5,5 x 7,4 µm até 8,6 x 6,2 µm, como no caso de *C. serpentis* que mede 6,4 x 5,3 µm (5,8–6,8 x 4,8–5,8 µm) (GRACZYK; CRANFIELD, 2000), *C. andersoni* que mede 7,4 x 5,5 µm (6,0–8,1 x 5,0–6,5 µm) (ANDERSON, 1991), *C. muris* medindo 8,6 x 6,2 µm (7,5–9,8 x 5,5–7,0 µm) (GATEI et al., 2002) e *C. galli* medindo 8,5 x 6,4 µm (PAVLA'SEK, 1999). O tamanho dos oocistos menores varia de 5,0 x 4,6 µm até 6,2 x 4,6 µm, como no caso dos seguintes genótipos que parasitam o estômago: *C. parvum* medindo 5,2 x 4,6 µm (TILLEY et al., 1991), *C. baileyi* medindo 6,2 x 4,6 µm (5,6–6,3 x 4,5–4,8 µm) (CURRENT et al., 1986), *C. saurophilum* que mede 5,0 x 4,7 µm (4,4–5,6 x 4,2–5,2 µm) *C. canis* 4,9 x 4,7 µm (FAYER et al., 2001), *C. meleagridis* medindo 4,5 x 4,0 µm (KOUDELA; MODRY; VITOVEC, 1998), *C. hominis* medindo 5,0 x 4,3 µm (4,6–5,4 x 3,8–4,7 µm) (MORGAN-RYAN et al., 2002) e *C. macropodum* que mede 4,9 x 5,4 µm (5,0–6,0 µm x 4,5–6,0 µm). Vale saber que o *C. molnari* é pequeno (medindo 4,7 x 4,5 µm) e habita com maior frequência o estômago, porém habita o intestino também (RYAN et al., 2004). Devido à enorme variedade de morfologias torna-se dificultoso diferenciar as espécies de *Cryptosporidium* apenas pela observação em microscopia óptica de oocistos. Recomenda-se, então, que o diagnóstico das espécies de *Cryptosporidium* spp. seja realizado por técnicas moleculares e

não somente por critérios morfológicos, uma vez que os oocistos presentes nas fezes e no ambiente apresentam diferenças muito sutis de uma espécie para outra (MORGAN et al., 1999).

Oocistos podem ser observados em amostras de fezes pelo método de flutuação em sacarose (CURRENT, 1990), devendo ser examinadas em 10 minutos, no máximo, após a preparação devido à longa exposição à solução de açúcar que pode promover distorção ou colapso do oocisto. Os oocistos também podem ser concentrados por longa e/ou rápida centrifugação (>500g/10min ou mais) tal que é comumente usado para diagnóstico em água.

Para aumentar a sensibilidade e especificidade, na visualização dos oocistos, são utilizados corantes como azul de metileno (BAXBY et al., 1984), Kinyoun (Ma & Soave, 1983), Ziehl-Neelsen (HENRICKSEN; POHLENZ, 1981), e DMSO - carbol fuccina (POHJOLA et al., 1984).

A detecção de *Cryptosporidium* spp. também pode ser realizada por identificação sorológica, empregando-se teste policlonal de anticorpo fluorescente (STIBBS et al., 1986), imunofluorescência com anticorpos monoclonais (XIAO et al., 1993; CHAN et al., 2000), ELISA e teste de cromatografia (GARCIA et al., 2000) para detecção de antígenos do parasito nas fezes.

É possível também a visualização do parasito com métodos de investigação *post-mortem*. Nestes casos, secções histológicas dos órgãos acometidos podem ser coradas com hematoxilina-eosina, onde o *Cryptosporidium* aparece como um corpo basofílico de 2,0-7,5 µm de diâmetro no interior das microvilosidades de células epiteliais, evidenciando os diversos estágios de desenvolvimento (SRÉTER et al., 2000a).

Diferenças moleculares são chaves para a nomeação de espécies novas de *Cryptosporidium* e para evitar confusões na identidade dos parasitas envolvidos (MORGAN et al., 1999). Diferenças desta natureza só são possíveis de serem identificadas com métodos laboratoriais, entre os quais a reação em cadeia pela polimerase, a PCR, associadas a métodos de identificação de variabilidade genotípica como a RFLP ou o sequenciamento automático de ácidos nucleicos. Com efeito, o emprego destas ferramentas de epidemiologia molecular

vem trazendo significativa mudança na compreensão da transmissão zoonótica do parasita (XIAO; FAYER, 2008) e permitindo melhor controle e prevenção da doença.

Assim, a detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp. vem sendo feita por métodos moleculares empregando-se diversas sequências gênicas do parasito como alvo. Entre estes alvos destacam-se a região codificadora do RNA da menor unidade ribossômica (18S rDNA), o espaçador interno transcrito (ITS) do locus ribossômico, o gene codificador de Acetil-CoA (BLACK et al., 1996), o gene codificador de proteína de parede de oocisto (COWP) (SPANNO et al., 1997), o gene codificador de produtos para a síntese de dihidrofolato timidilato-redutase (GIBBONS et al., 1998), o gene codificador de proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70), o gene da trombospondina - relacionada com aderência de proteínas, o gene codificador de actina e fragmentos de genoma não identificados (BONNIN et al., 1996).

Dentre os marcadores citados, sequências codificadoras de 18S rDNA, actina e HSP70 vêm sendo empregadas com maior frequência, e dentre estas, a 18S rDNA é a mais comumente usada. Sequências 18S rDNA são úteis não somente por ter distribuição universal, mas também porque *primers* genéricos podem ser facilmente empregados (FAYER et al., 2001; MORGAN-RYAN et al., 2002). Análises de sequências 18S rDNA permitem o reconhecimento diferencial entre as espécies de *Cryptosporidium* atualmente aceitas pela maioria dos autores. (MORGAN et al., 2000; XIAO et al., 2000).

As sequências 18S rDNA de *Cryptosporidium* spp caracterizam-se por intercalações de regiões conservadas e polimórficas ao longo dos seus cerca de 1700 pares de bases. Os *primers* comumente empregados para detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp estão localizados de forma a amplificar regiões capazes de fornecer informações moleculares que permitam a distinção entre os genótipos e espécies deste parasito.

Entretanto, os *primers* atualmente empregados para amplificar sequências 18S rDNA foram desenhados em época que muito menor quantidade de informação molecular estava disponível. Atualmente, com o elevado aporte de dados moleculares em bancos de dados de acesso público, faz-se necessária atualização de sondas moleculares para emprego em diagnóstico com base no conhecimento gerado até o momento.

Nesse sentido, foi realizado o trabalho a seguir que tem como fulcros a identificação de sequências 18S rDNA de *Cryptosporidium* spp. de diversas espécies de hospedeiros, bem como a atualização do conhecimento da variabilidade em sequências gênicas deste locus, com vistas ao desenho de sondas moleculares com melhor eficiência para geração de dados moleculares para detecção e identificação deste parasito. De maneira mais precisa, os objetivos deste trabalho são descritos na página que segue.

2 OBJETIVOS

1. Identificar, por análises *in silico*, regiões polimórficas em sequências 18S que permitam diferenciar as espécies e genótipos reconhecidos de *Cryptosporidium* spp.
2. Caracterizar molecularmente as amostras de *Cryptosporidium* encontradas em fezes de humanos, aves silvestres, sagüis, cães e bovinos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foi coletado um total de 1031 amostras de fezes, entre amostras de animais silvestres, domésticos e de humanos. Foram realizados exames coproparasitológicos destas amostras e para os que se apresentaram positivos para *Cryptosporidium* sp. realizou-se purificação dos oocistos e extração de DNA dos mesmos. Após a extração fez-se PCR e *nested*-PCR dirigidas ao gene codificador de 18S rRNA e então sequenciamento dos produtos gerados pela *nested*-PCR.

Com as sequências codificadoras de 18S rRNA recuperadas do Genbank e algumas sequências obtidas neste estudo foi possível identificar e analisar as regiões polimórficas dentro deste locus.

3.1 AMOSTRAS

Em Junho de 2007 foram colhidas 392 amostras de fezes de animais domésticos criados para companhia e subsistência em 98 propriedades rurais de baixa renda, sendo 85 assentamentos e 13 grandes propriedades de criação animal, no município de Teodoro Sampaio, estado de São Paulo. No total, foram colhidas, 197 amostras de bovinos, sendo 108 (54,82%) bezerros menores de três meses, 62 de eqüinos, 25 de suínos, 11 de ovinos, 27 de cães, 1 de felino e 69 de aves. As amostras frescas foram coletadas diretamente do chão, armazenadas em bicromato de potássio 2,0% refrigeradas e avaliadas em um período máximo de dois meses.

No período compreendido entre janeiro de 2006 e abril de 2008, 474 amostras de fezes de aves silvestres, de cativeiro foram coletadas pelo Ambulatório de aves do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As amostras eram provenientes aves de estimação e de criadouros comerciais no estado de

São Paulo, sendo coletadas frescas diretamente das gaiolas, refrigeradas e avaliadas em um período máximo de três dias. Foram pesquisados os seguintes números de indivíduos das famílias de aves: 282 Emberizidae (59,2%) com grande maioria (82,3%) de curiós (*Oryzoborus angolensis*), 112 Psittacidae (23,5%), 44 Cardinalidae (9,3%), 12 Turdidae (2,5%), 8 Ramphastidae (1,7%), 7 Icteridae (1,5%), 3 Estrilidae (0,6%), 2 Contigidae (0,4%), 2 Thraupidae (0,4%) e 2 Fringilidae (0,4%).

O mesmo ambulatório de aves no período de março de 2007 à março de 2008 recebeu 141 amostras de sagüis (67 de *Callithrix penicillata*, 51 de *C. jacchus* e 23 de sagüis híbridos) de cativeiro do Estado de São Paulo. As amostras foram coletadas frescas, diretamente das gaiolas e armazenadas em bicromato de potássio 2,0% e refrigeradas, sendo avaliadas em um período máximo de três dias.

Não foram analisadas as características clínicas dos hospedeiros descritos acima cujas amostras foram coletadas, bem como sintomatologias causadas pelo *Cryptosporidium* spp.

Foram coletadas 24 amostras de fezes com *Cryptosporidium* de pacientes humanos HIV positivos apresentando diarreia no período de janeiro à julho de 2007, internados no Instituto Emílio Ribas, na cidade de São Paulo, estado de São Paulo, que já haviam sido classificadas como positivas para *Cryptosporidium* spp. pelos laboratórios daquela instituição. Até o momento da análise, período máximo de um mês, as amostras foram conservadas em bicromato de potássio e refrigeradas.

3.2 EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS

As amostras de fezes foram submetidas ao procedimento convencional de centrifugo-flutuação em solução de sacarose (OGASSAWARA; BENASSI, 1980) com emprego de material descartável e, então, analisadas com o uso de microscópio óptico, aumento de 400 vezes, para o encontro dos parasitas.

3.3 PURIFICAÇÃO DE OOCISTOS

As lâminas, nas quais foram realizadas as observações de oocistos de *Cryptosporidium* spp., foram submetidas à lavagem logo em seguida da observação, sendo utilizado 1,0ml de TE (Tris-EDTA pH 8,0) em placa de Petri descartável. A solução foi submetida à centrifugação a 12.000g por 10min em microtubos de 1,5ml, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao microtubo mais 1,0 ml de TE para uma nova centrifugação a 12.000g. Novamente o sobrenadante foi desprezado de modo à sobrar somente o oocisto purificado, tal que foi armazenado à 5°C até a realização de extração de DNA.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA foi realizada por meio de choque térmico, proteinase K e fenol-clorofórmio.

Ao sedimento contendo oocisto purificado no microtubo foi adicionado 400µl de H₂O, 50µl de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) à 10%, 5µl de Tris HCl 1M, 25µl de EDTA 0,5M e 10µl de NaCl 5M, seguido de agitação em vórtex. A solução foi submetida ao congelamento em nitrogênio líquido por 5min e descongelamento (em bloco térmico) por 10min à 57°C, repetindo-se esta seqüência por três vezes. No final dos ciclos de congelamento-descongelamento, foi adicionado 10µl de proteinase K, os tubos foram novamente agitados em vórtex e deixados sob incubação em bloco térmico por 2hs à 56°C, com agitação periódica. Após a incubação foi adicionado ao material 250µl de fenol e 250µl de clorofórmio para então ser centrifugado à 12.000g à 4°C por 10 minutos. Foi então retirado cuidadosamente 400µl do sobrenadante e o conteúdo transferido para outro microtubo de 1,5ml ao qual foi adicionado 400µl de propanol. A solução alcoólica foi então armazenada em freezer por 2 horas ou over-night. Em seguida foi realizada centrifugação da solução por 30 minutos à 12.000g e 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e ao sedimento foi acrescentado 1,0ml de etanol 70% e centrifugado novamente por 12.000g à 4°C por 10

minutos. O etanol foi descartado então (por inversão) e o microtubo deixado de cabeça para baixo sobre um papel toalha até secar-se por completo. Finalmente foi adicionado 30µl de TE e deixado no bloco térmico por 56°C por 10min para então ser armazenada no freezer até o momento da amplificação.

O DNA obtido de amostras puras de *Cryptosporidium baileyi* foi utilizado como controle positivo e água ultra pura autoclavada para controle negativos de todas as reações de extração de DNA, PCR e *nested*-PCR.

3.5 PCR – REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

Para amplificação da subunidade 18S do RNA ribossômico foi utilizada a técnica de *nested*-PCR com os seguintes *primers*:

Reação primária, originando uma sequência com aproximadamente 1300pb (XIAO et al., 1999b):

Primer F1: 5' – TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG – 3'

Primer R1: 5' – CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA – 3'

Reação secundária, originando uma sequência com aproximadamente 826 à 864pb, dependendo da espécie (XIAO et al., 1999b):

Primer F2: 5' – GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG – 3'

Primer R2: 5' – AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A – 3'

Foram utilizadas as seguintes condições de reação primária: Preparação de 50µl de solução contendo 5µl da solução de DNA, preparada anteriormente (como já citado), 5µl de solução tampão para PCR (20mM de Tris-HCl pH8,4 e 50 mM de KCl), 200µM de dNTP (0,25mM de cada base), 2,0µl de MgCl₂, 0,3µl de cada *Primer* da reação primária (30pmol), 1,25 unidade Da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Cat # 18038-42) e 31,2µl de H₂O ultra pura autoclavada.

As condições utilizadas na amplificação pela PCR foram de 94°C/3min, 35 ciclos de 94°C/45seg, 55°C/45seg e 72°C/60seg, seguidos de uma extensão final de 72°C/7min.

A *nested*-PCR foi realizada com as mesmas condições da amplificação da PCR, porém com os *primers* da reação secundária e 2,5µl da primeira reação como amostra.

3.6 OBTENÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

Foram utilizados 20µl de cada amostra de fragmentos amplificados pela *Nested-PCR* sendo analisadas em eletroforese em cuba horizontal. O gel de agarose estava à 1,5% e imerso em tampão TBE (0,045M Tris-borato e 1mM EDTA).

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/ml) por 20min para a visualização das bandas sob transiluminação com luz ultravioleta.

As dimensões dos fragmentos amplificados foram comparadas a um padrão de peso molecular, *Low Mass DNA Ladder* (Gibco BRL-Gaytherburg/USA), utilizando a tabela fornecida pelo fabricante, obtendo-se a concentração em ng/µl, com fragmentos múltiplos de 100 pares de base disposto no gel juntamente com as amostras analisadas. Os fragmentos desejados dos produtos amplificados foram separados e isolados para então purificá-los.

3.7 PURIFICAÇÃO

Os produtos amplificados por *Nested-PCR* do gene codificador para o 18S do RNAr foram purificados utilizando-se o kit GFXTM (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DO DNA PURIFICADO

Com uma alíquota da amostra de DNA purificada em mãos realizou-se uma nova eletroforese para estimar sua concentração. As amostras foram comparadas a uma alíquota de 5µl do produto purificado com o padrão *Low Mass DNA Ladder* (Gibco BRL-Gaytherburg/USA), utilizando a tabela fornecida pelo fabricante, obtendo-se a concentração em ng/µl.

3.9 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Para a reação de seqüenciamento utilizou-se o *kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin Elmer). As quantidades de reagentes foram determinadas a partir da concentração das amostras de DNA purificado. Para uma reação com 10,0µl de volume final, foram utilizados 1,0µl de *BigDye*TM v.3.1 (Applied Biosystems), 2,0µl de tampão *Save Money 5x* (200mM Tris-HCl; 5mM MgCl₂; pH 9,0), 10pM de *Primer* (senso ou anti-senso) e 24ng de DNA purificado. Em amostras com concentração de DNA abaixo de 4ng/µl, o volume final da reação foi dobrado, assim como as concentrações dos reagentes, exceto a do *Primer* utilizado.

As condições das reações de seqüenciamento envolveram uma desnaturação inicial a 96°C/1 min e 40 ciclos de 96°C/15 seg, 50°C/15 seg e 60°C/4 min.

3.10 PRECIPITAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

A purificação por precipitação em álcool dos produtos foi realizada após a reação de seqüenciamento. A cada amostra, adicionaram-se 40µl ou 80µl de isopropanol a 65% de

acordo com as reações de volumes finais de 10µl e 20µl, respectivamente. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas em local protegido da luz por 15min, em temperatura ambiente, e em seguida, centrifugadas a 14.000g por 25min. Descartou-se o isopropanol por inversão de tubos e o sedimento foi homogeneizado com 300µl de etanol a 70%. Procedeu-se nova centrifugação a 14.000g por 10min. O excesso de etanol foi cuidadosamente aspirado com o auxílio de pipeta, e sua total remoção realizada em banho-seco a 80°C por 2min. As amostras foram armazenadas em -20°C até o seqüenciamento.

3.11 SEQUENCIAMENTO

As amostras purificadas foram homogeneizadas com 3,4µl de formamida e Blue Dextran-EDTA (Applied Biosystems, USA) na proporção de 5:1, desnaturadas a 95°C por 3min e colocadas no gelo por 2min para então serem submetidas a eletroforese em seqüenciador automático modelo ABI Prism™ 377 DNA Sequences (Applied Biosystems, USA).

3.12 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas manualmente com o auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit Sequence Aligment Editor (HALL, 1999), sendo comparadas com seqüências homólogas disponíveis no GenBank.

3.13 IDENTIFICAÇÕES DE REGIÕES POLIMÓRFICAS E ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Os alinhamentos múltiplos obtidos com as seqüências de *Cryptosporidium* spp. determinadas neste estudo e com seqüências recuperadas do Genbank (Tabela 3) foram analisados visualmente para a definição das regiões polimórficas. Estes alinhamentos permitiram a construção de uma representação esquemática, para identificação visual de todo o alinhamento e suas respectivas regiões polimórficas. Tanto a representação detalhada quanto a esquemática do alinhamento em tela foram geradas com auxílio do programa BioEdit. As regiões polimórficas foram definidas manualmente, após inspeção visual da representação gráfica do alinhamento.

As regiões polimórficas foram então testadas individualmente para reconstrução filogenética empregando-se o programa MEGA versão 4 (TAMURA et al., 2007).

Tabela 3 - Sequências codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp empregadas para as análises de regiões polimórficas, respectivos números de acesso GenBank, identificação e data de depósito

Taxon	GenBank	Identificação	Data de depósito
Cr felis	AF108862.1	<i>Cryptosporidium felis</i>	21/08/2000
Cr felis C8	AF112575.1	<i>Cryptosporidium felis</i>	15/04/2004
Cr bovis 94-1_2007	EF514234.1	<i>Cryptosporidium bovis</i>	11/03/2008
Cr sp. 2879.VT-2.2003	AY587166.1	<i>Cryptosporidium ryanae</i>	22/06/2004
Cr canis	AB210854.1	<i>Cryptosporidium canis</i>	04/10/2006
Cr parvum CPD1	AF112576.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	14/04/2004
Cr parvum CYDRG18SB	L16997.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	11/06/1993
Cr parvum H7	AF108865.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	21/08/2000
Cr parvum CPRM1	AF112569.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	15/04/2004
Cr parvum CYDRG18SA	L16996.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	08/03/1996
Cr parvum C1	AF108864.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	21/08/2000
Cr parvum MT	AF161856.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	19/09/2001
Cr parvum UCP	AF161857.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	19/09/2001
Cr parvum TAMU	AF161858.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	19/09/2001
Cr parvum GCH1	AF161859.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	19/09/2001
Cr parvum IOWA	AF164102.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	19/09/2001
Cr M24	AF108863.1	<i>Cryptosporidium M24</i>	21/08/2000
Cr parvum CPM1	AF112571.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	15/04/2004
Cr K1	AF108860.1	<i>Cryptosporidium K1</i>	21/08/2000
Cr parvum K2	AF112570.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	15/04/2004
Cr parvum CPF	AF112572.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	15/04/2004
Cr meleagridis CMEL	AF112574.1	<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	15/04/2004
Cr parvum P1	AF115377.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	15/04/2004
Cr Pig 1	AF108861.1	<i>Cryptosporidium Pig 1</i>	21/08/2000
Cr wairi CWR	AF115378.1	<i>Cryptosporidium wairi</i>	15/04/2004
Cr sp. Sbey05c	DQ295012.1	<i>Cryptosporidium</i> sp.	16/12/2005
Cr sp. Sltl05c	DQ295014.1	<i>Cryptosporidium</i> sp.	06/12/2005
Cr sp. Sblld05c	DQ295013.1	<i>Cryptosporidium</i> sp.	06/12/2005
Cr sp. Sblld05a	DQ295016.1	<i>Cryptosporidium</i> sp.	06/12/2005
Cr sp. CSP06	AF112573.1	<i>Cryptosporidium</i> sp.	15/04/2004
Cr saurophilum	EF502042.1	<i>Cryptosporidium saurophilum</i>	17/08/2007
Cr baileyi CBAIH-1	AJ276096.2	<i>Cryptosporidium baileyi</i>	26/04/2002
01MK		<i>Cryptosporidium baileyi</i>	produzida neste estudo
Cr sp. 6876	AY504514.1	Genótipo pato	08/07/2004
Cr sp. 6898	AY504516.1	Genótipo ganso II	08/07/2004
Cr sp. 1196	AY504512.1	Genótipo ganso I	08/07/2004
Cr serpentis	AF151376.2	<i>Cryptosporidium serpentis</i>	13/12/1999
Cr andersoni bjcm	AY954885.1	<i>Cryptosporidium andersoni</i>	13/12/1999
Cr muris Calf IDVS-811	AF093496.1	<i>Cryptosporidium muris</i>	15/04/2004
Cr muris Mouse CMU03	AF093497.1	<i>Cryptosporidium muris</i>	15/04/2004
Cr fragile clone A	EU162751.1	<i>Cryptosporidium fragile</i>	15/07/2008
Cr fragile clone G	EU162752.1	<i>Cryptosporidium fragile</i>	15/07/2008
Cr fragile clone D	EU162753.1	<i>Cryptosporidium fragile</i>	15/07/2008
Cr fragile clone J	EU162754.1	<i>Cryptosporidium fragile</i>	15/07/2008
Cr cf. molnari	AY524773.1	<i>Cryptosporidium molnari</i>	15/06/2004
02MK		<i>Cryptosporidium galli</i>	produzida neste estudo
09MK		<i>Cryptosporidium galli</i>	produzida neste estudo
Cr galli B1-31	AY168846.1	<i>Cryptosporidium galli</i>	04/09/2003
Cr sp. BE6	DQ650339.1	Genótipo I	05/12/2006
Cr sp. ex Struthio camelus	DQ002931.1	Genótipo II	26/07/2006
Cr sp. B1-11	DQ650340.1	Genótipo II	05/12/2006
Cr sp. BE20	DQ650341.1	Genótipo II	05/12/2006
Cr sp. BW3	DQ650342.1	Genótipo III	05/12/2006
Cr sp. BP1	DQ650343.1	Genótipo III	05/12/2006
Cr sp. Czech B4	DQ650344.1	Genótipo IV	05/12/2006
Cr sp. CzechB1	AY273769.1	Eurasian wood cock	03/07/2003

4 RESULTADOS

Nos itens que seguem são apresentados os resultados das análises *in silico* do polimorfismo de gene codificador de 18S rRNA e das frequências relativas dos diversos genótipos e espécies de *Cryptosporidium* spp. pesquisados em amostras fecais de humanos e animais.

4.1 IDENTIFICAÇÕES DE REGIÕES POLIMÓRFICAS

Foram separadas 56 seqüências de DNA codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp. Nesta seleção foram priorizadas as seqüências completas, as seqüências de espécies já consagradas e definidas e as seqüências de genótipos de aves, visto que parte expressiva das amostras deste trabalho constitui-se de amostras de origem aviária. As amostras selecionadas para este fim encontram-se na tabela 3.

Após a seleção, as seqüências foram alinhadas, permitindo a construção de uma figura (Anexo A) contendo o alinhamento múltiplo entre elas. O alinhamento múltiplo permitiu ainda a construção de uma representação esquemática, para identificação visual de todo o alinhamento e suas respectivas regiões polimórficas. As regiões polimórficas foram definidas manualmente, após inspeção visual da representação gráfica do alinhamento. As regiões selecionadas foram marcadas sobre o mesmo, como é mostrado na figura 1.

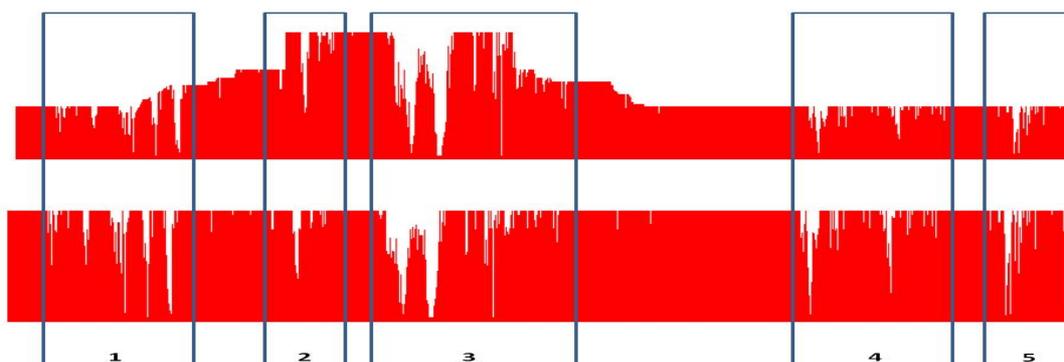


Figura 1- Plotagem de similaridade entre seqüências codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp. Superior: plotagem das 56 seqüências da Tabela 3, entre completas e incompletas. Inferior: plotagem das 34 seqüências completas da Tabela 3. Caixas 1, 2, 3, 4, 5: regiões polimórficas

Após a definição das regiões polimórficas, foram realizadas análises filogenéticas empregando-se separadamente cada uma das regiões. A identificação precisa de cada região polimórfica pode ser encontrada na tabela 4.

Tabela 4: Posições das regiões polimórficas utilizados neste estudo em relação ao alinhamento múltiplo das seqüências de *Cryptosporidium* spp indicado no Anexo A

Domínio	Posição
Região 1	69 – 346
Região 2	448 – 539
Região 3	631 – 937
Região 4	1348 – 1576
Região 5	1668 – 1792

Com informações geradas pela árvore filogenética construída com dados da Região 1 é possível observar que as amostras de *C. parvum* estão posicionadas no mesmo clado com um valor de *bootstrap* de 78, assim como as de *C. hominis* (anteriormente definidas como *C. parvum* H7, *C. parvum* CYDRG 18SB e *C. parvum* CPRM1), com um *bootstrap* de 86. Da mesma maneira, as amostras de *C. suis* (denominadas como *Cryptosporidium* pig 1 e *C. parvum* P1), as de marsupiais (*Cryptosporidium* K1 e *C. parvum* K2), as de cães (*C. canis* e *C. parvum* CPD1), de felinos (*C. felis*) e de esquilos (*Cryptosporidium* sp. Sbl05c, *Cryptosporidium* sp. Sbey05c, *Cryptosporidium* sp., Sltl05c) também são agrupadas com altos valores de *bootstrap* (Figura 2).

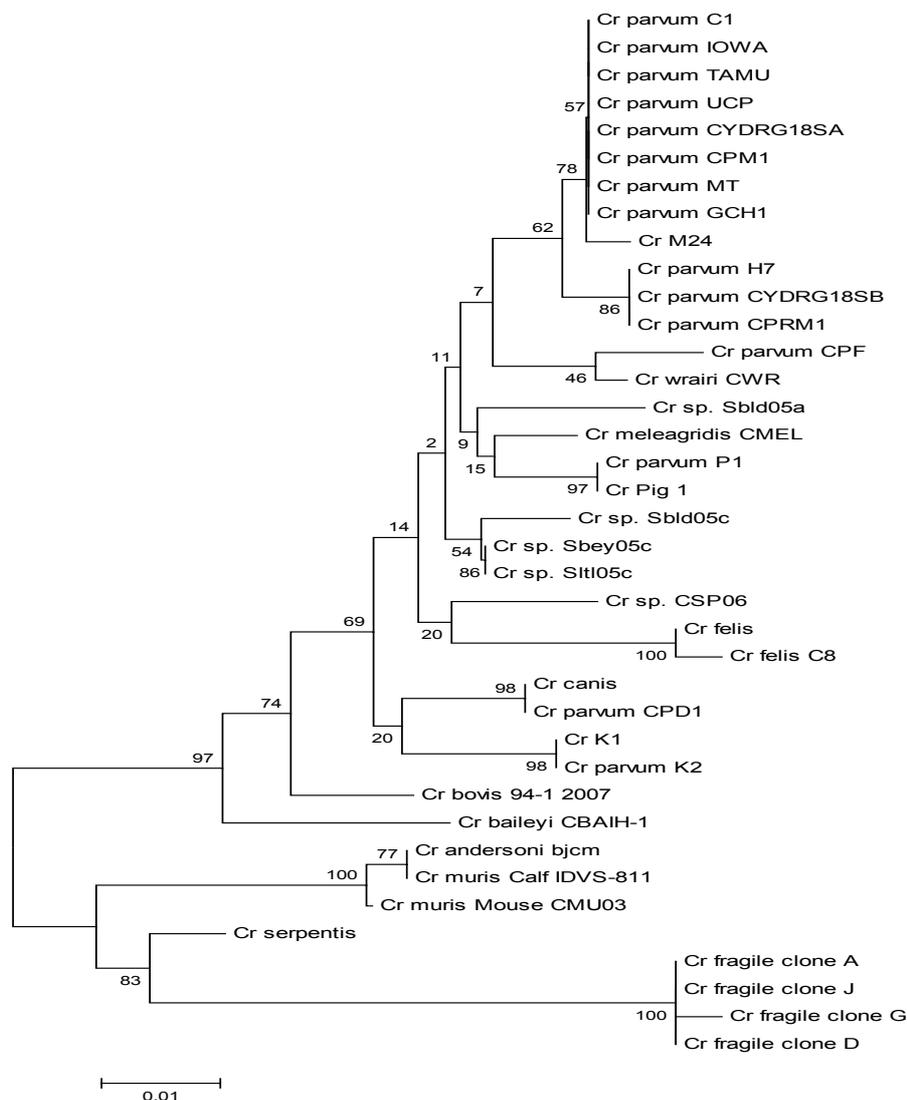


Figura 2- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 38 taxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *p-distance* utilizando 257 nucleotídeos da região polimórfica 1 do gene codificador de 18S rRNA. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

A árvore filogenética reconstruída com a região de número 2 mostra que espécies *C. hominis* (*C. parvum* H7, *C. parvum* CYDRG 18SB e *C. parvum* CPRM1), de marsupiais (*Cryptosporidium* K1 e *C. parvum* K2), *C. meleagridis*, *C. wairi* e *C. parvum*, se encontram no mesmo clado, sem distinção clara entre elas. Mesma consideração é válida para a distinção entre as espécies de *C. andersoni* e *C. muris* e *C. fragile* (Figura 3).

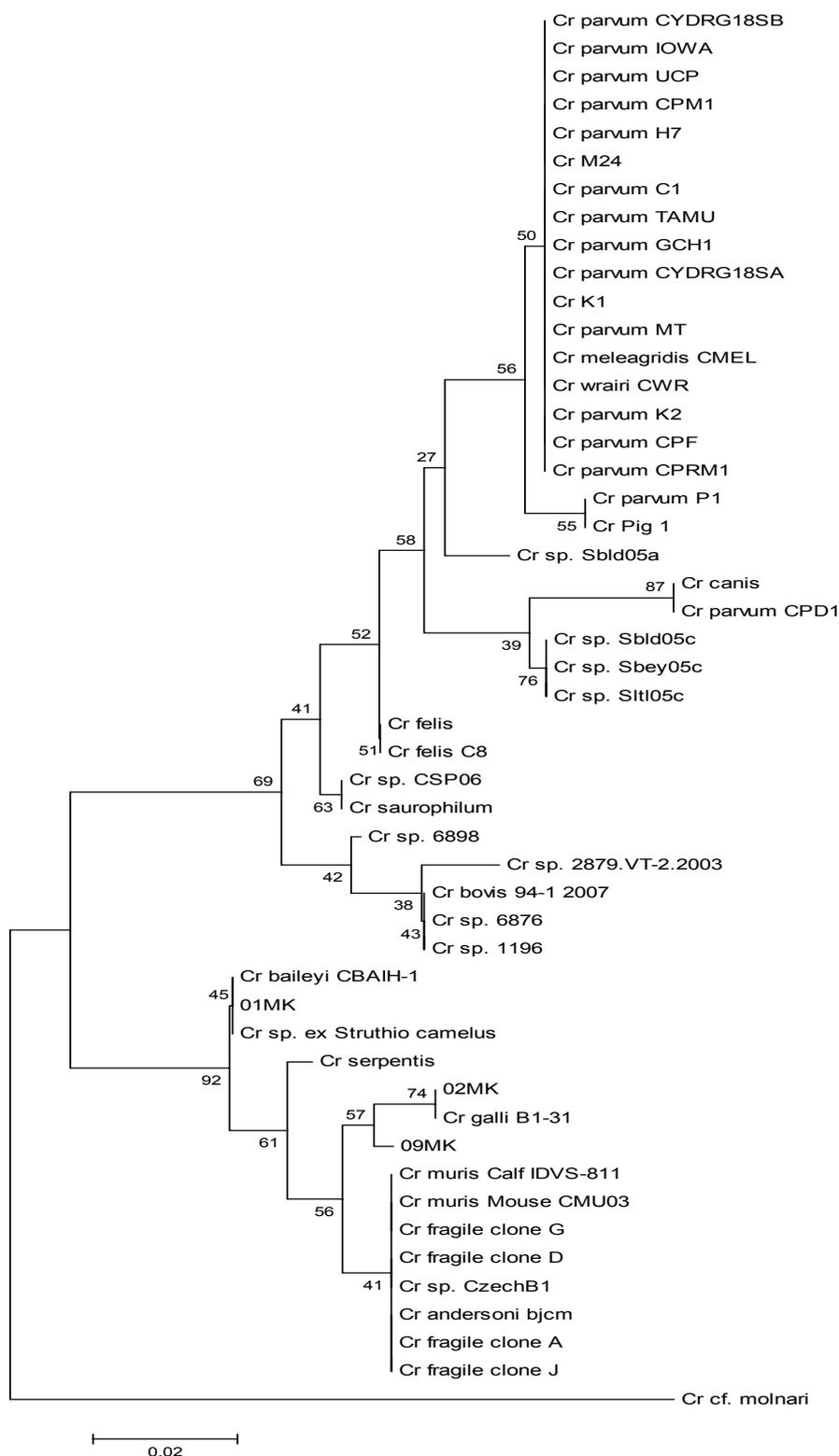


Figura 3- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 50 taxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *p-distance* utilizando 90 nucleotídeos da região polimórfica 2 do gene codificador de 18SrRNA. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

A análise da região das sequências de *Cryptosporidium* denominada de Região 3 demonstra, com bom suporte estatístico, as divergências intra e extra específicas. Além disso, as espécies mais prevalentes em intestino estão separadas das espécies mais prevalentes em estômago nesta análise (Figura 4). Esta região permitiu a diferenciação de genótipos e espécies do gênero *Cryptosporidium* com a mesma eficiência da Região 1. Uma segunda árvore (Figura 5) foi construída a partir dos dados da Região 3, com o intuito de avaliar esta região, mas com o emprego somente de *Cryptosporidium* de mamíferos. Assim, a figura 5 mostra com maior evidência a divergência entre sequências de *C. hominis* com seqüências de *C. parvum*. A diferenciação entre *C. parvum* e *C. hominis* também é identificada na figura 4, mas com um suporte estatístico menor, em virtude da perda de sítios informativos decorrente do alinhamento com seqüências muito divergentes, que ocorrem com os dados do alinhamento dos táxons da figura 4 e que não ocorrem com os dados do alinhamento dos táxons da figura 5.

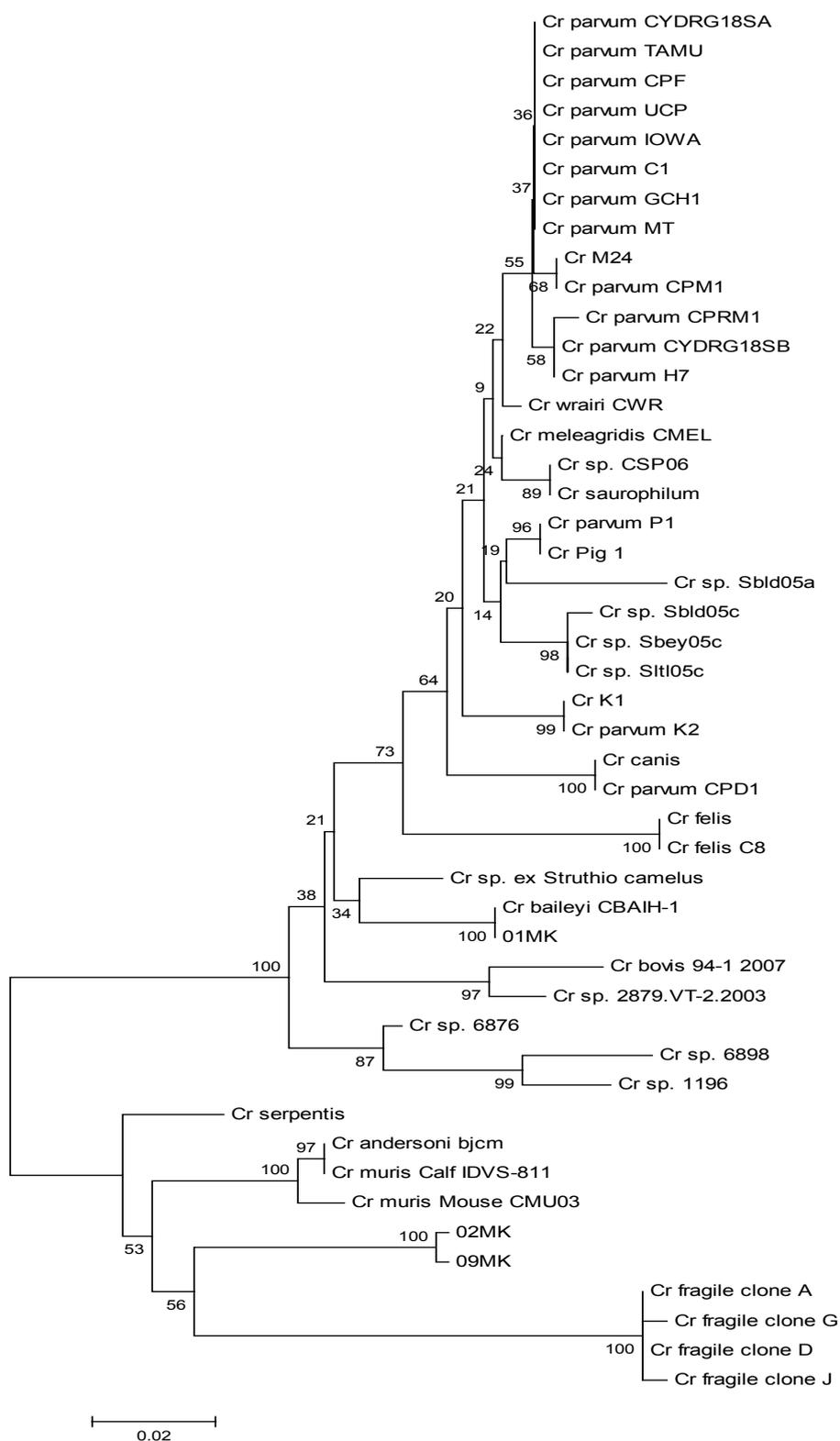


Figura 4- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 47 taxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *p-distance* utilizando 254 nucleotídeos da região polimórfica 3 do gene codificador de 18SrRNA. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

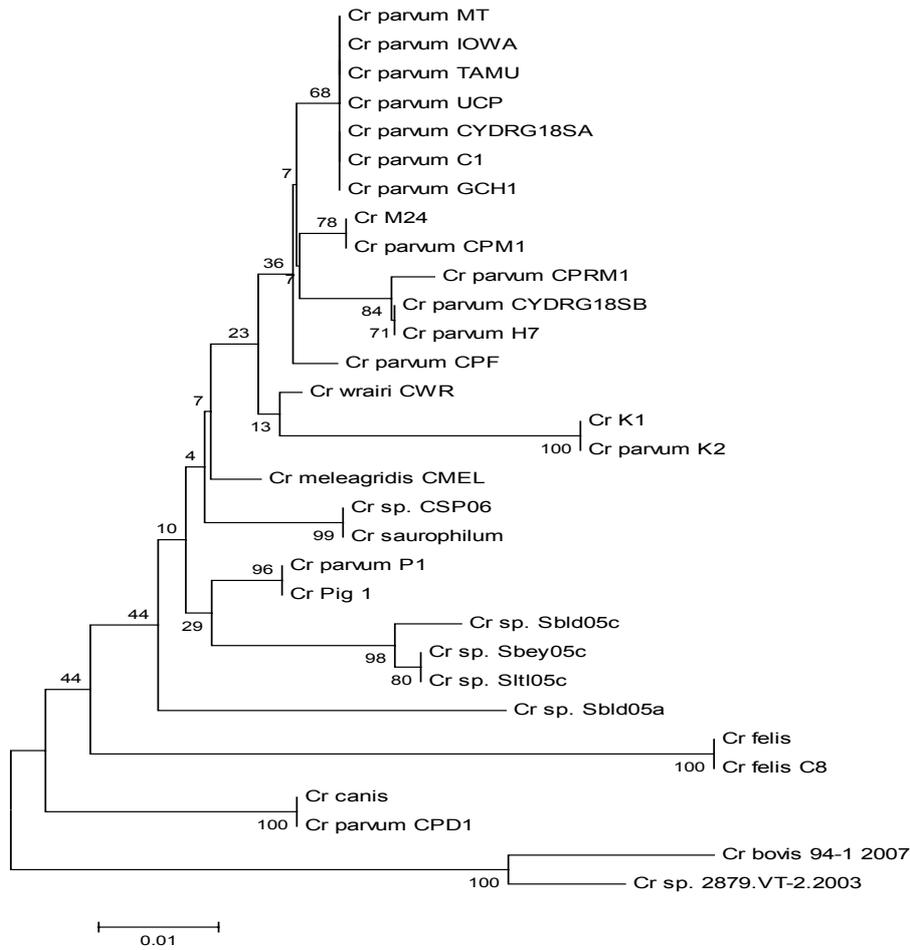


Figura 5- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 31 taxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *p-distance* utilizando 260 nucleotídeos da região polimórfica 3 do gene codificador de 18SrRNA. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

As árvores filogenéticas reconstruídas com as regiões de número 4 e 5 não permitem a diferenciação precisa de amostras de *C. parvum* de *C. hominis*, embora todas as outras espécies e genótipos já estabelecidos são identificados com suporte estatístico significativo (Figuras 6 e 7).

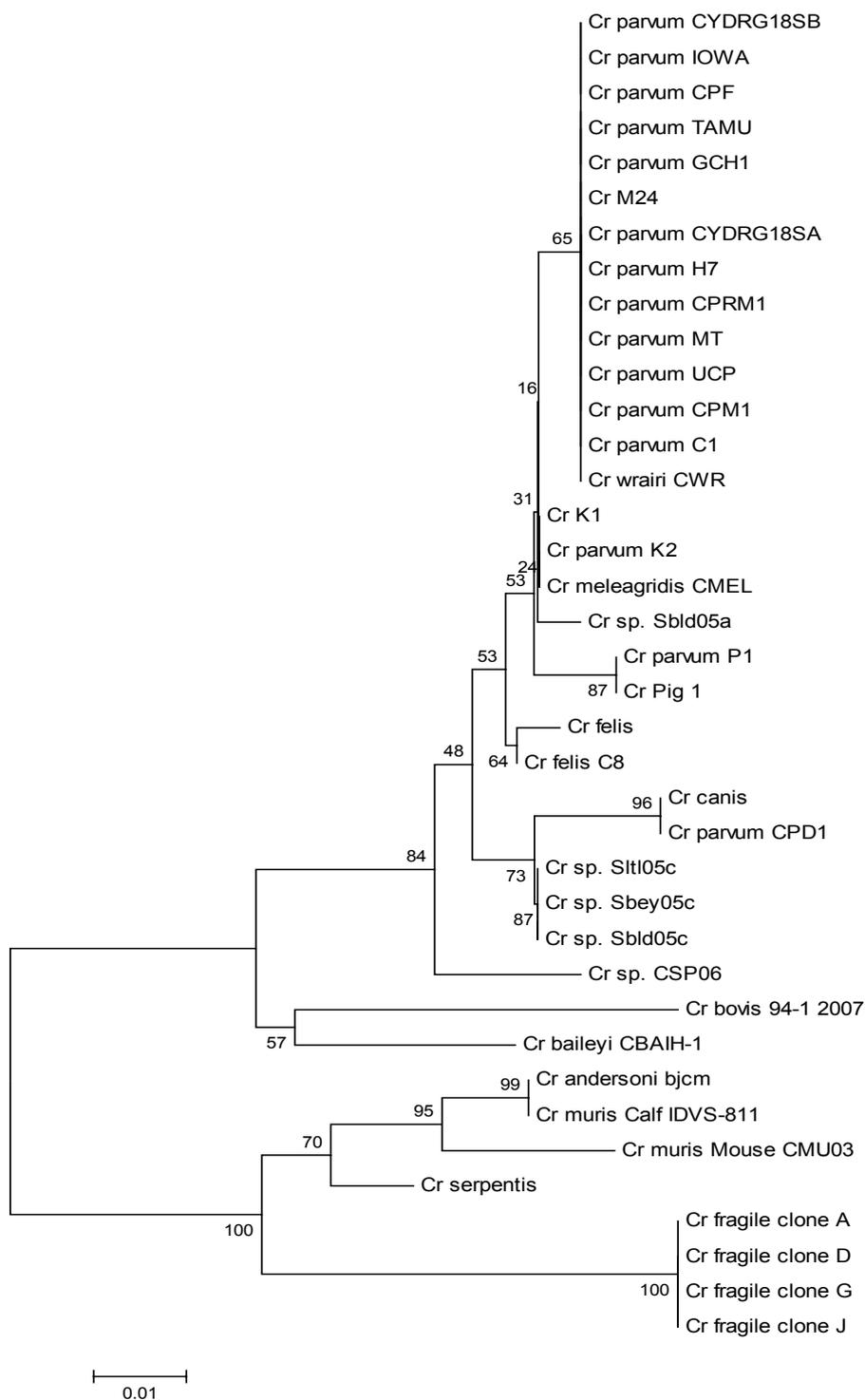


Figura 6- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 38 taxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *p-distance* utilizando 215 nucleotídeos da região polimórfica 4 do gene codificador de 18SrRNA. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

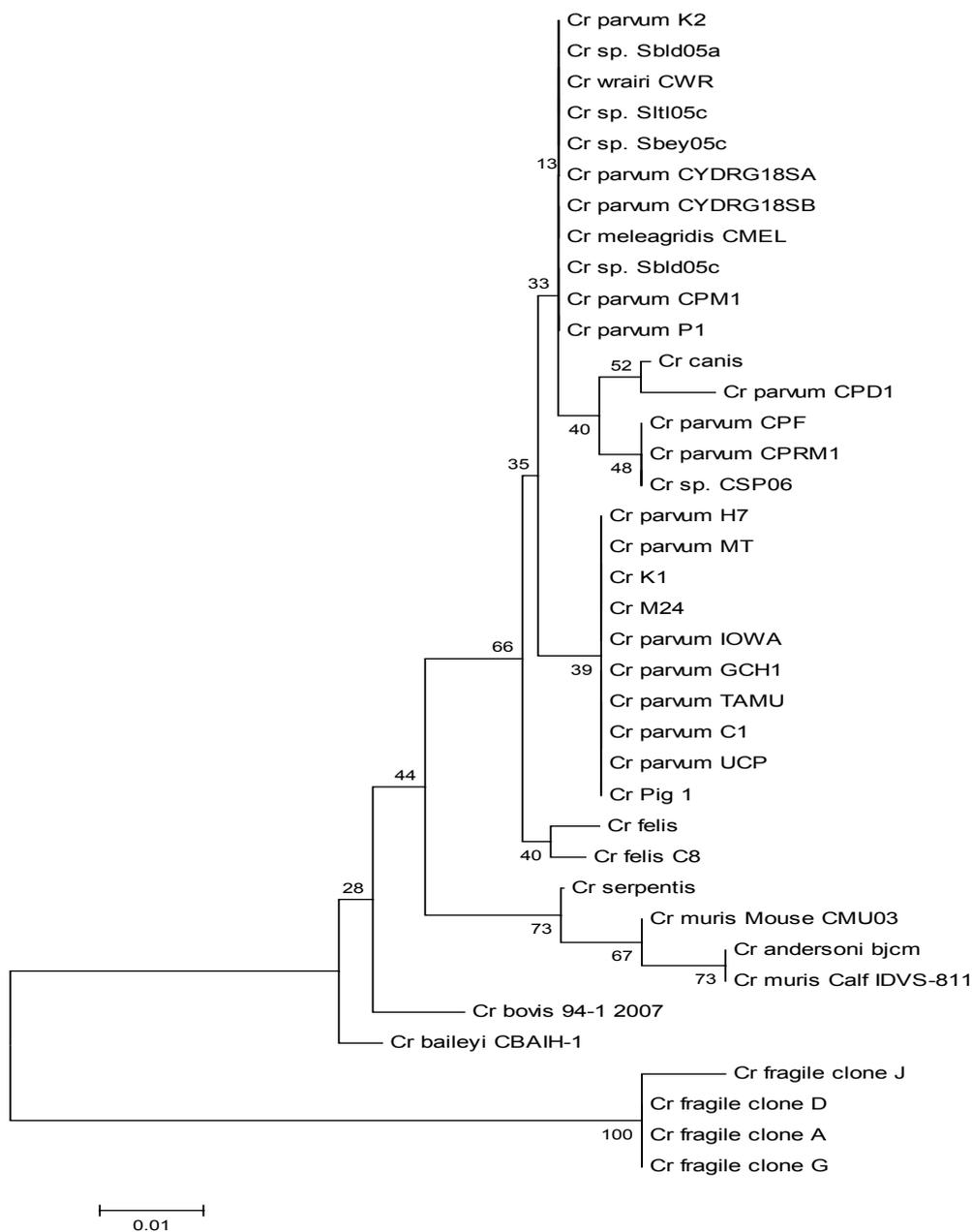


Figura 7- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 38 taxons, inferida por método *Neighbor joining* com teste bootstrap de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *p-distance* utilizando 124 nucleotídeos da região polimórfica 5 do gene codificador de 18SrRNA. Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

4.2 EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS E PCR

Das 474 amostras de aves silvestres, 41 (8,64%) apresentaram-se positivas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* no exame coproparasitológico. As amostras

positivas foram de 25 Curiós (*Oryzoborus angolensis*) 5 picharros (*Saltator similis*), 2 pintassilgos (*Carduelis carduelis*), 4 canários da terra (*Sicalis flaveola*), 1 galo de campina (*Paroaria dominicana*), 1 cigarrinha (*Sporophila schistacea*), 1 maritaca (*Aratinga leucophthalma*), 1 pichochó (*Sporophila Frontalis*) e 1 sabiá laranjeira (*Turdus rufiventris*). Dentre as 41 amostras positivas para a presença de oocistos, somente a de maritaca (*A. leucophthalma*) não foi positiva para a PCR, e das positivas somente 30 foram possíveis de seqüenciar, correspondendo a 6,3% do total de amostras e de cinco espécies da família Fringilidae (100%, 2/2), uma da Cardinalidae (11,1%, 5/45), uma da Emberizidae (9,2%, 26/282) e uma de Turdidae (8,3%, 1/12). Das dez amostras que não foram seqüenciadas, nove são de curiós (*O. angolensis*) e uma de canário (*S. flaveola*).

Dentre os animais domésticos, nove (4,57%) das 197 amostras de bovinos, sendo todos os bezerros, e três (11,11%) das 27 amostras de cães apresentaram-se positivas para *Cryptosporidium* no exame coproparasitológico. Destas amostras positivas, 66,67% (6/9) das amostras de bovinos e todas as amostras de cães apresentaram-se positivas na PCR. Todas as amostras de cães positivas para PCR foram possíveis de serem seqüenciadas, porém das de bovino somente quatro foram seqüenciadas. As amostras de eqüinos, suínos, ovinos, aves e felino não apresentaram positividade no exame coproparasitológico e, por tanto, não foi realizado PCR das mesmas.

Dentre as amostras de sagüis, 13 (9,2%) apresentaram-se positivas no coproparasitológico (havendo detecção de um pequeno número de oocistos) e na PCR, sendo três de sagüis do tufo branco (*Callithrix jacchus*), 8 de sagüis do tufo preto (*C. penicillata*) e 2 de animais híbridos.

Dentre as amostras de oocistos oriundas de humanos, todas foram amplificadas pela PCR e seqüenciadas com sucesso.

4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *CRYPTOSPORIDIUM*

Para todas as amostras de hospedeiros estudadas não houve nenhum genótipo de *Cryptosporidium* diferente dos já encontrados em estudos prévios e nem mesmo alguma espécie nova.

4.3.1 Identificação molecular de amostras de aves

Para análise e diferenciação das sequências de aves, as amostras foram analisadas com reconstruções empregando-se diversos segmentos de 18S, de acordo com a disponibilidade de segmentos homólogos de cada amostra. Além das amostras do presente estudo, foram empregadas também amostras classificadas como *C. galli* e *C. baileyi* e os genótipos I, II, III, e IV, além de outros não classificados e que foram descritos por Ng et al. (2006). As características das amostras resultantes deste estudo estão descritas na tabela 5. Os fragmentos gerados para as amostras da tabela 5 foram mapeados no gene codificador de 18S rRNA e este mapeamento está representado na figura 8.

Foi possível identificar por métodos moleculares, um total de 30 amostras de origem aviária.

Tabela 5- Sequências codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp obtidas de amostras de aves, respectivos hospedeiros em que foram encontradas e suas famílias

Amostra	Hospedeiro	Família	Identificação do <i>Cryptosporidium</i>
01MK ALL	Curió	Emberizidae	<i>C. baileyi</i>
02MK ALL	Picharro	Cardinalidae	<i>C. galli</i>
03MK ALL	Pichochó	Emberizidae	<i>C. baileyi</i>
05MK ALL	Pintassilgo	Fringilidae	<i>C. baileyi</i>
06MK ALL	Picharro	Cardinalidae	<i>C. galli</i>
07MK ALL	Picharro	Cardinalidae	<i>C. galli</i>
08MK ALL	Picharro	Cardinalidae	<i>C. galli</i>
09MK ALL	Canário	Emberizidae	<i>C. galli</i>
10MK ALL	Galo de Campina	Emberizidae	<i>C. baileyi</i>
11MK ALL	Canário	Emberizidae	<i>C. baileyi</i>
13MK ALL	Picharro	Cardinalidae	<i>C. galli</i>
12 S1 S3A	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
12 S3 B	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
18 S3 B	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
19 ALL	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
22 S3 A	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
24 ALL	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
25 S1 S3A	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
25 S3 B	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
27 S3 A	Cigarrinha	Emberizidae	<i>C. galli</i>
28 S3 B	Canário	Emberizidae	<i>C. galli</i>
30 S1	Pintassilgo	Fringilidae	<i>C. galli</i>
31 S1	Sabiá Laranjeira	Turdidae	<i>C. galli</i>
56 S3 B	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
63 ALL	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
64 S1	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
64 S3 B	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
68 ALL	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
69 ALL	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
70 S3 A	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
70 S3 B	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
71 S3 B	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
72 S1	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>
73 S3 B	Curió	Emberizidae	<i>C. galli</i>

Diferentes segmentos do locus 18S rRNA foram obtidos de cada amostra de ave. A notação após o número da amostra deve ser entendida como segue:

Notação	Posição do fragmento em relação ao alinhamento do Anexo A	Região polimórfica a que se refere o fragmento
ALL	259-987	Região 1 parcial, região 2 completa, região 3 completa
S1	259-460	Região 1 parcial, região 2 parcial
S1 S3A	259-702	Região 1 parcial, região 2 completa, região 3 parcial
S3A	458-702	Região 2 parcial, região 3 parcial
S3 B	709-852	Região 3 parcial

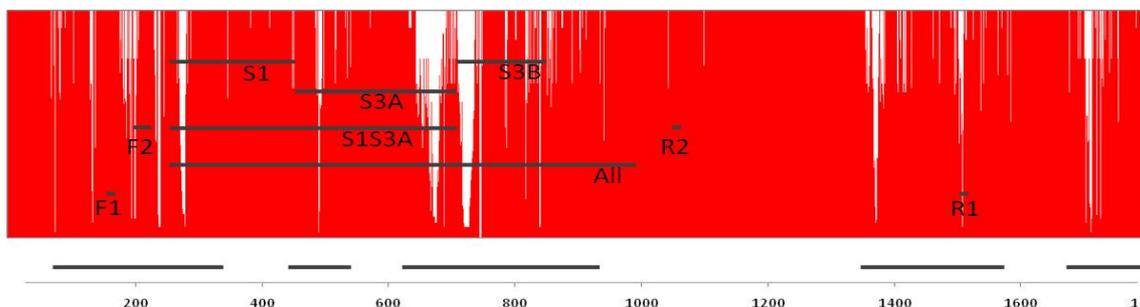


Figura 8- Posição dos *primers* empregados neste estudo e dos fragmentos de 18S rRNA amplificados a partir das amostras de aves no alinhamento geral entre seqüências homólogas de *Cryptosporidium* spp. As barras horizontais acima da régua indicam as regiões polimórficas. As posições dos *primers* F1, F2, R1 e R2 na régua acima são respectivamente, 158 – 177; 196 – 223; 1501 – 1521 e 1048 – 1069

As seqüências de aves foram obtidas com pouca eficiência, de modo que em muitos casos não foi possível seqüenciar por completo o fragmento gerado pelos *primers* F2 e R2. Após a edição das seqüências e o aferimento da qualidade das mesmas com o algoritmo PHRED, foi possível determinar seqüências parciais das diversas amostras de aves.

As reconstruções dispostas nas figuras 9 a 12 foram realizadas de forma a empregar segmentos homólogos de espécies e genótipos aviários, como *C. baileyi*, *C. galli* e os genótipos I, II, III, e IV, além de outros não classificados e que foram descritos por Ng et al. (2006). Estas reconstruções, com diferentes segmentos de 18S rRNA permitiram classificar as amostras de aves da forma em que se informa na tabela 5.

Dentre as amostras de aves nenhuma foi correspondente ao *C. meleagridis*. Todas as amostras de curiós apresentaram-se evolutivamente associadas a *C. galli*, com exceção de uma delas que é semelhante à amostra de *C. baileyi*. Outras amostras de *C. galli* foram aquelas oriundas de Sabiá Laranjeira (*T. rufiventris*) e de Picharro (*S. similis*), duas de canário e uma de Pintassilgo (*C. carduelis*). A outra amostra do pintassilgo (*C. carduelis*) apresentou-se semelhante ao *C. baileyi*, assim como as amostras de Pichochó (*S. frontalis*), Galo da Campina (*P. dominicana*) e dois Canários (*S. flaveola*) (Tabela 4).

As seqüências 18S de genótipos aviários publicadas por outros autores têm sítios disponíveis entre as posições 458 e 852 (usando-se o alinhamento do Anexo A como referência). Porém, muitas das seqüências deste estudo têm resíduos disponíveis fora destes segmentos, em particular na região que contempla o sítio polimórfico 1. Por isso, uma das análises foi realizada utilizando seqüências que possuíssem nucleotídeos homólogos a estes fragmentos. Nesta análise, representada pela árvore da figura 9, fica clara a divergência entre

as seqüências *C. galli* deste estudo e as seqüências de *C. baileyi*. A região analisada mostra também a divergência entre as seqüências de genótipos de pato e ganso em relação a *C. baileyi*. Demonstra-se ainda, a capacidade discriminatória para genótipos aviários das posições localizadas no sítio 1. Vale ressaltar que a maioria das seqüências de genótipos aviários não tem dados para esta região.

A topologia da árvore da figura 9 separa as amostras 06 MK e 08 MK, (identificadas como *C. galli* pelas outras topologias), das outras amostras de *C. galli*. Em todas as análises de genótipos aviários, mostradas pelas figuras 9, 10, 11 e 12, é possível notar sub-estruturação dentro do grupo *C. galli*, com baixos valores de *bootstrap*. Entretanto, ao maximizar o número de nucleotídeos na análise (envolvendo os nucleotídeos da posição 259 a 987), a reconstrução proposta mostra a seqüência 06MK divergindo das demais com um valor de *bootstrap* mais consistente (Figura 13).

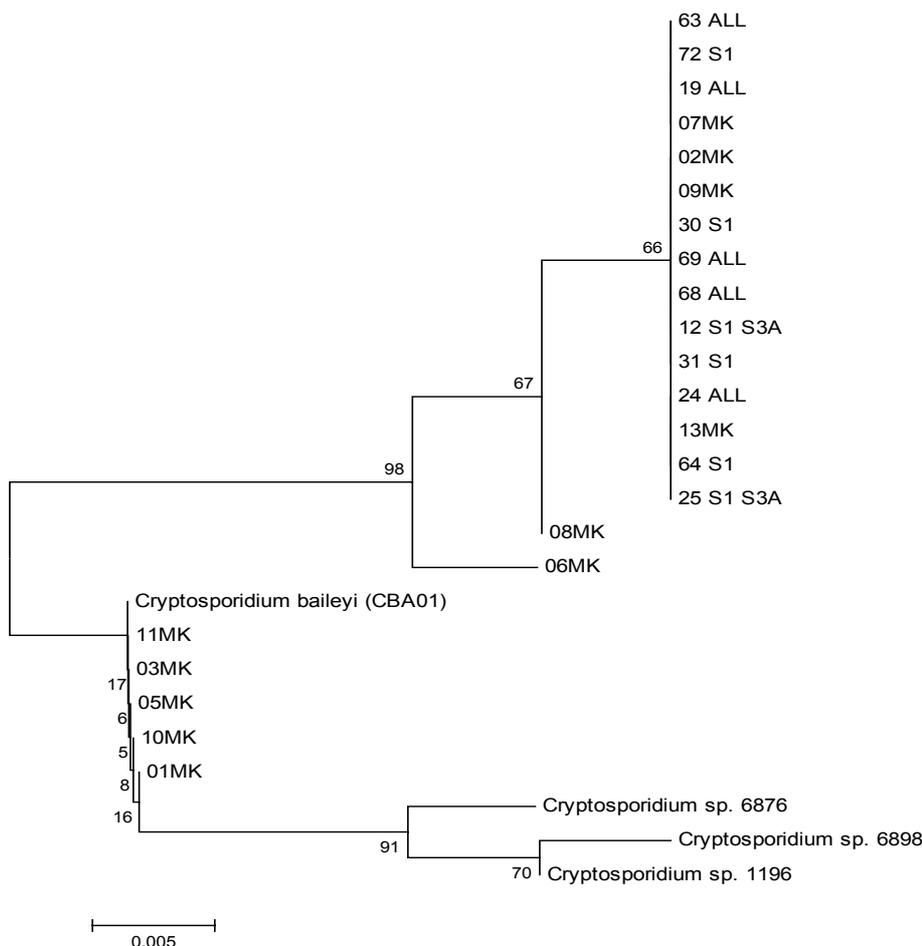


Figura 9- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 26 taxons de origem aviária (gene codificador de 18Sr RNA), inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood* utilizando 194 nucleotídeos (entre as posições 259 e 460 do alinhamento disposto no Anexo). Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

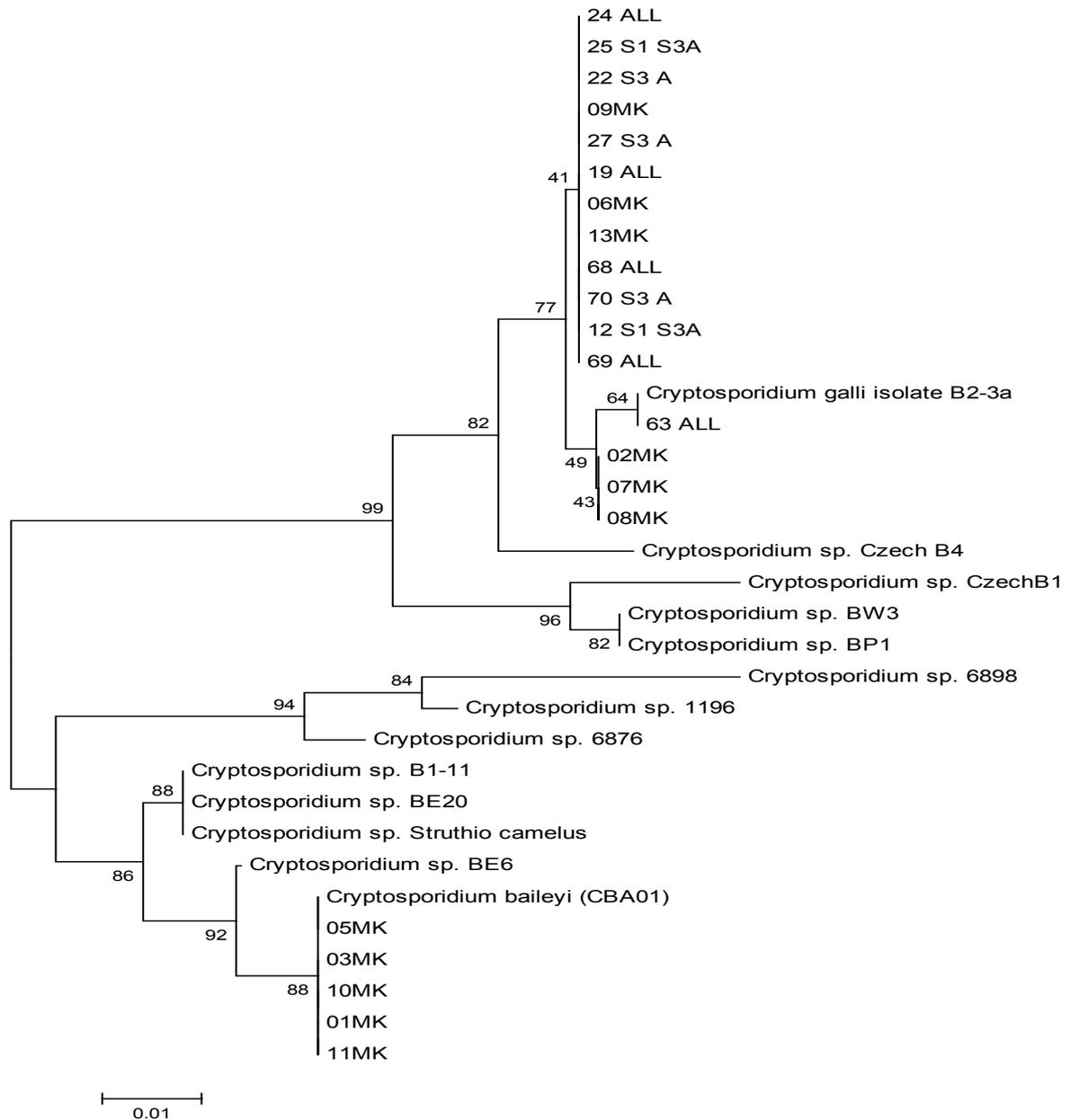


Figura 10- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 34 taxons de origem aviária (gene codificador de 18SrRNA), inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood* utilizando 229 nucleotídeos (entre as posições 458 e 702 do alinhamento disposto no Anexo). Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

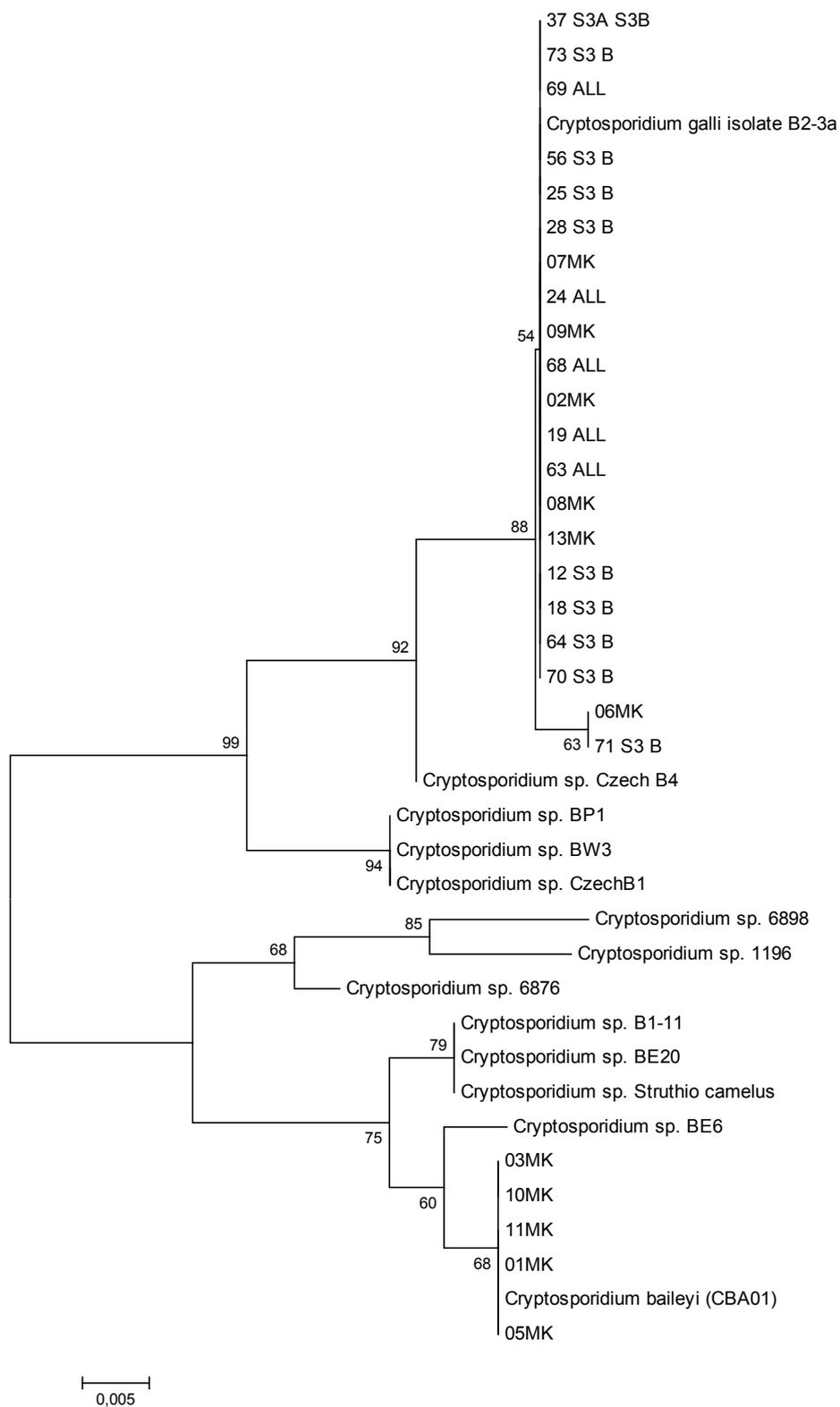


Figura 11- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 39 taxons de origem aviária (gene codificador de 18SrRNA), inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood* utilizando 119 nucleotídeos (entre as posições 709 e 852 do alinhamento disposto no Anexo). Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

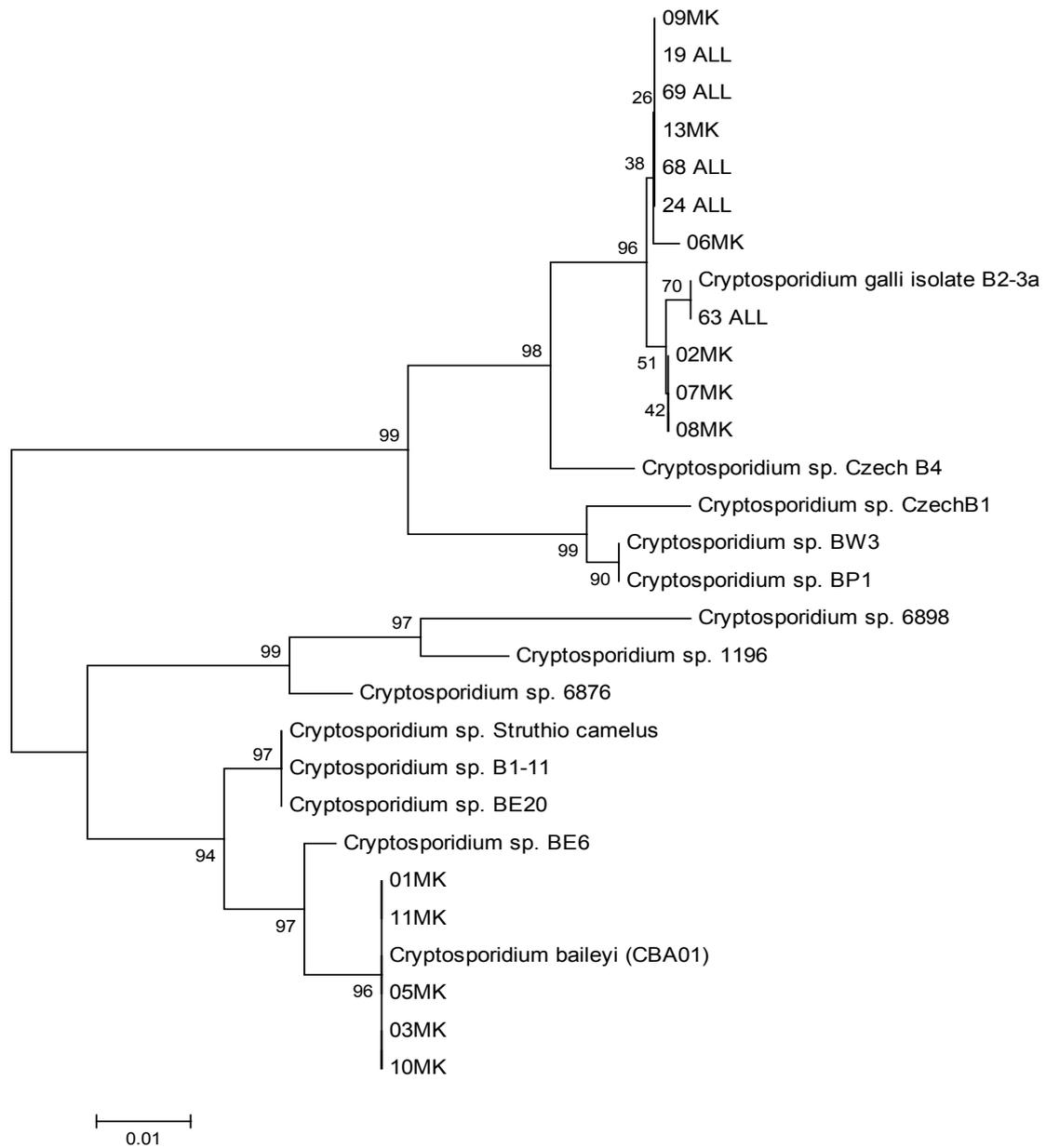


Figura 12- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 29 taxons de origem aviária (gene codificador de 18SrRNA), inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood* utilizando 349 nucleotídeos (entre as posições 458 e 852 do alinhamento disposto no Anexo). Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

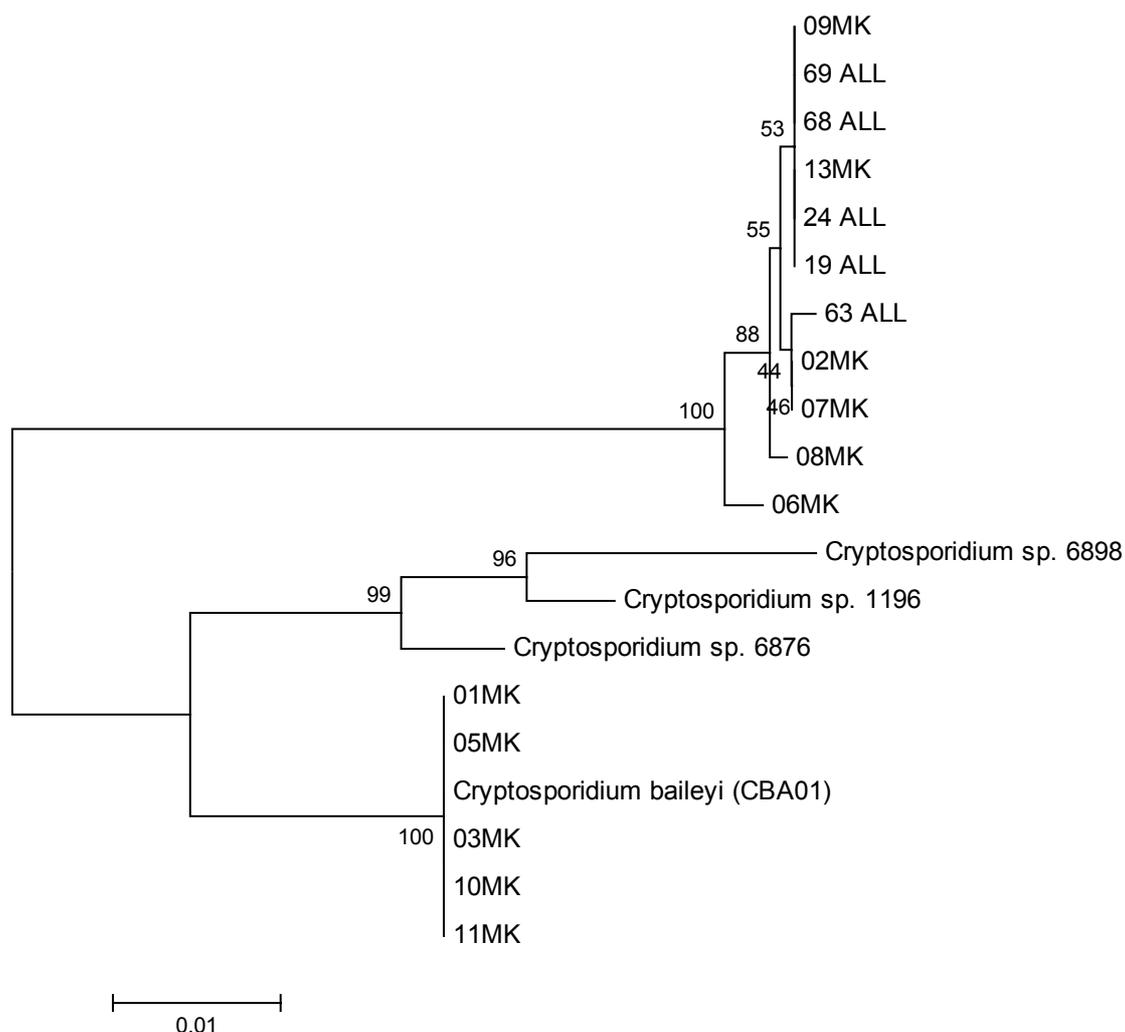


Figura 13- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 20 taxons de origem aviária (gene codificador de 18SrRNA), inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood* utilizando 677 nucleotídeos (entre as posições 259 e 987 do alinhamento disposto no Anexo). Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

4.3.2 Identificação molecular de amostras de mamíferos

As quatro amostras de bovinos apresentaram sequências idênticas ao *Cryptosporidium andersoni*, sendo que todos os animais positivos eram bezerros menores que três meses de idade, e todas as amostras de cães apresentaram-se semelhantes a amostras de *C. canis*. Todas as amostras de sagüis apresentaram-se semelhantes às amostras de *C. parvum*, sendo que dos sagüis de tufo preto (*C. penicillata*) apresentaram maior positividade em relação aos sagüis do tufo branco (*C. jacus*) equivalendo-se à 11,9% (8/67) e 5,88% (3/51), respectivamente. Dentre

as 24 amostras de humanos uma foi semelhante ao *C. canis* (4,16%), três ao *C. parvum* (12,5%), cinco ao *C. felis* (20,83%) e 15 ao *C. hominis* (62,50%). Os resultados das identificações moleculares das amostras de mamíferos encontram-se sumarizados na tabela 6, vale saber que todas as amostras de sagüi foram identificadas como *C. parvum*, porém foram analisadas no presente estudo somente 8. A determinação das identificações obtidas para estas amostras foi feita por comparação com amostras-padrão obtidas no GenBank.

Tabela 6- Sequências codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp obtidas de amostras de mamíferos e respectivos hospedeiros em que foram encontradas

Amostra	Hospedeiro	Identificação ¹	Posição do fragmento no alinhamento do Anexo A
SAG-1	Sagui hibrido	99,86% <i>C. parvum</i>	254 – 988
SAG-2	Sagui do tufo branco	99,86% <i>C. parvum</i>	254 – 988
SAG-3	Sagui do tufo preto	99,86% <i>C. parvum</i>	254 – 988
SAG-4	Sagui do tufo preto	99,86% <i>C. parvum</i>	254 – 988
SAG-5	Sagui do tufo preto	99,86% <i>C. parvum</i>	254 – 988
SAG-6	Sagui do tufo preto	99,86% <i>C. parvum</i>	254 – 988
SAG-7	Sagui do tufo branco	99,71% <i>C. parvum</i>	254 – 988
SAG-8	Sagui do tufo preto	99,86% <i>C. parvum</i>	254 – 988
HER02	Humano	100% <i>C. parvum</i>	254 – 988
HER51	Humano	100% <i>C. parvum</i>	254 – 988
HER83	Humano	100% <i>C. parvum</i>	254 – 988
HER03	Humano	100% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER07B	Humano	100% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER04B	Humano	100% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER01B	Humano	100% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER18	Humano	100% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER04	Humano	100% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER16	Humano	100% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER15	Humano	100% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER33	Humano	100% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER29	Humano	100% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER14	Humano	100% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER32	Humano	100% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER13	Humano	100% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER09B	Humano	99,71% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER03B	Humano	99,71% <i>C. hominis</i>	254 – 988
HER35	Humano	100% <i>C. canis</i>	254 – 988
HER30	Humano	100% <i>C. felis</i>	254 – 988
HER39	Humano	100% <i>C. felis</i>	254 – 988
HER28	Humano	100% <i>C. felis</i>	254 – 988
HER27	Humano	100% <i>C. felis</i>	254 – 988
HER01	Humano	100% <i>C. felis</i>	254 – 988
28B	Bovino	100% <i>C. andersoni</i>	284 - 1017
32	Bovino	100% <i>C. andersoni</i>	256 – 652
36	Bovino	100% <i>C. andersoni</i>	260 - 1015
65B	Bovino	100% <i>C. andersoni</i>	260 – 992
40	Canino	100% <i>C. canis</i>	256 - 1007
41	Canino	100% <i>C. canis</i>	258 - 1017
42	Canino	100% <i>C. canis</i>	260 – 867

¹ As sequências foram comparadas por distância *p* e os valores de similaridades correspondem a comparações com as seguintes sequências: *C. felis* (AF112575), *C. canis* (AB210854), *C. parvum* (L16996), *C. hominis* (AF108865) e *C. andersoni* (AF093496).

A reconstrução filogenética com os dados das seqüências de mamíferos permitiu a realização da inferência representada pela figura 14. Nesta reconstrução nota-se a dicotomia entre os clados formados por seqüências de *C. hominis* e *C. parvum*, e dentro de cada um destes clados, a identificações de possíveis divergências evolutivas. Assim, percebe-se dentro do clado *C. parvum* (valor *bootstrap* = 86) a dicotomia ((SAG-1, SAG-7),(HER02, Cr_parvum_CYDRG18SA)) e dentro do clado *C. hominis* (valor *bootstrap* = 72) a dicotomia (HER09B,(Cr_parvum_H7,(HER03,HER16))).

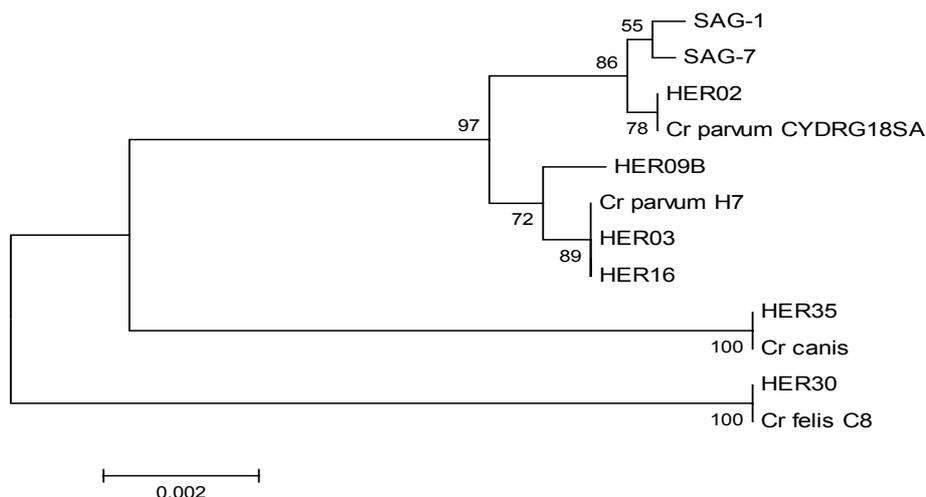


Figura 14- Reconstrução filogenética de *Cryptosporidium* spp. com 12 taxons de mamíferos (gene codificador de 18SrRNA), inferida por método *Neighbor joining* com teste *bootstrap* de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood* utilizando 695 nucleotídeos (entre as posições 259 e 987 do alinhamento disposto no Anexo). Árvore não enraizada construída com auxílio do programa MEGA, versão 4

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com a pesquisa ora realizada serão discutidos em duas partes, sendo a primeira dedicada à identificação de regiões polimórficas e a segunda para a identificação molecular de amostras de *Cryptosporidium* spp. detectadas neste levantamento.

5.1 IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES POLIMÓRFICAS

A análise do polimorfismo do gene codificador da fração 18S do RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp. permitiu identificar cinco regiões hipervariáveis. A seleção destas regiões teve o seguinte critério: procurar por regiões mais curtas possível de forma a permitir o desenho de *primers* que as flanqueiem com vistas a maximizar o desempenho de uma PCR baseada nestes *primers*. A proposta de realizar uma PCR com estas características é justificada pela necessidade de desenvolvimento de uma ferramenta molecular com elevada capacidade de detecção (limiar de detecção). As amostras que contém oocistos de *Cryptosporidium* são notoriamente ricas em inibidores de polimerização, estudos mostram que amostras orgânicas, tais como fezes e solo, podem conter inibidores capazes de reduzir a sensibilidade da PCR em até 1000 vezes (WARD; WANG, 2001). De maneira geral, os efeitos deletérios dos inibidores de polimerização tendem a ser maiores quanto maior o fragmento a ser amplificado (LEWIN, 2001). Neste sentido, procurou-se neste trabalho buscar regiões dentro do locus 18S que contivesse informação suficiente para a discriminação entre os genótipos e espécies de *Cryptosporidium* já conhecidos e ao mesmo tempo permitisse o desenvolvimento de sondas moleculares com potencial para gerar reações moleculares com elevada sensibilidade analítica.

Os *primers* empregados neste estudo são largamente utilizados por diversos outros autores (FAYER et al., 2001; XIAO et al., 2000; MORGAN-RYAN et al., 2002) e estão aptos a amplificar segmentos da molécula codificadora de 18S de virtualmente todos os genótipos e

espécies conhecidos de *Cryptosporidium* spp.. Entretanto, parte expressiva deste segmento é formada por regiões muito conservadas e por isso pouco informativa, do ponto de vista de identificação molecular. Nesse sentido, a busca por regiões de ancoragem de *primers* que permitam a amplificação de fragmentos pequenos, mas com suficiente capacidade de gerar informação útil para a discriminação entre genótipos e espécies no gênero *Cryptosporidium* é muito desejável.

As análises filogenéticas para a avaliação das regiões polimórficas foram realizadas sem o emprego de modelos evolutivos de substituições de nucleotídeos, mas com aplicação de distância *p*. Os objetivos de se reconstruir dendrogramas com base nas regiões polimórficas não foi de resolver questões filogenéticas dentro do gênero *Cryptosporidium*, mas, como colocado acima, de verificar se tais segmentos são discriminatórios para espécies e genótipos já conhecidos.

No caso particular da região 3, foi necessário construir uma árvore com restrição de seqüências. Esta árvore foi construída com o intuito de avaliar a região polimórfica 3, mas com o emprego somente de *Cryptosporidium* de mamíferos. Este procedimento foi adotado porque o alinhamento desta região é menos robusto dado ao elevado número de inserções e deleções e, portanto de exclusão de nucleotídeos informativos. Assim, análises contemplando apenas as seqüências mais estreitamente relacionadas minimizaram o número de inserções e deleções e aumentaram o número de sítios informativos, permitindo uma avaliação com sinal filogenético mais acurado.

Os resultados mostram que, das cinco regiões avaliadas, duas são adequadas para servir de molde para amplificação com vistas a identificação de *Cryptosporidium*, as regiões 1 e 3. Nestas duas regiões, foi possível identificar polimorfismos característicos de determinados táxons e que são responsáveis pelo sinal filogenético que permite a discriminação entre os genótipos/espécies clássicos de *Cryptosporidium* spp.

Os sítios responsáveis pela discriminação entre as diferentes configurações genóticas de *Cryptosporidium* estão localizados em regiões bem definidas e podem configurar-se em assinaturas genéticas, discriminativas para cada espécie ou genótipo. Nesse sentido, duas assinaturas são identificáveis em seqüências 18S, uma localizada na Região polimórfica 1 e outra na Região polimórfica 3. Estas assinaturas, identificadas no Anexo com as inscrições A

e B, constituem discretos eventos de substituições e permitem, por exemplo, a diferenciação entre os estreitamente relacionados táxons *C. hominis* e *C. parvum*.

Há várias espécies de *Cryptosporidium* spp. que foram primeiramente anotadas como *C. parvum*, mas que atualmente já foram reclassificadas como novas espécies, como é o caso de *C. parvum* genótipo suíno (atual *C. suis*) e *C. parvum* genótipo canino (atual *C. canis*). Porém, outros táxons como os genótipos de camundongos, de furões, de marsupiais e de esquilos ainda não tiveram o *status* de espécie definido. Para todos estes táxons, tanto a região 1 quanto a região 3 possuem diversidade suficiente para discriminá-los em clados distintos daquele em que estão posicionados táxons classicamente definidos como *C. parvum*.

Embora a região 1 tenha considerável poder discriminatório, ela permite a distinção entre *C. muris* e *C. andersoni* com apenas uma substituição. Neste caso particular, as regiões 3 e 4 são mais adequadas para a diferenciação entre estas duas espécies, pois nestas regiões *C. muris* e *C. andersoni* tem maior diversidade.

5.2 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *CRYPTOSPORIDIUM* EM AMOSTRAS DE MAMÍFEROS E AVES

O fato de haver resultados negativos de PCR e dificuldade para sequenciamento em amostras que se apresentaram positivas no exame coproparasitológico, como 26,83% (11/41) de aves e 55,55% (5/9) de bovinos pode ter ocorrido devido à baixa quantidade de oocistos e inibidores da PCR em amostras de fezes. Em muitos casos quando há quantidade pequena de oocistos na amostra ou quantidade pequena de DNA amplificada na PCR a banda na eletroforese torna-se fraca e o DNA em quantidade insuficiente para a realização do sequenciamento, particularmente quando o número de pares de bases dos fragmentos amplificados é alto (ROBINSON et al., 2006), como neste estudo. Com efeito, a ocorrência de bandas de muito baixa intensidade foi um evento muito freqüente neste trabalho (dados não apresentados).

No caso particular das amostras de aves, havia o inconveniente de que em muitas ocasiões a quantidade de material fecal disponível era escassa, sendo então, impossível se repetir as reações moleculares.

No presente estudo foram identificadas somente duas das três espécies de *Cryptosporidium* comumente encontradas em aves. A proporção de aves positivas para PCR foi 6,33%, um valor mais alto do que 4,7% avaliado na pesquisa de Simões e colaboradores (SIMÕES et al., 2008). Estes autores encontraram somente *C. galli* em curiós e canários, diferentemente do presente estudo em que as amostras de curiós e canários sequenciadas apresentaram 94,4% e 66,6% respectivamente de *C. galli* e 5,6% e 33,4%, respectivamente de *C. baileyi*.

É importante considerar que o número de indivíduos positivos para *Cryptosporidium* spp. foi alto, e que em estudos prévios já foram avaliadas importantes sintomatologias em algumas aves silvestres. Infecção intestinal por *Cryptosporidium* sp., associada a sinais clínicos, foi encontrada em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), apresentando alta mortalidade em agapornis (*Agapornis canus canus*) (GOODWIN; KABRILL, 1989), demonstrando que aves da família psittacidae são susceptíveis ao parasita. Em pavão azul (*Pavo cristatus*), da família Phasianidae, também já foi encontrado o parasita em um indivíduo de duas semanas de idade que apresentava tosse, espirro e corrimento óculo-nasal (MASON; HARTLEY, 1980). Quando se trata de aves de cativeiro, a presença do parasita torna-se importante uma vez que o contato entre os indivíduos é maior e a transmissão da doença facilitada.

A presença do parasita em aves da família psittacidae, como descrita por Goodwin e Kabrill (1989) não pôde ser demonstrada no presente estudo uma vez que foram avaliadas fezes de 112 amostras de aves desta família e somente uma, a maritaca (0,9%), apresentou-se positiva no exame coproparasitológico e mesmo assim não apresentou-se positiva ao exame de PCR. A presença do *Cryptosporidium* em cinco espécies da família Emberizidae demonstra a susceptibilidade da espécie. A positividade de 100 % dos Pintassilgos, da família Fringilidae, foi alta, porém o número de amostras coletadas e analisadas foi muito baixo. As famílias Turdidae e Cardinalidae também são susceptíveis para o parasita estudado.

A análise conjunta das topologias das árvores reconstruídas com os dados de aves sugere que duas linhagens de *C. galli* possam existir, visto que o clado formado por seqüências relacionadas a *C. galli* apresentam divergências considerável. Entretanto, a confirmação desta hipótese só seria possível com a análise de um segmento maior de 18S, ou com a análise multi-locus. As diferenças entre as amostras de *C. galli* estão mais evidentes quando se analisa a região entre as posições 458 e 852 da seqüência do 18S e também com os dados compreendidos entre as posições 259 e 987.

A presença de *C. parvum* em amostras de sagüis de cativeiro mostra a importância do potencial zoonótico das criptosporidioses uma vez que aquela espécie de *Cryptosporidium* participa, juntamente com *C. hominis*, da maioria dos casos de criptosporidiose em humanos no mundo todo (XIAO, FENG, 2008). Os resultados em tela servem para alertar sobre o risco desta espécie para humanos, já que em determinadas comunidades, sagüis são criados como animais de estimação, em intenso contato com o homem. Neste caso, a rota inversa também deve ser considerada, já que excretas de humanos podem constituir risco de infecção para criatórios desta espécie de primatas não humanos.

A porcentagem de sagüis positivos para *Cryptosporidium* de 9,20% (13/141) neste estudo apresentou-se mais próxima ao valor registrado por Kalishman e colaboradores que estudaram 25 sagüis de cativeiro nos EUA e diagnosticaram 16% de positividade de *Cryptosporidium* spp. em animais menores de um ano e 4% em animais maiores de 1 um ano de idade (KALISHMAN et al., 1996). Diferentemente do estudo realizado no Brasil com nove animais de apreensão em que foi diagnosticado 88,90% de animais positivos para o *Cryptosporidium* spp. (CARVALHO FILHO et al., 2006), sendo importante considerar que os números de indivíduos estudados foram bem menores do que no presente estudo.

Com relação às amostras de humanos, a freqüência de espécies de *Cryptosporidium* spp. encontradas foi similar aquela encontrada em outros países em desenvolvimento. Países em desenvolvimento e industrializados diferem marcadamente em relação à proporção de infecções causadas por espécies zoonóticas de *Cryptosporidium* spp, sendo que os países em desenvolvimento tem uma freqüência significativamente maior de *C. hominis* em relação aos demais (XIAO, FENG, 2008).

Porém, é importante salientar que a fonte de infecção não deve ser inferida apenas a partir da descrição de configurações genóticas do agente, porque é possível que determinados hospedeiros possam albergar, mesmo que transitoriamente, espécies heterólogas de *Cryptosporidium* spp. e assim transmiti-las a outras espécies hospedeiras.

Levantamentos de infecções por *Cryptosporidium* spp. em populações humanas da América do Sul revelam que aquelas causadas por *C. hominis* predominam em relação aquelas causadas por *C. parvum*. No Peru, de 85 amostras estudadas, 67 foram identificadas como *C. hominis*, oito como *C. parvum*, uma como *C. felis* e duas como *C. canis*. Na Venezuela, de 10 isolados, oito foram revelados como *C. hominis*, uma como *C. parvum* e uma como *C. canis* (XIAO, FENG, 2008).

No Nordeste do Brasil, recentes estudos mostram que de 42 isolados de crianças, 24 foram *C. hominis* e 18 *C. parvum* (BUSHEN et al., 2007). Análise multilocus de *Cryptosporidium* spp. associados com diarreia em uma creche em São Paulo revelaram a presença única de *C. hominis* em todas as 29 amostras analisadas (GONÇALVES et al., 2006).

Em pacientes adultos com HIV (n=5) e crianças (n=9) revelou-se a ocorrência de 4 amostras com *C. parvum*, 8 com *C. hominis* e 2 *C. meleagridis* (ARAÚJO et al., 2008). Em pacientes atendidos em hospital de referência na cidade de São Paulo, a maioria das amostras foi identificada como *C. hominis* enquanto genótipos zoonóticos diferentes de *C. parvum* não foram identificados (GONÇALVES, 2007).

Entre as espécies de *Cryptosporidium* spp. menos frequentemente encontradas em humanos (*Cryptosporidium* não-*parvum* e não-*hominis*), três podem ser destacadas, *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis* (XIAO, FENG, 2008). No presente trabalho, *C. meleagridis* não foi encontrado, *C. canis* foi encontrado apenas uma vez e *C. felis* foi encontrado com frequência bastante similar a de *C. parvum*. Estes dados sugerem que em ambientes urbanos no Brasil, a espécie de *Cryptosporidium* adaptada a felinos pode desempenhar um importante papel na epidemiologia da criptosporidiose humana. Para reforçar esta sugestão, Thomas seqüenciou as primeiras amostras de *C. felis* na cidade de São Paulo, avaliando 106 gatos e identificando esta espécie em sete dos 10 positivos para a presença de *Cryptosporidium* spp. (THOMAS, 2006), mostrando que esta espécie do parasito está presente na região

Em relação à topologia da árvore reconstruída com dados de amostras oriundas de humanos e sagüis, nota-se tanto para *C. parvum* identificados em primatas não humanos quanto para *C. hominis* identificados em humanos, duas linhagens para cada espécie. Estas divergências intra-específicas podem de fato constituir diferenças em sub-genótipos que poderiam ser identificadas com o emprego de tipagem com marcadores de taxa evolutiva mais elevada como é o caso do gene codificador de gp60.

A frequência de ocorrência de amostras positivas para cães (11,11%) foi semelhante àquela registrada no estudo de Thomas (2006), com presença de 12,5% (15/120) de positividade nos animais estudados no estado de São Paulo, inclusive encontrou somente *C. canis*, assim como neste estudo. A presença de *C. canis* em cães mostra a possível importância zoonótica da infecção já que esta espécie de parasito pode ser encontrada em humanos e estar associada a infecções com manifestações clínicas importantes para este hospedeiro.

Os resultados dos inquéritos epidemiológicos de criptosporidiose em bovinos são muito variáveis, no entanto é sabido que esta enfermidade determina alta morbidade (FEITOSA et al., 2004).

Ortolani⁷ (1988, Apud FEITOSA et al., 2004 p. 190) demonstrou que *Cryptosporidium* spp. exerce papel de destaque na etiologia da diarréia em rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo. Vale lembrar que, neste caso, as amostras foram coletadas em um local onde os animais são produzidos para subsistência e a coleta de leite gera importante fonte de renda. Foi constatado também que quase metade dos bezerros com idade variando entre sete e 21 dias apresentam oocistos de *Cryptosporidium* sp. em suas fezes (GARBER et al., 1994). Porém, deve-se ressaltar que estes estudos não detalharam quais espécies de *Cryptosporidium* estavam sendo tratadas, pois hoje se diferencia claramente pelo menos três espécies de *Cryptosporidium* que são adaptadas a bovinos, *C. bovis*, *C. andersoni* e *C. parvum*. A de maior importância para sanidade animal sem dúvida trata-se de *C. parvum* visto as duas primeiras serem de patogenicidade reduzida para bovinos.

⁷ ORTOLANI, E. L. **Padronização da técnica de Ziehlneelsen para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*: estudo de alguns aspectos epidemiológicos de criptosporidiose em bezerros de rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo**. 1988. 85f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

Em estudos prévios de prevalência de *Cryptosporidium* em outras localidades no mundo mostram que *C. parvum* e *C. andersoni* foram as duas espécies mais comuns em gado bovino (XIAO; HERD, 1994; WADE et al., 2000; HUETINK et al., 2001; ENEMARK et al., 2002; PENG et al., 2003). Foi realizado um estudo em Maryland, nos Estados Unidos, com 30 vacas desde o nascimento até os dois anos de idade, coletando 990 amostras de fezes em períodos diferentes, encontraram 190 amostras positivas sendo 11,1% de *C. parvum*, 4,5% de *C. bovis*, 3,3% de genótipo do tipo cervo e 0,2% de *C. andersoni* (SANTIN et al., 2008).

A presença maciça do *C. andersoni* nos animais positivos pela PCR e a baixa prevalência do gênero *Cryptosporidium* (4,57%) em bovinos no presente estudo sugere que este hospedeiro deve desempenhar um papel menor na cadeia epidemiológica da criptosporidiose humana nesta região. Vale ressaltar que no presente estudo, quatro amostras de bovinos foram diagnosticadas como *C. andersoni* e as demais (n=5) não foram caracterizadas. Entretanto, os oocistos não caracterizados eram de dimensões compatíveis com aqueles que foram caracterizados molecularmente, sugerindo tratar-se de fato de *C. andersoni* (dados não apresentados).

É conhecido o fato de que o *C. andersoni* é encontrado muito raramente em amostras de origem humana (LEONI et al., 2006). Ainda, ressalta-se a questão de o *C. andersoni* não apresentar riscos relevantes à produção animal, dado que esta espécie foi considerada de baixa patogenicidade tanto para hospedeiros bovinos como não bovinos (ANDERSON, 1991).

Assim, o resultado deste estudo se mostra diferente daqueles de estudos já realizados, que apresentam predominância de *C. parvum* em bovinos. THOMAS avaliou 123 bovinos no estado de São Paulo e encontrou grande maioria de *C. parvum* em 76,2% dos 21 animais positivos para *Cryptosporidium* na PCR, demonstrando inclusive que o *C. andersoni* é mais raro em bovinos, equivalendo-se à 23,8% de suas 21 amostras positivas (THOMAS, 2006). O número de amostras positivas no estudo de Thomas foi maior (17,1%) do que neste estudo, e esta diferença pode ser devida ao fato de que Thomas estudou animais de fazenda leiteira com diferente método de criação e, portanto com condições epidemiológicas diferentes das criações amostradas neste estudo.

6 CONCLUSÕES

1. As regiões polimórficas 1 e 3 da sequência 18S de *Cryptosporidium* spp. permitem discriminar as diferentes espécies neste gênero, podendo ser utilizadas isoladamente como marcadores moleculares para identificação molecular dentro deste gênero.
2. Não foram encontradas espécies de *Cryptosporidium* diferentes daquelas conhecidas até o presente momento nos hospedeiros pesquisados.
3. Saguís (*Chalitrix* spp.) de cativeiro são espécies susceptíveis a infecção por *Cryptosporidium parvum* apresentando-se como um hospedeiro de importância epidemiológica para esta zoonose.
4. Curiós (*Oryzoborus angolensis*) de cativeiro são espécies susceptíveis a infecção por *Cryptosporidium galli* apresentando-se como um hospedeiro de importância epidemiológica para esta espécie de parasita.
5. A presença do parasita em várias espécies da família Emberizidae e nas famílias Turdidae, fringilidae e cardinalidae demonstram que estas são susceptíveis às de *Cryptosporidium* de aves.
6. A não detecção de *Cryptosporidium parvum* em animais domésticos na região de Teodoro Sampaio, estado de São Paulo mostra-se uma condição sanitária favorável, uma vez que este agente é causador de importante zoonose.
7. A presença de espécies de *Cryptosporidium* spp. adaptadas a animais domésticos (como o *C. felis* e o *C. canis*) em humanos na cidade de São Paulo mostra que estes animais podem desempenhar importante papel na cadeia epidemiológica da criptosporidiose humana.

REFERÊNCIAS

- AKIYOSHI, D. E.; DILO, J.; PEARSON, C.; CHAPMAN, S.; TURNWINE, J.; TZIPORI, S. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different hosts. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 1828-1832, 2003.
- ANDERSON, B. C. Prevalence of *Cryptosporidium muris*-like oocysts among cattle populations of the United States: preliminary report. **Journal of Protozoology**, v. 38, p. 14S-15S, 1991.
- ARAÚJO, A. J. U. S.; NAKAMURA, H. Y.; ALMEIDA, M. E.; GOMES, A. H. S.; PINTO, T. H. L.; DA SILVA, A. J. Identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from HIV-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 3, p. 139-143, MaI-Jun, 2008.
- ARGENZIO, R. A.; LECCE, J.; POWELL, D. W. Prostanoides inhibit intestinal NaCl absorption in experimental porcine cryptosporidiosis. **Gastroenterology**, v. 104, p. 440-447, 1993.
- BAXBY, D.; BLUNDELL, N.; HART, C. A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. **The journal of Hygiene Cambridge**, v. 92, p. 317-323, 1984.
- BERMUDEZ, A. J.; LEY, D. H.; LEVY, M. G.; BARNES, H. J.; GERIG, T. M. Experimental cryptosporidiosis in turkey poults. In: Proc. MEETING AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 124., 1987, Chicago, **Anais...**, p. 133.
- BLACK, E. K.; FINCH, G. R.; TAGHIKILANI, R.; BELOSEVIC, M. Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, p. 187-189, 1996.
- BONNIN, A. M.; FOURMAUX, M. N.; DUBREMETZ, J. F. Genotyping human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a repetitive DNA sequence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 137, p. 207-211, 1996.
- BORNAY-LLINARES, F. J.; DA SILVA, A. J.; MOURA, I. N. S.; MYJAK, P.; PIETKIEWICZ, H.; KRUMINIS-LOZOWSKA, W.; GRACZYK, T. K.; PIENIAZEK, N. J. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1455-1458, 1999.
- BUSHEN, O. Y.; KOHLI, A.; PINKERTON, R. C. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 378-384, 2007.

CACCIO, S.; HOMAN, W.; VAN DIJK, K.; POZIO, E. 1999. Genetic polymorphism at the beta-tubulin locus among human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 173-179, 1999.

CAMA, V. A.; ROSS, J. M.; CRAWFORD, S.; KAWAI, V.; CHAVEZ-VALDEZ, R.; VARGAS, D. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, p. 684-691, 2007.

CAPUANO, D. M.; OKINO, M. H. T.; BETTINI, M. J. C. B. Frequência de *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli* em pacientes soropositivos para o HIV na região de Ribeirão Preto, SP. Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 1, p. 11-15, 2001.

CARVALHO-FILHO, P. R.; CARDOZO, S. V.; RIBEIRO, C. T.; MEDEIROS, S. M.; LOPES, C. W. G. Intestinal protozoa in apprehended New World nonhuman primates. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 354-361, 2006.

CHAN, R.; CHEN, J.; YORK, M. K.; SETIJONO, N.; KAPLAN, R. L.; GRAHAM, F.; TANOWITZ, H. B. Evaluation of a combination rapid immunoassay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 393-394, 2000.

CHERMETTE, R.; BOUFASSA-OUZROUT, S. Cryptosporidiosis a cosmopolitan disease in animal and in man. 2ed. Paris: OIE, 1988, p. 122.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B.; LEWI, D. S. Prevalence of Intestinal Parasitic Infections in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 203-206, 1999.

CRT - Centro de Referência e Treinamento 1997. **Doenças Sexualmente Transmissíveis/Aids (CRT-DST/AIDS)**. São Paulo: CRT, 1997.

CURRENT, W. L. *Cryptosporidium* species. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and wild animal medicine current therapy**. 4. ed. Philadelphia, Pensilvânia: W. B. Saunders Company, 1999 p. 121-131.

CURRENT, W. L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. Cryptosporidiosis of man and animals. Boston: CRC Press, 1990. 199 p.

CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; HAYNES, T. B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. **The Journal of Protozoology**, v. 33, p. 289-296, 1986.

CURRENT, W. L.; LONG, P. L. Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. **The Journal of Infectious Diseases** v. 148, p. 1108-1113, 1983.

DA SILVA, A. J.; CACCIO, S.; WILLIAMS, C.; WON, K. Y.; NACE, E. K.; WHITTIER, C.; PIENIAZEK, N. J.; EBERHARD, M. L. Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 297–307, 2003.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boston: CRC Press, 1990. 199 p.

EBEID, M.; MATHIS, A.; POSPISCHIL, A.; DEPLAZES, P. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* genotype I in conventionally reared piglets and lambs. **Parasitology Research**, n. 90, p. 232-235, 2003.

ENEMARK, H. L.; AHRENS, P.; BILLE-HANSEN, V.; HEEGAARD, P. M.; VIGRE, H.; THAMSBORG, S. M.; LIND, P. *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the 'porcine' genotype. **Parasitology**, v. 126, p. 407-416, 2003.

ENEMARK, H. L.; AHRENS, P.; LOWERY, C.; THAMSBORG, S. M.; ENEMARK, J. M. D.; BILLE-HANSEN, V.; LIND, P. *Cryptosporidium andersoni* from a danish cattle HERD: identification and preliminary characterization. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 37-49, 2002.

FARIAS, E. W. C.; GAMBA, R. C.; PELLIZARI, V. H. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of Sao Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 41-43, 2002.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite (Review). **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 37-56, 2004.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and Identification. **International Journal of Parasitology**, n. 30, p. 1305-22, 2000.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; GREINER, E., Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2 year-old dairy cattle in the eastern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 105-112, 2006.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). **The Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 624-629, 2005.

FAYER, R.; SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. The general biology of *Cryptosporidium*. In: FAYER, R. **Cryptosporidium and Cryptosporidiosis**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 1-242.

FAYER, R.; TROUT, J. M.; JENKINS, M. C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 1165-1169, 1998.

FAYER, R.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LAI, A. A.; DUBEY, J. P.. *Cryptosporidium canis* sp. from domestic dogs. **The Journal of Parasitology**, v. 87, p. 1415–1422, 2001.

FAYER, R.; UNGAR, B. L. P. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. **Microbiological Reviews**, v. 50, p. 458-483, 1986.

FEITOSA, F. L. F.; SHIMAMURA, G. M.; ROBERTO, T.; MEIRELES, M. V.; NUNES, C. M.; CIARLINI, P. C.; BORGES, A. S. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 34, n. 1, p. 189-193, jan-fev, 2004.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 109-111, 2001.

FUNADA, M. R.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M. GENNARI, S. M. Frequencia de ocorrência de parasitos gastrointestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2006, Riberão Preto-SP. **Anais...** Riberão Preto, 2006. p. 388

GARBER, L. P.; SALMAN, M. D.; HURD, H. S.; KEEFE, T.; SCHATER, J. L. Potential risk factor for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 205, n. 1, p. 86-91, 1994.

GARCIA, L. S.; SHIMIZU, R. Y. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1267-1268, 2000.

GATEI, W.; ASHFORD, R. W.; BEECHING, N. J.; KAMWATI, S. K.; GREENSILL, J.; HART, C. A. *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya. **Emerging of Infectious Disiases**, v. 8, p. 204-206, 2002.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 2, p. 87-91, 1999.

GIANGASPERO, A.; BERRILLI, F.; BRANDONISIO, O. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1169-1182, 2007.

GIBBONS, C. L.; RIGI, F. M.; AWAD-EL-KARIEM, F. M. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* oocysts in spiked backwash water using three PCR-based protocols. **Protist**, v. 149, p. 127-134, 1998.

GILES, M.; WEBSTER, K. A.; MARSHALL, J. A.; CATCHPOLE, J.; GODDARD, T. M. Experimental infection of a lamb with *Cryptosporidium parvum* genotype 1. **The veterinary Record**, v. 149, p. 523-525, 2001.

- GOLÇALVES, E. M. N.; DA SILVA, A. J.; EDUARDO, M. B. P.; UEMURA, I. H.; MOURA, I. N. S.; CASTILHO, V. L. P.; CORBETT, C. E. P. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a Day care unit in São Paulo. **Clinics**, v. 61, n. 2, p. 119-126, Abr. 2006.
- GOODWIN, M. A.; KRABILL, U. A. Diarrhea associated with with small-intestinal cryptosporidiosis in a budgerigar and in a cockatiel. **Avian Diseases**, v. 33, p. 829-833, 1989
- GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R. *Cryptosporidium serpentis* and microsporidian spores in feces of captive snakes. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 413-414, 2000.
- GUERRANT, D. I.; MOORE, S. R.; LIMA, A. A.; PATRICK, P. D.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four—seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 707-713, 1999.
- HALL, T. A. Bioedit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for window 95/98 NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 81-84, 2003.
- HELLER, L.; BASTOS, R. R. X.; VIEIRA, M. B. C. M.; BEVILACQUA, P. D.; BRITO, L. L. A.; MOTA, S. M. M.; OLIVEIRA, A. A.; MACHADO, P. M.; SALVADOR, D. P.; CARDOSO, A. B. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 13, n. 2, p. 79-92, 2004.
- HENRICKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 22, p. 594-596, 1981.
- HUBER, F.; BONFIM, T. C. B.; GOMES, R. S. Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the west zone of the Municipality of the Rio de Janeiro. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 69-72, 2005.
- HUETINK, R. E. C.; VAN DER GIESSEN, J. W. B.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; PLOEGER, H. W. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 53-67, 2001.
- KALISHMAN, J.; PAUL-MURPHY, J.; SCHEFFLER, J.; THOMSON, J. A. Survey of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in a captive population of common marmosets. **Laboratory Animal Science**, v. 46, n. 1, p. 116-119, 1996.
- KARANIS, P.; KOURENTI, K.; SMITH, H. V. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, v. 5, p. 1-38, 2007.
- KORISH, D. G.; MEAD, J. R.; MADORE, M. S. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1423-1428, 1990.
- KOUDELA, B.; MODRY, D.; VITOVEC, J. Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 76, p. 181-188, 1998.

LANGONI, H.; LINHARES, A. C.; DE AVILA, F. A.; DA SILVA, A. V.; ELIAS, A. D. Contribution to the study of diarrhoea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brasil. **Brasilian Journal of Research and Animal Science**, v. 41, p. 313-319, 2004.

LEONI, F., AMAR, C.; NICHOLS, G.; PEDRAZA-DIAZ, S.; MCLAUCHLIN, J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. **Jouranal of Medical microbiology**, v. 55, p. 703–707, 2006.

LEWIN, B. **Genes VII – Tratado de genética molecular**. Porto Alegre, Artes Médicas, 2001. 960 p.

LIMA, A. A.; MOORE, S. R.; BARBOZA J.; SOARES, R. M. S.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; NATARO, J. P.; FEDORKO, D. P.; WUHIB, T.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases** v. 181, p. 1643-1651, 2000.

LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; OWENS, D. S.; MORGAN, U. M.; MEAD, J. R.; BLAGBURN, B. L. *Cryptosporidium andersoni* sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, n. 47, p. 91-95, 2000.

LINDSAY, D.; BLAGBURN, B. Cryptosporidiosis in birds, p. 133–148. In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. (Ed.), **Cryptosporidiosis in man and animals**. CRC Press, Inc., 1990.

LLORENTE, M. T.; CLAVEL, A.; GOÑI, M. P.; VAREA, M.; SERAL, C.; BECERRIL, R.; SUAREZ, L.; GOMEZ-LUS, R. Genetic characterization species from humans in Spain. **Parasitology International**, v. 56, p. 201-205, 2007.

MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhoea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 147, p. 824-828, 1983.

MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted throughout the public water supply. **New England Journal of Medicine**, v. 331, p. 161-167, 1994.

MAZON, R. W.; HARTLEY, W. J. Respiratory cryptosporidiosis in a peacock chick. **Avian Diseases**, v. 24, p. 771-776, 1980.

MCDONALD, V. Parasites in gastrointestinal tract. **Parasite Immunology**, v. 25, p. 231-234, 2003.

MORGAN, U. M.; MONIS, P. T.; FAYER, R.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R. C. A. Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium*: evidence for several new species. **Journal Parasitology**, v. 85, p. 1126-1133, 1999.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; HILL, B. D.; O'DONOGHUE, P.; LIMOR, J.; LAL, A.; THOMPSON, R. C. Detection of the *Cryptosporidium parvum* 'human' genotype in a dugong (*Dugong dugon*). **The Journal of Parasitology**, v. 86, p. 1352-1354, 2000c.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; LIMOR, J.; GELIS, S.; RAIDAL, S. R.; FAYER, R.; LAL, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. S.. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-neck parrot (*Psittacula krameri*). **Australian Veterinary Brazilian**, v. 78, p. 182-183, 2000a.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; MONIS, P.; SULAIMAN, I.; PAVLASEK, I.; BLAGBURN, B.; OLSON, M.; UPTON, S. J.; KHRAMTSOV, N. V.; LAL, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. **Parasitology**, v. 120, p. 457-464, 2000b.

MORGAN-RYAN, U. M.; FALL, A.; WARD, L. A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 49, p. 433-440, 2002.

NAKAMURA, A. A. **Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em aves domésticas e em aves exóticas mantidas em cativeiro no Brasil.** 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo 2008.

NAVARRO, I. T.; KANO, F. S.; OGAWA, L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em cães com diarreia atendidos no hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR, **Brasil Semina**, v. 18, p. 23-25, 1997.

NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7548-7553, Dez, 2006.

NIME, F. A.; BURIK, J. D.; PAGE, D. L.; HOLSCHER, M. A.; YARDLEY, J. H.. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v. 70, p. 592-598, 1976.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. Int. **The Journal of Parasitology**, v. 25, p. 139-195, 1995.

OGASSAWARA, S.; BENASSI, S. Experimental infection of cats through parasitic bovine heart with Sarcocystis spp.. **Arquivos do Instituto Biológico - São Paulo**, v. 47, p. 27-32, 1980.

OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; THOMPSON, R. C. A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 185-191, 2004a.

ORTOLANI, E. L. **Padronização da técnica de Ziehl-Neelsen para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*: estudo de alguns aspectos epidemiológicos de criptosporidiose em bezerros de rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo.** 1988. 85f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

OSHIRO, E. T.; DORVAL, M. E. C.; NUNES, V. L. B.; SILVA, M. A. A.; SAID, L. A. M. Prevalência do *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de cinco anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 277-280, mai-jun, 2000.

PAVLA'SEK, I. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. **Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékarství**, v. 3, p. 290-301, 1991.

PENG, M. M.; WILSON, M. L.; HOLLAND, R. E.; MESHNICK, S. R.; LAL, A. A.; XIAO, L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. **Parasitology Research**, v. 90, p. 175-180, 2003.

POHJOLA, S.; JOKIPII, L.; JOKIPII, A. M. M. Dimethylsulphoxide-Ziehl-Neelsen staining technique for the detection of cryptosporidial oocysts. **The veterinary Record**, v. 115, p. 442-443, 1984.

POHJOLA, S.; NEUVONEN, E.; NISKANEN, A.; RANTAMA, A. Rapid immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* oocysts. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 27, p. 71-79, 1986.

RAGOZO, A. M. A.; MURADIAN, V.; RAMOS E SILVA, J. C.; CARAVIERI, R.; AMAJONER, V. R.; MAGNABOSCO, C.; GENNARI, S. M. Ocorrência de parasitos gastrointestinais em fezes de cães e gatos das cidades de São Paulo e Guarulhos. **Braslian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 244-246, 2002.

ROBINSON, G.; THOMAS, A. L.; DANIEL, R. G.; HADFIELD, S. J.; ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. Sample prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium andersoni* within a dairy herd in the United Kingdom. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 163-167, 2006.

RYAN, U. M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, I. M.; MONIS, P.; LAL, A. A.; FAYER, R.; PAVLA'SEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. **The Journal of Parasitology**, v. 89, p. 809-813, 2003.

SANTIN, M.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; ZHOUL, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 103-117, 2004

SANTIN, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 15-23, 2008.

SARGENT, K. D.; MORGAN, U. M.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. A. Morphological and genetic characterization of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 221-227, 1998.

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. A. B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as felborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 29-40, 2007.

- SMITH, H. V.; ROSE, J. B.; Waterborne cryptosporidiosis: CURRENT status. **Parasitology Today**, v. 14, p. 14-22, 1998.
- SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; MCLAUCHLIN, J.; CASEMORE, D. P.; CRISANTI, A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **Microbiology Letters**, v. 150, p. 209-217, 1997.
- SRÉTER, T.; HORNOK, S.; VARGA, I.; BÉKÉSI, L.; SZÉLL, Z. Attempts to immunize chickens against *Cryptosporidium baileyi* with *C. parvum* oocysts and Paracox vaccine. **Folia Parasitology**, v. 44, p. 77-80, 1997.
- SRÉTER, T.; KOVÁCS, G.; DA SILVA, A. D.; PIENIAZEK, N. J.; SZÉLL, Z.; DOBOS-KOVÁCS, M.; MÁRIALIGETI, K.; VORGA, I. Morphologic, culture, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate, submitted. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 735-738, 2000a.
- SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds – a review. **Veterinary Parasitology**, v. 87, p. 261-279, 2000.
- SRÉTER, T.; VARGA, I.; BÉKÉSI, L. Age-dependent resistance to *Cryptosporidium baileyi* in chickens. **The Journal of Parasitology**, v. 81, p. 827-829, 1995.
- STIBBS, H. H.; ONGERTH, J. E. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, p. 517-521, 1986.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEY, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA)**. Versão 4.0, Molecular Biology and Evolution, 24: 1596-1599 [WWW.megasoftware.net]. 2007.
- THOMAS, A. **Caracterização genotípica de *Cryptosporidium* spp. isolados de amostras fecais de felinos, caninos e bovinos no Estado de São Paulo**. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEONMOUGIN, F., HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.
- THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; WATT, P. M.; ENRIQUEZ, R.; GORTARES MOROYOQUI, P.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 378-382, 2002.
- TILLEY, M.; UPTON, S. J. Sporozoites and merozoites of *Cryptosporidium parvum* share a common epitope recognized by a monoclonal antibody and two-dimensional electrophoresis. **Journal of Protozoology**, v. 38, p. 48S - 49S, 1991.
- TRAUB, R. J. The veterinary public health significance of Giardia and *Cryptosporidium*: Getting things in perspective. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 309-310, 2008.

TZIPORI, S.; CAMPBELL, I. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, p. 455-456, 1981.

UNGAR, B. L. P. Cryptosporidiosis in humans (*Homo sapiens*). In: DUBEY JP, Speer CA, FAYER R. (Ed). **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p. 59-82.

WADE, S. E.; MOHAMMED, H. O.; SCHAAF, S. L. Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy HERDs in five counties of southeastern New York. **Veterinary Parasitology**, v. 93, p. 1–11, 2000.

WARD, L. A.; WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious disease**, v. 41, p. 37-42, 2001.

WIDMER, G. Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*. **Advances in Parasitology**, v. 40, p. 223-239, 1998.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A. A.; MONTALI, R. J.; FAYER, R.; LAL, A. A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small subunit ribosomal RNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1578-1583, 1999.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1239-1255, 2008,

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1. p. 72-97, 2004.

XIAO, L.; HERD, R. Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. **Veterinary Parasitology**. v. 55, p. 257-262, 1994.

XIAO, L.; HERD, R. P.; RINGS, D. M. Diagnosis of *Cryptosporidium* on a sheep farm with neonatal diarrhea by immunofluorescence assays. **Veterinary Parasitology**, v. 47, p. 17-23, 1993.

XIAO, L.; LIMOR, J.; MORGAN, U. M.; SULAIMAN, I. M.; THOMPSON, R. C.; LAL. A. A. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5499-5502, 2000.

XIAO, L.; SULAIMAN, I. M.; RYAN, U. M.; ZHOU, L.; ATWILL, E. R.; TISCHLER, M. L.; ZHANG, X.; FAYER, R.; LAL, A. A. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. Int. **The Journal of Parasitology**, v. 32, p. 1773-1785, 2002.

YASON, J. A.; RIVERA, W. L. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. **Parasitology Research**, v. 101, p. 681-687, 2007.

ZHA, H. B.; JIANG, J. S. Life cycle of *Cryptosporidium meleagridis* in quails. **Acta Veterinary and Zootecnia Sinica**, v. 25, p. 273-278, 1994.

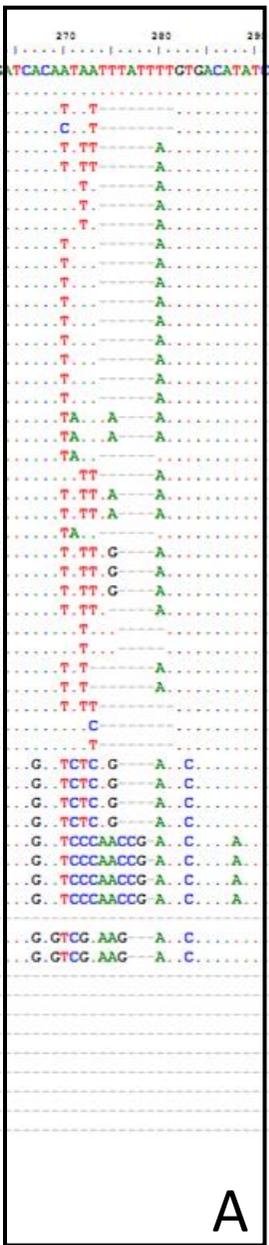
ZHOU, L.; FAYER, R.; TROUT, J. M.; RYAN, U. M.; SCHAEFER, F. W.; XIAO, L. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p.7574-7577, 2004a.

ANEXO A

Alinhamento múltiplo entre seqüências codificadoras da fração 18S do RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp. A: assinatura genética contendo substituições discriminatórias entre as espécies *C. hominis* e *C. parvum*, localizada na região polimórfica 1. Não há dados homólogos a esta região disponíveis em bancos de dados para seqüências de *Cryptosporidium* genótipos aviários. B: assinatura genética contendo substituições discriminatórias entre as espécies *C. hominis* e *C. parvum*, localizada na região polimórfica 3

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
Cr felis	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	C
Cr felis C8																
Cr bovis 94-1_2007																
Cr sp. 2879.VT-2.2003																
Cr canis																
Cr parvum CPD1																
Cr parvum CYDRG18SB																
Cr parvum H7																
Cr parvum CPM1																
Cr parvum CYDRG18SA																
Cr parvum C1																
Cr parvum MT																
Cr parvum UCP																
Cr parvum TAMU																
Cr parvum GCH1																
Cr parvum IOWA																
Cr M24																
Cr parvum CPM1																
Cr K1																
Cr parvum K2																
Cr parvum CPF																
Cr meleagridis CMEL																
Cr parvum P1																
Cr Pig 1																
Cr wrairi CWR																
Cr sp. Sbey05c																
Cr sp. S1t105c																
Cr sp. S1d105c																
Cr sp. S1d105a																
Cr sp. CSP06																
Cr saurophilum																
Cr baileyi CBAIN-1																
01MK																
Cr sp. 6876																
Cr sp. 6898																
Cr sp. 1196																
Cr serpentis																
Cr andersoni bjcm																
Cr muris Calf IDVS-811																
Cr muris Mouse CMU03																
Cr fragile clone A																
Cr fragile clone G																
Cr fragile clone D																
Cr fragile clone J																
Cr cf. molnari																
02MK																
09MK																
Cr galli B1-31																
Cr sp. BE6																
Cr sp. ex Struthio camelus																
Cr sp. B1-11																
Cr sp. BE20																
Cr sp. BW3																
Cr sp. BP1																
Cr sp. Czech B4																
Cr sp. CzechB1																

	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320		
Cr felis	T	A	G	A	C	T	T	T	A	T	T	T	T	T	T	T		
Cr felis C8	T	A	G	A	C	T	T	T	A	T	T	T	T	T	T	T		
Cr bovis 94-1_2007	.	A	A	G	C	T	.	G	T	.	.	.	T	T	.	.		
Cr sp. 2879_VT-2.2003		
Cr canis	.	A	A	T	G	.	T	T	T	A	.	.		
Cr parvum CPD1	.	A	A	T	G	.	T	.	.	.	T	T	A	.	.	.		
Cr parvum CYDRG18SB	.	A	A	T	G	.	G	T	.	AA	.	T	A	.	.	.		
Cr parvum H7	.	A	A	T	G	.	G	T	.	AA	.	T	A	.	.	.		
Cr parvum CPRM1	.	A	A	T	G	.	G	T	.	AA	.	T	A	.	.	.		
Cr parvum CYDRG18SA	.	A	A	T	G	.	G	T	.	AA	.	T	A	.	.	.		
Cr parvum C1	.	A	A	T	G	.	G	T	.	AA	.	T	A	.	.	.		
Cr parvum MT	.	A	A	T	G	.	G	T	.	AA	.	T	A	.	.	.		
Cr parvum UCP	.	A	A	T	G	.	G	T	.	AA	.	T	A	.	.	.		
Cr parvum TAMU	.	A	A	T	G	.	G	T	.	AA	.	T	A	.	.	.		
Cr parvum GCH1	.	A	A	T	G	.	G	T	.	AA	.	T	A	.	.	.		
Cr parvum IOWA	.	A	A	T	G	.	G	T	.	AA	.	T	A	.	.	.		
Cr M24	.	A	A	T	G	.	G	T	.	AA	.	T	A	.	.	.		
Cr parvum CPM1	.	A	A	T	G	.	G	T	.	AA	.	T	A	.	.	.		
Cr K1	AA	.	T	G	.	T	.	T	.	.	TA	A	A	.	.	.		
Cr parvum K2	AA	.	T	G	.	T	.	T	.	.	TA	A	A	.	.	.		
Cr parvum CPF	.	A	.	G	T	C	.	A	.	AA	.	TA		
Cr meleagridis CMEL	.	A	A	T	G	.	A	.	.	AA	.	TT	A	.	.	.		
Cr parvum P1	.	A	A	T	G	.	A	.	.	AA	.	T	TT	A	A	.		
Cr Pig 1	.	A	A	T	G	.	A	.	.	AA	.	T	TT	A	A	.		
Cr vraini CWR	.	A	.	G	.	G	.	T	.	AA	.	TA		
Cr sp. Sbey05c	.	A	A	T	G	.	C	T	.	A	.	T	TT	C	A	.		
Cr sp. S1t105c	.	A	A	T	G	.	G	T	.	A	.	T	TT	C	A	.		
Cr sp. S1d05c	.	A	A	T	G	.	G	T	.	A	.	T	TT	C	A	.		
Cr sp. S1d05a	.	A	A	T	G	.	C	T	.	AAA	.	A		
Cr sp. CSP06	.	A	.	G	T	C	.	A	.	T	.	T		
Cr saurophilum	A	.	T	.	T		
Cr baileyi CBAlH-1	.	A	.	G	T	C	.	G	T	.	C	C		
01MK		
Cr sp. 6876	GA	T	T	A	.	.		
Cr sp. 6898	GA	T	T	A	.	.		
Cr sp. 1196	GA	A	.	.	.	T	T	A	.	.		
Cr serpentis	.	A	.	G	.	G	.	T	.	.	G	T	C	T	C	G		
Cr andersoni bjcm	.	A	.	A	.	A	.	CGC	.	G	T	.	G	T	C	T	C	G
Cr muris Calif IDVS-811	.	A	.	A	.	A	.	CGC	.	G	T	.	G	T	C	T	C	G
Cr muris Mouse CMU03	.	A	.	A	.	A	.	CG	.	G	T	.	G	T	C	T	C	G
Cr fragile clone A	AA	T	AT	.	CC	C	.	T	A	.	GGTGG	A	T
Cr fragile clone G	AA	T	AT	.	CC	C	.	T	A	.	GGTGG	A	T
Cr fragile clone D	AA	T	AT	.	CC	C	.	T	A	.	GGTGG	A	T
Cr fragile clone J	AA	T	AT	.	CC	C	.	T	A	.	GGTGG	A	T
Cr cf. molnari
02MK
09MK
Cr galli B1-31
Cr sp. BE6
Cr sp. ex Struthio camelus
Cr sp. B1-11
Cr sp. BE20
Cr sp. BW3
Cr sp. BP1
Cr sp. Czech B4
Cr sp. CzechB1



	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480																				
Cr felis	CGGTAGGGTATTGGCC	TACCGTACCGGTATG	GACCGGTAA	CGGGGAATTAGCGG	TCGATTCCGGAGAGGGAG	CGCTGAGAAACGGCT	ACCACATCTAAGGAAGGC	CAGCAGGCGCCAAAT	TACCCAATCCTAAT	ACAGGGAGCTAGT	GACAA	GAATAACAATA																								
Cr felis C8																				
Cr bovis 94-1_2007																				
Cr sp. 2879.VT-2.2003																				
Cr canis	A																				
Cr parvum CPD1	A																				
Cr parvum CYDRG18SB	A																				
Cr parvum H7	A																				
Cr parvum CPM1	A																				
Cr parvum CYDRG18SA	A																				
Cr parvum C1	A																				
Cr parvum MT	A																				
Cr parvum UCP	A																				
Cr parvum TAMU	A																				
Cr parvum GCH1	A																				
Cr parvum ICWA	A																				
Cr M24	A																				
Cr parvum CPM1	A																				
Cr K1	A																				
Cr parvum K2	A																				
Cr parvum CPF	A																				
Cr meleagridis CMEL	A																				
Cr parvum P1	A																				
Cr Pig 1	A																				
Cr vrairi CWR	A																				
Cr sp. Sbey05c	A																				
Cr sp. S1t105c	A																				
Cr sp. Sbl05c	A																				
Cr sp. Sbl05a	A																				
Cr sp. CSP06	A																				
Cr saurophilum	A																				
Cr baileyi CBATH-1	G	C																				
01MK	G	C																				
Cr sp. 6876																				
Cr sp. 6898																				
Cr sp. 1196																				
Cr serpentis	G	C																			
Cr andersoni bjcm	G	C																		
Cr muris Calf IDVS-811	G	C																	
Cr muris Mouse CM03	G	C																
Cr fragile clone A	C	G	C																
Cr fragile clone G	G	C															
Cr fragile clone D	G	C														
Cr fragile clone J	G	C													
Cr cf. molnari	G	G	C													
02MK	G	C												
09MK	G	C											
Cr galli B1-31	G	C										
Cr sp. BE6	G	C									
Cr sp. ex Struthio camelus	G	C								
Cr sp. B1-11	G	C							
Cr sp. BE20	G	C					
Cr sp. BW3	G	C			
Cr sp. BP1	G	C		
Cr sp. Czech B4	G	C	
Cr sp. CzechB1	G	C

	480	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640
Cr felis	CAGGACTTT	TACGGTTTT	GTAATTGGAAT	GAGTTAAGTATA	AAACCCCTTT	CAAGTATCA	ATTGGAGGGCAAGT	CTGCTGCCAGCAGCCGGT	AAATCCAGCTCCAAT	AGCGTATAT	TAAAGTTGTT	GCAGTTAAAAAGCT	CGTAGTTGGATTT	CTGT		
Cr felis C8						A										
Cr bovis 94-1_2007	A	C				A										AATC
Cr sp. 2879_VT-2.2003	AG	C				A										AAT
Cr canis	TA	A			G											
Cr parvum CPD1	TA	A			G											
Cr parvum CYDRG18SB																
Cr parvum H7																
Cr parvum CPM1																
Cr parvum CYDRG18SA																
Cr parvum C1																
Cr parvum MT																
Cr parvum UCP																
Cr parvum TAMU																
Cr parvum GCH1																
Cr parvum ICWA																
Cr M24																
Cr parvum CPM1																
Cr K1																
Cr parvum K2																
Cr parvum CPF																
Cr meleagris CME1																
Cr parvum P1	T	TTA														
Cr Pig 1	T	TTA														
Cr vraini CWR																
Cr sp. Sbey05c	AA	TA														
Cr sp. S1t105c	TAA	TA														
Cr sp. Sbl05c	AA	TA														
Cr sp. Sbl05a	T				G											
Cr sp. CSP06	C															
Cr saurophilum	C															
Cr baileyi CBATH-1	G	C	A													G
01MK	G	C	A													G
Cr sp. 6876	A	C														
Cr sp. 6898	A															
Cr sp. 1196	A	C														
Cr serpentis	G	C	A													G
Cr andersoni bjcm	G	C	A													G
Cr muris Calf IDVS-811	G	C	A													T
Cr muris Mouse CMU03	G	C	A													G
Cr fragile clone A	G	C	A													G
Cr fragile clone C	G	C	A													G
Cr fragile clone D	G	C	A													G
Cr fragile clone J	G	C	A													G
Cr cf. molnari	ACTC		A			A		T	C	T		CT				A
02MK	G	C	A													G
09MK	G	C	A													G
Cr galli B1-31	G	C	A													G
Cr sp. BE6	G	C	A													G
Cr sp. ex Struthio camelus	G	C	A													
Cr sp. B1-11	G	C	A													
Cr sp. BE20	G	C	A													
Cr sp. BW3	G	C	A													G
Cr sp. BP1	G	C	A													G
Cr sp. Czech B4	G	C	A													G
Cr sp. CzechB1	G	C	A													G

	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800		
Cr felis	TAATACCTTATATAAATATTTTTTAAAT			ATTATATGTA	AGATTAACATAATTCATATTTTTAAGACG	GAATTTTTAGTTTTGATAATATGAA			ATTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGC	TTAAAGCAGCCTTTGCCTTGAATACTCCA								
Cr felis C8	TT	C	CGA	A	A	T	AC	TTT	GT	C								
Cr bovis 94-1_2007	TT	C	GC	ACGG	A	A	T	AC	TTT	GT								
Cr sp. 2879_VT-2.2003	AT	A	AACA	A	T	A	T	AC	ATTT	T	GT					AG		
Cr canis	AT	A	AACA	A	T	A	T	AC	ATTT	T	GT					AG		
Cr parvum CPD1	AT	A	AACA	A	T	A	T	AC	ATTT	T	GT					AG		
Cr parvum CYDRG18SB	AT	A	GA	GA	AT	A	T	AC	ATTTT	T	GT					A		
Cr parvum H7	AT	A	GA	GA	AT	A	T	AC	ATTTT	T	GT					A		
Cr parvum CPM1	AT	AT	GA	GA	AT	A	T	AC	ATTTT	T	GT					A		
Cr parvum CYDRG18SA	AT	A	GA	GA	AT	A	T	AC	AT T	T	GT					A		
Cr parvum C1	AT	A	GA	GA	AT	A	T	AC	AT T	T	GT					A		
Cr parvum MT	AT	A	GA	GA	AT	A	T	AC	AT T	T	GT					A		
Cr parvum UCP	AT	A	GA	GA	AT	A	T	AC	AT T	T	GT					A		
Cr parvum TAMU	AT	A	GA	GA	AT	A	T	AC	AT T	T	GT					A		
Cr parvum GCH1	AT	A	GA	GA	AT	A	T	AC	AT T	T	GT					A		
Cr parvum ICWA	AT	A	GA	GA	AT	A	T	AC	AT T	T	GT					A		
Cr M24	AT	A	AA	A	AT	A	T	AC	AT ATTA	T	GT					A		
Cr parvum CPM1	AT	A	AA	A	AT	A	T	AC	AT ATTA	T	GT					A		
Cr K1	AT	T	C	AAG	G	GT	A	T	AC	AT TT	T	GT				C		
Cr parvum K2	AT	T	C	AAG	G	GT	A	T	AC	AT TT	T	GT				G		
Cr parvum CPF	AT	A	GA	A	AT	A	T	AC	A TTT	T	C	TGCT				A		
Cr meleagridis CMEI	AT	A	GA	A	AT	A	T	AC	A TT	A	T	GT				A		
Cr parvum P1	AT	A	A	A	AT	A	T	AC	AT ATT	T	A	T	GT			A		
Cr Pig 1	AT	A	A	A	AT	A	T	AC	AT ATT	T	A	T	GT			A		
Cr vrairi CWR	AT	A	GAA	A	AT	A	T	AC	AT T T	T	GT					A		
Cr sp. Sbey05c	AT	T	CAA	A	ATTGAT	A	A	T	AC	AG ATA	AA	T	GT			A		
Cr sp. S1t105c	AT	T	CAA	A	ATTGAT	A	A	T	AC	AG ATA	AA	T	GT			A		
Cr sp. SblD05c	AT	T	CAA	A	ATTGAT	A	GT	A	AC	A AT	A	T	GT			A		
Cr sp. SblD05a	AT	C	CAA	A	AT	A	TT	AC	ATGTT	T	GT					G		
Cr sp. CSP06	AT	A	ACGG	A	A	T	TT	AC	T TTT	A	GT					A		
Cr saurophilum	AT	A	ACGG	A	A	T	TT	AC	T TTT	A	GT					A		
Cr baileyi CBAIH-1	A	C	CCACGG	A	A	C	AC	TTTAA	GT	G	C					C		
01MK	A	C	CCACGG	A	A	C	AC	TTTAA	GT	G	C					C		
Cr sp. 6876	TT	C	ACGG	A	A	T	GC	AC T T	GT	GC						AA		
Cr sp. 6898	TT	GC	C	CCACGG	A	A	G	C	GC	ACC	CGC					AA		
Cr sp. 1196	G	TT	C	ACGG	A	A	C	G	C	GC	AC	TTA				GT		
Cr serpentis	GTATTT	ATA	T	AAGC	AA	TA	T	A	T	C	CC	C	A	A	TTTTA	ATAT	G	
Cr andersoni bjcm	GTATAA	TATA	T	CCAAGG	AA	T	AT	A	TT	C	CC	C	A	A	T	CTAA	ATAT	G
Cr muris Calif IDVS-811	GTATAA	TATA	T	CCAAGG	AA	T	AT	A	TT	C	CC	C	A	A	T	CTAA	ATAT	G
Cr muris Mouse CMU03	GTATAA	CTATA	T	C	AAGG	A	AT	A	TT	C	CC	C	A	A	TTCTAA	ATAT	G	
Cr fragile clone A	GCATGTAG	GGAG	GGCCA	AAACAG	CCCTCC	C	C	T	CC	C	C	T	A	A	TTTTA	ATAT	GG	
Cr fragile clone G	GCATGTAG	GGAG	GGCCA	AAACAG	CCCTCC	C	C	T	CC	C	C	T	A	A	TTTTA	ATAT	GG	
Cr fragile clone D	GCATGTAG	GGAG	GGCCA	AAACAG	CCCTCC	C	C	T	CC	C	C	T	A	A	TTTTA	ATAT	GG	
Cr fragile clone J	GCATGTAG	GGAG	GGCCA	AAACAG	CCCTCC	C	C	T	CC	C	C	T	A	A	TTTTA	ATAT	GG	
Cr cf. molnari	ATGTA	C	T	CCT	CGAAGGT	T	AT	TC	TCCCC	CATCCCCCAT	C	T	TGT	G	G	TGC	T	
02MK	GCAT	A	ATAT	TC	C	AAGC	A	A	A	T	C	CC	C	C	TA	A	AT	CTA
09MK	GCAT	A	ATAT	TC	C	AAGC	A	A	A	T	C	CC	C	C	G	A	AT	CTA
Cr galli B1-31	GCAT	A	ATAT	TC	CCAAGG	A	A	A	T	C	CC	C	C	TA	A	AT	CTA	ATAT
Cr sp. BE6	A	A	C	ACGG	A	A	C	C	AC	TTTTA	GT	G					A	
Cr sp. ex Struthio camelus	T	G	C	ACGG	A	A	C	C	AC	TTTTA	GT						A	
Cr sp. B1-11	T	G	C	ACGG	A	A	C	C	AC	TTTTA	GT						A	
Cr sp. BE20	T	G	C	ACGG	A	A	C	C	AC	TTTTA	GT						A	
Cr sp. BW3	GTATTT	ATA	T	C	AAGC	A	CAT	A	T	AC	CC	CC	A	A	A	TTTTA	ATAT	GG
Cr sp. BP1	GTATTT	ATA	T	C	AAGC	A	CAT	A	T	AC	CC	CC	A	A	A	TTTTA	ATAT	GG
Cr sp. Czech B4	GTAT	A	ATAT	TC	CCAAGC	A	A	A	T	C	CCC	C	A	A	TTA	ATAT	G	
Cr sp. CzechB1	CTA	T	ATA	C	CCAAGC	A	AT	A	TGAC	CC	CC	C	A	A	TTTTA	ATAT	GG	

B

	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960
Cr felis	GCATGGAATAATAA	AAAAGATTTTAT	CCTTTTAT	TGCTTCTAAGATA	AAAAATAA	GATTAA	TAGGGACAGT	TGGGGCA	TTTGTATTTAACAGT	CAGAGGT	GATATTC	TAGATTTCT	AAAGACAAACT	AAATGCGAAAGCA	TTTGCCAAGGATG	
Cr felis C8																
Cr bovis 94-1_2007		T	G	TC	C		GA		G							C
Cr sp. 2879_VT-2.2003		T	G	TC	C		GA									C
Cr canis		T					G									
Cr parvum CPD1		T		C			G									
Cr parvum CYDRG18SB		T					G									
Cr parvum H7		T					G									
Cr parvum CPRM1		T					G									
Cr parvum CYDRG18SA		T		C			G									
Cr parvum C1		T		C			G									
Cr parvum MT		T		C			G									
Cr parvum UCP		T		C			G									
Cr parvum TAMU		T		C			G									
Cr parvum GCH1		T		C			G									
Cr parvum IOWA		T		C			G									
Cr M24		T		C			G									
Cr parvum CPM1		T		C			G									
Cr K1		T		C			G									
Cr parvum K2		T		C			G									
Cr parvum CPF		T		C			G									
Cr meleagridis CME1		T		C												
Cr parvum P1																C
Cr Pig 1																C
Cr vraini CWR		T		C			G									C
Cr sp. Sbey05c		G		C												
Cr sp. S1t105c		G		C												
Cr sp. S1d05c		G		C												C
Cr sp. S1d05a		C	G				G									
Cr sp. CSP06		T		C												G
Cr saurophilum		T		C												G
Cr baileyi CBATH-1		T		C			G									C
01MK		T		C			G									C
Cr sp. 6876		T	G		C	C		G								C
Cr sp. 6898		T	G		C										T	C
Cr sp. 1196		T	G		C											C
Cr serpentis		GT	G	C	G	C	G	G	G		C				G	C
Cr andersoni bjcm		GT	G	C	G	C		G	C	G	C				G	C
Cr muris Calif IDVS-811		GT	G	C	G	C		G	C	G	C				G	C
Cr muris Mouse CMU03		GT	G	C	G	C		G	C	G	C				G	C
Cr fragile clone A		GTT	G	C	G	C	G	G	CG	G	G				T	C
Cr fragile clone G		GTT	G	C	G	C	G	G	CG	G	G				T	C
Cr fragile clone D		GTT	G	C	G	C	G	G	CG	G	G				T	C
Cr fragile clone J		GTT	G	C	G	C	G	G	CG	G	G				T	C
Cr cf. molnari		G	T	C	T	C		A	G	G	A	A				
02MK		GC	G	C	G	C		G	C	G	G				T	C
09MK		GC	G	C	G	C		G	C	G	G				T	C
Cr galli B1-31		GC	G	C	G	C		G	C	G	G					
Cr sp. BE6		T		C			G									
Cr sp. ex Struthio camelus		T		C				G								C
Cr sp. B1-11		T		C												
Cr sp. BE20		T		C												
Cr sp. BW3		GT	G	C	G	C	G									
Cr sp. BP1		GT	G	C	G	C	G									
Cr sp. Czech B4		GC	G	C	G	C		G	C							
Cr sp. CzechB1		GT	G	C	G	C	G			G						

	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
Cr felis	TTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCTTACTCTTAACCATAACTATGCCAAGTAGAGATTGGAGGTTGTTCCCTTACTCCTTCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCG															
Cr felis C8																
Cr bovis 94-1_2007																
Cr sp. 2879.VT-2.2003																
Cr canis																
Cr parvum CPD1																
Cr parvum CYDRG18SB																
Cr parvum H7																
Cr parvum CPM1																
Cr parvum CYDRG18SA																
Cr parvum C1																
Cr parvum MT																
Cr parvum UCP																
Cr parvum TAMU																
Cr parvum GCH1																
Cr parvum ICWA																
Cr M24																
Cr parvum CPM1																
Cr K1																
Cr parvum K2																
Cr parvum CPF																
Cr meleagridis CMEL																
Cr parvum P1																T
Cr Pig 1																T
Cr vraini CWR																
Cr sp. Sbey05c																
Cr sp. S1t105c																
Cr sp. S1d05c																
Cr sp. S1d05a																T
Cr sp. CSP06																
Cr saurophilum																
Cr baileyi CBATH-1										G						
01MK																
Cr sp. 6876										G						
Cr sp. 6898										G						
Cr sp. 1196										G		T				
Cr serpentis										G						
Cr andersoni bjcm										G						T
Cr muris Calf IDVS-811										G						T
Cr muris Mouse CM03										G						
Cr fragile clone A										G						
Cr fragile clone C										G						
Cr fragile clone D										G						
Cr fragile clone J										G						
Cr cf. molnari										G						
02MK																
09MK																
Cr galli B1-31																
Cr sp. BE6																
Cr sp. ex Struthio camelus																
Cr sp. B1-11																
Cr sp. BE20																
Cr sp. BWS																
Cr sp. BP1																
Cr sp. Czech B4																
Cr sp. CzechB1																

	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280
Cr felis	CAAGGCTGAAACTTAAAGGAA	TTGACGGAAAGCCACCACC	AGGAGTGGAGCCTGCCGCT	TAAATTTGACTCAACACGG	AAACTCACCAAGTCCAGACA	TAGGAAGGATTTGACAGATT	GATAGCTCTTTCTTGATT	CTATCGGTGGTGGTGCAT	GGCCGT							
Cr felis C8																
Cr bovis 94-1_2007																
Cr sp. 2879.VT-2.2003																
Cr canis																
Cr parvum CPD1																
Cr parvum CYDRG18SB																
Cr parvum H7																
Cr parvum CPM1																
Cr parvum CYDRG18SA																
Cr parvum C1																
Cr parvum MT																
Cr parvum UCP																
Cr parvum TAMU																
Cr parvum GCH1																
Cr parvum ICWA																
Cr M24																
Cr parvum CPM1																
Cr K1																
Cr parvum K2																
Cr parvum CPF																
Cr meleagridis CML																
Cr parvum P1																
Cr Pig 1																
Cr vraini CWR																
Cr sp. Sbey05c																
Cr sp. S1t105c																
Cr sp. S1d105c																
Cr sp. S1d105a																
Cr sp. CSP06																
Cr saurophilum																
Cr baileyi CBATH-1																
01MK																
Cr sp. 6876																
Cr sp. 6898																
Cr sp. 1196																
Cr serpentis																
Cr andersoni bjcm																
Cr muris Calif IDVS-811																
Cr muris Mouse CMU03																
Cr fragile clone A																
Cr fragile clone C																
Cr fragile clone D																
Cr fragile clone J																
Cr cf. molnari																
02MK																
09MK																
Cr galli B1-31																
Cr sp. BE6																
Cr sp. ex Struthio camelus																
Cr sp. B1-11																
Cr sp. BE20																
Cr sp. BWS																
Cr sp. BP1																
Cr sp. Czech B4																
Cr sp. CzechB1																

	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
Cr felis	TCTTACTTGCTGGAGTGATTTCTCTGCTAAATCCCGTTAACGAAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAGACATAAGAAATATATTAATATTTTTATTTCTCTTAGAGGGACTTTCTATGTTTAAACAGGGAAGTTTTAGGCAATAACAGGCTCTGTGA															
Cr felis C8																
Cr bovis 94-1_2007																
Cr sp. 2879.VT-2.2003																
Cr canis																
Cr parvum CPD1																
Cr parvum CYDRG18SB																
Cr parvum H7																
Cr parvum CPM1																
Cr parvum CYDRG18SA																
Cr parvum C1																
Cr parvum MT																
Cr parvum UCP																
Cr parvum TAMU																
Cr parvum GCH1																
Cr parvum IOWA																
Cr M24																
Cr parvum CPM1																
Cr K1																
Cr parvum K2																
Cr parvum CPF																
Cr meleagridis CMEL																
Cr parvum P1																
Cr Pig 1																
Cr wrairi CWR																
Cr sp. Sbey05c																
Cr sp. S1t105c																
Cr sp. S1d105c																
Cr sp. S1d105a																
Cr sp. CSP06																
Cr saurophilum																
Cr baileyi CBAlH-1																
01MK																
Cr sp. 6876																
Cr sp. 6898																
Cr sp. 1196																
Cr serpentis																
Cr andersoni bjcm																
Cr muris Calf IDVS-811																
Cr muris Mouse CMU03																
Cr fragile clone A																
Cr fragile clone G																
Cr fragile clone D																
Cr fragile clone J																
Cr cf. molnari																
02MK																
09MK																
Cr galli B1-31																
Cr sp. BE6																
Cr sp. ex Struthio camelus																
Cr sp. B1-11																
Cr sp. BE20																
Cr sp. BW3																
Cr sp. BP1																
Cr sp. Czech B4																
Cr sp. CzechB1																

	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
Cr felis	TGCCCTTAGATGTCCTGGCCCGCCGCCCGCTACACTGATGCATCCGTC	CAACTATA	TTTATCCCTGTTT	CGAAGGAAATGGGTAA	CTTTTGAATATGCATCGT	GATGGGGATAGATCA	TTGCCAATTATTGATCTTTAACGAGGAATTCCTAGTAAGCCCA											
Cr felis C8			A															
Cr bovis 94-1_2007			A		T	TC	C		C									G
Cr sp. 2879.VT-2.2003			A															
Cr canis			A		T	T												G
Cr parvum CPD1			A		T	T												G
Cr parvum CYDRG18SB			A			A												G
Cr parvum H7			A			A												G
Cr parvum CPM1			A			A												G
Cr parvum CYDRG18SA			A			A												G
Cr parvum C1			A			A												G
Cr parvum MT			A			A												G
Cr parvum UCP			A			A												G
Cr parvum TAMU			A			A												G
Cr parvum GCH1			A			A												G
Cr parvum IOWA			A			A												G
Cr M24			A			A												G
Cr parvum CPM1			A			A												G
Cr K1			A			A												G
Cr parvum K2			A			A												G
Cr parvum CPF			A			A												G
Cr meleagridis CMEL			A			AA												G
Cr parvum P1			A			A		A										G
Cr Pig 1			A			A		A										G
Cr wrairi CWR			A			A												G
Cr sp. Sbey05c			A			AT												G
Cr sp. Slt105c			A			AT												G
Cr sp. Sbl105c			A			AT												G
Cr sp. Sbl05a			A			A												G
Cr sp. CSP06			A			TA		A										G
Cr saurophilum																		
Cr baileyi CBAlH-1			T		A		TC					A		A				C
01MK																		
Cr sp. 6876																		
Cr sp. 6898																		
Cr sp. 1196																		
Cr serpentis			A			AG	G		A					G		G		
Cr andersoni bjcm			A			AG	G		A					A		G		
Cr muris Calf IDVS-811			A			AG	G		A					A		G		
Cr muris Mouse CMU03			A			AA	G		A					A		G		
Cr fragile clone A			T		A		AG	G		CCC				G		G		
Cr fragile clone G			T		A		AG	G		CCC				G		G		
Cr fragile clone D			T		A		AG	G		CCC				G		G		
Cr fragile clone J			T		A		AG	G		CCC				G		G		
Cr cf. molnari																		
02MK																		
09MK																		
Cr galli B1-31																		
Cr sp. BE6																		
Cr sp. ex Struthio camelus																		
Cr sp. B1-11																		
Cr sp. BE20																		
Cr sp. BW3																		
Cr sp. BP1																		
Cr sp. Czech B4																		
Cr sp. CzechB1																		

	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760
Cr felis	AGTCATCAGCTT	CGCCGTGATT	ACGTCCCTGCCCTTT	GTACACACC	CCCCGTCCCT	TACCGATT	GAAATGAT	CCGGTGAAT	TATTCGGACCAT	ACAAT	GTAGCAA	TACAT	GTAAAGAAAG	TTTCGTA	AAACCTT	TATCATTTAGAGGAAGGAGAA
Cr felis C8																
Cr bovis 94-1_2007							G			TT		C	A			T
Cr sp. 2879.VT-2.2003																
Cr canis										GT						G
Cr parvum CPD1										GT						G
Cr parvum CYDRG18SB										TT						TC
Cr parvum H7										TT						
Cr parvum CPM1										TT						TC
Cr parvum CYDRG18SA										TT						
Cr parvum C1										TT						
Cr parvum MT										TT						
Cr parvum UCP										TT						
Cr parvum TAMU										TT						
Cr parvum GCH1										TT						
Cr parvum IOWA										TT						
Cr M24										TT						
Cr parvum CPM1										TT						
Cr K1										TT						
Cr parvum K2										TT						
Cr parvum CPF										TT						TC
Cr meleagris CMEL										TT						
Cr parvum P1										TT						
Cr Pig 1										TT						
Cr wrairi CWR										TT						
Cr sp. Sbey05c										T	AA					
Cr sp. S1t105c										T	AA					
Cr sp. S1d105c										T	TT					
Cr sp. S1d105a										TT						
Cr sp. CSP06										TT						TC
Cr saurophilum																
Cr baileyi CBAIN-1						G				AA					T	C
01MK																
Cr sp. 6876																
Cr sp. 6898																
Cr sp. 1196																
Cr serpentis						G		A		GC	AT	A		A		A
Cr andersoni bjcm						G		A		GC	AC	A		A		A
Cr muris Calf IDVS-811						G		A		GC	AC	A		A		A
Cr muris Mouse CMU03						G		A		GC	ACGA			A		A
Cr fragile clone A						G		C	CA	TGCTA		C		G	C	CTC
Cr fragile clone G						G		C	CA	TGCTA		C		G	C	CTC
Cr fragile clone D						G		C	CA	TGCTA		C		G	C	CTC
Cr fragile clone J						G		C	CA	TGCTA		C		G	C	CTC
Cr cf. molnari																
02MK																
09MK																
Cr galli B1-31																
Cr sp. BE6																
Cr sp. ex Struthio camelus																
Cr sp. B1-11																
Cr sp. BE20																
Cr sp. BW3																
Cr sp. BP1																
Cr sp. Czech B4																
Cr sp. CzechB1																

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)