

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/08/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Ana Paula Oliveira Arbex

Infecção por *Giardia duodenalis* e diversidade da microbiota intestinal em crianças de 0 a 6 anos de idade

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Semíramis Guimarães Ferraz Viana
Coorientadora: Profa. Dra. Érica Boarato David

Botucatu
2019

Ana Paula Oliveira Arbex

Infecção por *Giardia duodenalis* e diversidade da microbiota intestinal em crianças de 0 a 6 anos de idade

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais

Orientadora: Profa. Dra. Semíramis Guimarães Ferraz Viana
Coorientadora: Profa. Dra. Érica Boarato David

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Arbex, Ana Paula Oliveira.

Infecção por *Giardia duodenalis* e diversidade da
microbiota intestinal em crianças de 0 a 6 anos de idade /
Ana Paula Oliveira Arbex. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Semíramis Guimarães Ferraz Viana
Coorientador: Érica Boarato David
Capes: 40101096

1. Crianças. 2. *Giardia*. 3. Microbiota.

Palavras-chave: Crianças; Diversidade bacteriana; *Giardia
duodenalis*; Microbiota intestinal.

Dedicatória

Aos meus Pais: **Paulo e Elisete**, que, de maneira excepcional, me ensinaram sobre respeito, coragem, humildade, amor e dedicação.

Aos meus irmãos **Paulo, Dani, Aline e Rodrigo**, por serem tão especiais comigo, pelo apoio e por me proporcionarem tantos momentos de alegria, descontração e diversão.

Ao meu esposo **Hassan Arbex** meu porto seguro, companheiro de todas as horas, pela sua compreensão, dedicação, tolerância e estímulo constante. Pela torcida mais preciosa que existe, e suporte sem os quais eu jamais teria chegado a algum lugar. Incluo, de forma muito especial, **Marina** nossa bebezinha, que chegou ao mundo no meio de todo esse processo. Tarefa que foi árdua, dividir “artigos, fraldas e noites em claro”. Apesar de tudo isso, foi muito valioso para chegar até aqui.

Agradecimento Especial

Dra. Semíramis

À minha orientadora, a qual admiro e respeito muito, que permitiu meu crescimento e compartilhou seus conhecimentos. Agradeço pela colaboração, confiança, paciência, compreensão e principalmente pela amizade.

Profa. Dra. Érica Boarato David

À minha Coorientadora, amiga e companheira, agradeço por toda ajuda, dedicação, carinho, cumplicidade e amizade. Obrigada por estar comigo durante a minha caminhada.

Agradecimentos

À **Deus**, por me dar forças para seguir em busca dos meus objetivos e sonhos. Pela fé que não me permite desabar nos momentos de adversidades, pelos momentos, oportunidades e pelas portas que foram abertas em minha vida

Aos funcionários, alunos e professores do Departamento de Parasitologia

À **Seção técnica de Pós-Graduação** pelos serviços prestados.

Ao Grupo de Apoio à Pesquisa (Gap), em especial ao **Prof. Dr. José Eduardo Corrente**, pela colaboração na análise estatística deste trabalho.

As alunas **Vanessa, Bianca e Jaqueline** (Laboratório de Genômica Funcional & Microbiologia de Vetores (Vectomics), Prof. Jayme Souza Neto - Depto Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP) pela colaboração na preparação das amostras NGS e suporte para as análises através do software CLC Genomics Workbench.

As professoras **Dra. Cátia da Fonseca; Dra. Joelma Martin e Profa. Cilmery Kurokawa** – Departamento de Pediatria – FMB – Unesp/Botucatu, pela colaboração e apoio no tratamento das crianças da creche e coleta das amostras do Pronto Socorro Pediátrico Prof. Dr. Antônio de Pádua Campana.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **Capes**, pelo suporte financeiro referente à bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **Fapesp**, pelo apoio financeiro prestado processo: 2015/21254-6.

RESUMO

Giardia duodenalis é um dos principais agentes etiológicos de diarreia infecciosa, sobretudo em crianças em idade pré-escolar que vivem em comunidades de baixa renda. Estudos da diversidade genética de *G. duodenalis* ampliaram o conhecimento da epidemiologia nas infecções humanas, entretanto um dos temas mais interessantes e menos conhecidos é a possível interação de *Giardia* com o microbioma do hospedeiro e com patógenos concomitantes. No presente estudo, avaliou-se a composição e a diversidade da comunidade bacteriana de crianças saudáveis e crianças com diarreia, parasitadas por *Giardia* e outros protozoários intestinais. Os isolados de *Giardia* obtidos nessa população foram caracterizados geneticamente. Amostras de fezes foram obtidas de 181 crianças de 0 a 6 anos de idade, das quais 156 crianças hígdas atendidas em centros de educação infantil e 25 crianças com diarreia atendidas no PS Infantil Municipal. Cada amostra de fezes foi processada para o exame microscópico e submetida à extração de DNA a ser empregado em duas etapas distintas: (1) amplificação e sequenciamento Sanger para a caracterização genética de *Giardia* e o diagnóstico de *Blastocystis sp*, *Dientamoeba fragilis*, *Enterocytozoon bieneusi* e *Cryptosporidium spp.* e (2) amplificação do gene 16s RNA ribossomal e sequenciamento de nova geração (plataforma Illumina MiSeq) para a caracterização da microbiota intestinal. *Giardia* (36,5%) e *Blastocystis* (41,7%) foram os parasitas mais prevalentes. A caracterização genética de 61 isolados de *Giardia* revelou infecções por *assemblages* A (64%), B (33%) e infecções mistas A+B (3%). As análises metagenômicas revelaram similaridade da diversidade e riqueza do microbioma bacteriano entre os grupos de crianças assintomáticas e parasitadas por *Giardia* e/ou outros protozoários e o grupo de crianças não parasitadas em comparação com o grupo de crianças com *Giardia* e diarreia. Redução e aumento marcantes da abundância relativa, respectivamente, nos filos Bacteroidetes e Proteobacteria foram observados no grupo de crianças com diarreia. Aumento do filo Verrucomicrobia com predomínio do gênero *Akkermansia* foi observado nas infecções sintomáticas e assintomáticas por este protozoário, particularmente no grupo com diarreia. Além disso, *Bifidobacterium* foi mais abundante nas crianças com giardíase sintomática do que nos casos assintomáticos. Apesar dessas variações, geralmente a colonização por *Giardia* mostrou-se associada a uma microbiota saudável. A existência de associações entre parasitas intestinais e diversidade de microbiota é um fato, porém requer mais estudos.

Palavras-chave: Parasitas intestinais, Crianças, *Giardia duodenalis*, Diversidade genética, Sequenciamento de Nova Geração (GS), Microbiota

ABSTRACT

Giardia duodenalis is one of the major etiological agents of infectious diarrhea, especially in preschool children living in low-income settings. Studies focused on genetic diversity of *G. duodenalis* have provided insights for a better understanding of epidemiology in human infections. However, one of the most interesting and least known issues is the possible interplay between *Giardia* and the host microbiome and concomitant pathogens. In this work, we evaluated the diversity and composition of bacterial community of healthy children and children presenting with diarrhea infected by *Giardia* and/or other intestinal protozoa. In addition, *Giardia* isolates infecting this population were genotyping. A total of 181 stool samples from children aged 0 to 6 years old (156 from daycare children and 25 from diarrheic children attending in an emergence pediatric center) were tested by microscopic examination and submitted to DNA extraction for the following steps: (1) conventional PCR/sequencing for *Giardia* genotyping and the diagnosis of *Blastocystis* sp, *Dientamoeba fragilis*, *Enterocytozoon bieneusi* and *Cryptosporidium* spp and (2) next-generation sequencing (Illumina MiSeq) based analysis of intestinal microbiota. *Giardia* (36.5%) and *Blastocystis* (41.7%) were the most prevalent parasites. Analysis of *Giardia* sequences retrieved from 61 isolates revealed infections by assemblages A (31%), B (69%) and mixed infections A+B (3%). Metagenomic analyzes revealed similarity of bacterial microbiome diversity and richness between asymptomatic children infecting by *Giardia* and/or other protozoa and the group of non-parasitized children compared to the group of children with *Giardia* and diarrhea. Metagenomic analysis revealed significant reduction and increase in relative abundance, respectively, in the Bacteroidetes and Proteobacteria phyla were observed in the group of *Giardia*-positive children with diarrhea. In addition, an increase in the phylum Verrucomicrobia with a predominance of the genus Akkermansia was observed in both symptomatic and asymptomatic children. In addition, *Bifidobacterium* was more abundant in children with symptomatic giardiasis than in asymptomatic cases. Despite these variations, *Giardia* colonization is usually associated with a healthy gut microbiota. The existence of associations between intestinal parasites and microbiota diversity is a fact but it needs further studies.

Keywords: Intestinal parasites, Children, *Giardia duodenalis*, Genetic diversity, Next Generation Sequencing (NGS), Microbiota

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

16S rRNA	gene ribossomal 16S
Bg	Gene β - <i>giardina</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Gdh	Gene glutamato desidrogenase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDHM	Índice de Desenvolvimento Humano Municipal
NGS	Sequenciamento de nova geração
nPCR	Nested
OTU	Unidade taxonômica operacional
PCoA	Análise de coordenadas principais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PERMANOVA	Permutational multivariate analysis of variance
snPCR	Semi-Nested
SSU rDNA	Subunidade menor do RNA ribossômico
Tpi	Gene triose fosfato isomerase
β-diversidade	Beta diversidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 O protozoário <i>Giardia</i>	12
1.1.1 Histórico e Taxonomia	12
1.1.2 <i>Giardia duodenalis</i> – Aspectos gerais	14
1.1.3 Caracterização Molecular de <i>Giardia duodenalis</i>	18
1.1.4 Assemblages de <i>G. duodenalis</i> e o espectro clínico da giardíase	22
1.2 Microbiota Intestinal Humana	24
1.2.1 Microbiota Intestinal Infantil	27
1.2.2 Interação entre Protozoários Intestinais e a Microbiota	31
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo Geral	37
2.2 Objetivos Específicos	37
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	38
3.1 Aspectos Éticos	38
3.2 Área de Estudo	38
3.3 População do Estudo	39
3.4 Apresentação da pesquisa e obtenção de dados demográficos, socioeconômicos, epidemiológicos e clínicos dos participantes	40
3.5 Exame parasitológico de fezes	44
3.6 Tratamento e Controle de Cura	46
3.7 Extração do DNA genômico	47
3.8 Detecção e Caracterização Molecular dos Isolados de <i>Giardia duodenalis</i>	47
3.8.1 Amplificação do DNA genômico	47
3.8.2 Sequenciamento dos produtos da PCR e análise filogenética	49
3.8.3 Identificação molecular de <i>Blastocystis sp.</i> , <i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Cryptosporidium spp</i> e <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	51
3.9 Análises dos dados	51

3.10	Avaliação da diversidade da microflora bacteriana nas amostras de fezes por meio de sequenciamento de nova geração em plataforma Illumina Miseq baseado no gene 16S rRNA.	52
3.10.1	Preparo das bibliotecas	54
3.10.2	Purificação e quantificação do produto de PCR	55
3.10.3	Sequenciamento Illumina e Processamento das amostras	56
3.10.4	Análises estatísticas	58
4.	RESULTADOS	58
4.1	Caracterização demográfica e socioeconômica da população	58
4.2	Prevalência de parasitas intestinais	61
4.3	Caracterização molecular dos isolados de <i>Giardia duodenalis</i>	64
4.4	Diversidade da microbiota bacteriana intestinal de crianças de 0 a seis anos parasitadas por protozoários intestinais	70
5.	DISCUSSÃO	92
6.	CONCLUSÃO	104
7.	REFERÊNCIAS	105
8.	ANEXOS	117

INTRODUÇÃO

1.1. O protozoário *Giardia*

1.1.1. Histórico e Taxonomia

O gênero *Giardia* inclui protozoários flagelados que parasitam o intestino delgado de várias espécies de vertebrados, incluindo mamíferos, aves, répteis e anfíbios, sendo nestes hospedeiros, o agente responsável pela infecção denominada giardíase.

Por mais de 300 anos, desde que *Giardia* foi observado pela primeira vez em 1681 por Anton van Leeuwenhoek em suas próprias fezes, a sua descoberta propiciou aos pesquisadores, a oportunidade de investigar um dos organismos mais interessantes do ponto de vista evolutivo, biológico e até mesmo epidemiológico. Mesmo apresentando características morfológicas incomuns e capazes de diferenciar este parasita de outros protozoários, a taxonomia e nomenclatura ainda são controversas. Após várias revisões taxonômicas, atualmente, os organismos do gênero *Giardia* são classificados no filo Metamonada, subfilo Trichozoa, superclasse Eopharyngia, classe Trepomonadea, subclasse Diplozoa e ordem Giardiida (LUJAN; SVÄRD, 2011; THOMPSON; MONIS, 2012).

Dois séculos após o parasita ter sido observado pela primeira vez, Vilem Lambl, em 1859, analisando as fezes de uma criança, realizou a primeira descrição morfológica mais detalhada e denominou o parasito *Cercomonas intestinalis*, sendo que mais adiante em 1875, Davaine, estudando flagelados intestinais de coelhos, denominou o parasito *Hexamita duodenalis* (MONIS; THOMPSON, 2004; LUJAN; SVÄRD, 2011). Características morfológicas distintas e diferenças no ciclo de vida levaram à constatação de que o protozoário não pertencia aos gêneros *Cercomonas* e *Hexamita*, sendo que, em 1882, o gênero *Giardia* foi criado por Kunstler, ao observar o mesmo flagelado no intestino de girinos de anfíbios anuros (MONIS; THOMPSON, 2004; LUJAN; SVÄRD, 2011). Seis anos depois, Blanchard (1888) sugeriu o nome genérico *Lambliia* em

homenagem à primeira descrição do parasito feita por Lambl e esta denominação permaneceu por um tempo até que, de fato, o gênero *Giardia* foi reconhecido pela maioria dos pesquisadores (MONIS; THOMPSON, 2004; LUJAN; SVÄRD, 2011). Em 1915, Charles Wardell Stiles, estudando fezes humanas, denominou de *Giardia lamblia* aos parasitos observados nesse material, homenageando com essa denominação, os estudos realizados pelos pesquisadores Giard em Paris e Lambl em Praga (LIPOLDOVÁ, 2014).

A partir da criação do gênero, a determinação das espécies passou a ser feita, principalmente, com base no hospedeiro de origem, e com isso, mais de 50 espécies diferentes foram descritas, a maioria em mamíferos. No entanto, este critério passou a ser questionado por muitos pesquisadores, sendo que em 1952, Filice ao analisar os dados reunidos até aquele momento, realizou a primeira revisão taxonômica (FILICE, 1952). Com isso, baseando-se apenas em características morfológicas dos trofozoítos, Filice propôs considerar apenas três espécies distintas: *Giardia duodenalis* que infecta vários mamíferos, inclusive o ser humano, aves e répteis, *Giardia muris* que infecta roedores, aves e répteis e *Giardia agilis* que infecta anfíbios. Posteriormente, com o emprego da técnica de microscopia eletrônica e com os avanços da biologia molecular, três novas espécies foram propostas, a saber: *Giardia psittaci* (ERLANDSEN; BEMRICK, 1987) e *Giardia ardeae* (ERLANDSEN, 1990) descritas, respectivamente, em periquitos e garças azuis e *Giardia microti*, encontrada em roedores conhecidos como camundongo-do-campo e rato-almiscarado (FEELY, 1988). Atualmente, oito espécies do gênero *Giardia* são consideradas válidas, pois além dessas seis espécies, incluem-se mais duas espécies, recentemente descritas, *Giardia cricetidarium* em hamster (HILLMAN et al., 2016) e *Giardia peramelis* em marsupiais denominados "bandicoots" (LYU et al., 2018).

Dentre as oito espécies aceitas, *Giardia duodenalis* (= *Giardia intestinalis* = *Giardia lamblia*) é a única espécie que parasita o ser humano, podendo infectar outros

mamíferos, incluindo animais de companhia como cães e gatos e uma variedade de animais domésticos e silvestres (FENG; XIAO, 2011).

1.1.2. *Giardia duodenalis* – Aspectos gerais

No que se refere à biologia, os parasitas do gênero *Giardia* se apresentam sob duas formas evolutivas estruturalmente e bioquimicamente distintas, o trofozoíto e o cisto. Os trofozoítos são as formas flageladas responsáveis pelas manifestações clínicas da giardíase, enquanto os cistos representam o estágio infectante, pois exibem uma rígida parede protetora que permite a sobrevivência do parasita fora do hospedeiro. Essas formas podem ser encontradas em fontes de águas residuais, superficiais e subterrâneas, bem como em amostras de água potável, mesmo após o tratamento empregando os processos convencionais de tratamento e desinfecção da água (OMAROVA et al., 2018). Por apresentar um ciclo de vida direto, a transmissão ocorre facilmente a partir da ingestão dos cistos, seja indiretamente através da água e alimentos contaminados ou diretamente de pessoa a pessoa. Poucos cistos são necessários para infectar o hospedeiro, sendo que 10 a 100 formas são suficientes para iniciar a infecção. Após a ingestão, o cisto passa por um processo de desencistamento, que tem início no meio ácido do estômago e completa-se no duodeno e jejuno. Recentemente, foi constatado que cada cisto maduro libera uma forma oval, tetranucleada e com oito flagelos, denominada excitozoíto (ANKARKLEV et al., 2010; Figura 1). Há evidências de que em cada excitozoíto ocorram duas divisões nucleares sem replicação do material genético e, em seguida, este organismo divide-se e origina quatro trofozoítos binucleados. Os trofozoítos multiplicam-se por divisão binária longitudinal e assim, colonizam o intestino, onde permanecem aderidos à mucosa por meio do disco adesivo. O ciclo se completa pelo encistamento do parasito e sua eliminação para o meio exterior.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo representam uma contribuição importante quanto à prevalência de infecções causadas por parasitas intestinais, à diversidade genética de *Giardia duodenalis* e às interações entre protozoários intestinais e a comunidade microbiana em um grupo de crianças em idade pré-escolar.

Assim destacamos as seguintes conclusões:

- As infecções por parasitas intestinais, especialmente causadas por protozoários, ainda são detectadas em regiões onde a população tem acesso à infraestrutura pública de abastecimento de água e esgotamento sanitário.
- A detecção dessas infecções em crianças institucionalizadas indica a necessidade de medidas educativas de higiene no controle e prevenção da transmissão.
- A identificação de infecções por *G. duodenalis* associadas aos grupos genéticos AII e B (BIII e BIV) em ambientes que reúnem crianças em idade em que ainda não assimilaram os preceitos básicos de higiene, reforça a possibilidade de transmissão antroponótica (pessoa a pessoa).
- A presença de uma microbiota apresentando um perfil mais saudável em crianças assintomáticas parasitadas por *Blastocystis* e *D. fragilis*, inclusive em coinfeções com *Giardia duodenalis*, sugere que o parasitismo por esses organismos possa ter um caráter mais benéfico do que prejudicial.
- Embora a colonização apenas por *Giardia duodenalis* determine mudanças sobre a microbiota, inclusive em infecções assintomáticas, o exato efeito sobre a diversidade e composição da comunidade bacteriana ainda não está claro.

7. REFERÊNCIAS

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, p. 447–475, 2001.

AMBROISE-THOMAS, P. Emerging parasite zoonoses: The role of host-parasite relationship. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1361–1367, 2000.

ALLAIN, T. et al. Interactions of *Giardia* sp. with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota. **Tissue Barriers**, v. 5, n. 1, p. 1–16, 2017.

ANKARKLEV J. et al. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 6, p. 413-22, 2010.

ANKARKLEV, J.; SVÄRD, S. G.; LEBBAD, M. Allelic sequence heterozygosity in single *Giardia* parasites. **BMC Microbiology**, v. 12, n.3, p.12-65, 2012.

AUDEBERT C. et al. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. **Sci Rep**, v. 5, n.6 ,p.25 - 55, 2016.

BÄCKHED, F. et al. Host- Bacterial Mutualism in the Human Intestine. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1915–1920, 2005.

BÄCKHED F. Programming of host metabolism by the gut microbiota. **Ann Nutr Metab**, v. 58, n. 2, p. 44-52, 2011.

BÄCKHED, F. et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 5, p. 690–703, 2015.

BARASH, N. R.; MALONEY, J. G. crossm *Giardia* Alters Commensal Microbial. v. 85, n. 6, p. 1–18, 2017.

BERRILLI, F. et al. Interactions between parasites and microbial communities in the human gut. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n.11, p. 1–6, 2012.

BERRILLI, F. et al. *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Côte d'Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 3, p. 191–5, 2012.

BEATTY, J. K. et al. *Giardia duodenalis* induces pathogenic dysbiosis of human intestinal microbiota biofilms. v. 47, p. 311–326, 2017.

BÉNÉREÉ, E. et al. Intestinal growth and pathology of *Giardia duodenalis* assemblage subtype AI, AII, B and e in the gerbil model. **Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 424–433, 2012.

BERNSTEIN, C. N.; FORBES, D. Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease and Other Chronic Immune-Mediated Inflammatory Diseases. **Inflamm Intest Dis**. v.2, n.2, p.116-123, 2017.

BERGSTRÖM, A. et al. Establishment of Intestinal Microbiota during Early Life : a Longitudinal , Explorative Study of a Large Cohort of Danish Infants. **Appl Environ Microbiol**. v. 80, n. 9, p. 2889–2900, 2014.

BUSH, A. O. et al. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 575, 1997.

BUCCIGROSSI, V.; NICASTRO, E.; GUARINO, A. Functions of intestinal microflora in children. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 29, n. 1, p. 31–38, 2013.

CACCIO, S. M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 2, p. 75-80, 2008.

CACCIÒ, S. M. et al. A rare cryptosporidium parvum genotype associated with infection of lambs and zoonotic transmission in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 1–2, p. 128–131, 2013.

CARLSON, A. L. et al. Archival Report Infant Gut Microbiome Associated With Cognitive Development. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 2, p. 148–159, 2018.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CERTAD, G. et al. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 561–576, 2017.

CHABÉ, M.; LOKMER, A.; SÉGUREL, L. Gut Protozoa : Friends or Foes of the Human **Gut Microbiota**, v. 33, n. 12, 2018.

COTTON, J. A.; BEATTY, J. K.; BURET, A. G. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 9, p. 925–933, 2011.

COTTON, J. A.; AMAT, C. B.; BURET, A. G. Disruptions of Host Immunity and Inflammation by *Giardia Duodenalis*: Potential Consequences for Co-Infections in the Gastro-Intestinal Tract. **Pathogens**.v.10, n.4, p. 764–792, 2015.

COLLI, C. M. et al. Identical Assemblage of *Giardia duodenalis* in Humans, Animals and Vegetables in an Urban Area in Southern Brazil Indicates a Relationship among Them. **Plos One**, v. 10, p. e0118065, 2015.

COELHO, C. H. D. et al. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. e0006005, 2017.

D'ARGENIO, V.; SALVATORE, F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. **Clínica química acta; international journal of clinical chemistry**, v. 451, n. Pt A, p. 97–102, 2015.

DARYANI, A. et al. Intestinal parasitic infections in Iranian preschool and school children: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 169, p. 69-83,2017.

DAVID, É. B. Prevalência de parasitas intestinais e caracterização genotípica de *Giardia duodenalis* em creche do município de Pratânia, estado de São Paulo. 2011. 157 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

DAVID, É. et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 103, 2015.

DELFINO, B. M. et al. Evolution of socioeconomic conditions and its relation to spatial–temporal changes of giardiasis and helminthiasis in amazonian children. **EcoHealth**, v. 13, n. 4, p. 743-760, 2016.

DURIGAN, M. et al. Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: multilocus genotyping reveals zoonotic potential between clinical and environmental sources in a metropolitan region of brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1-27, 2014.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. Evolution of monitoring for Giardia and Cryptosporidium in water. **Water Research**, v. 123, p. 96–112, 2017.

EY PL, et al. Genetic analysis of Giardia from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. **Eukaryot Microbiol.**, 44(6), 626-35, 1997.

ERLANDSEN SL, BEMRICK WJ. SEM evidence for a new species, Giardia psittaci. **J Parasitol.** 1987.

ERLANDSEN SL, et al. Axenic culture and characterization of Giardia ardeae from the great blue heron (Ardea herodias). **J Parasitol.** 1990.

ERLANDSEN, S. L.; RUSSO, A. P.; TURNER, J. N. Evidence for Adhesive Activity of the Ventrolateral Flange in *Giardia lamblia*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 73–80, 2004.

FARIA, C. P. et al. Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 1-21, 2016.

FEELY DE. Morphology of the cyst of Giardia microti by light and electron microscopy. **J Protozool.** V,35, n.1, p.52-54, 1988.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 1, p. 110-140, 2011.

FILICE FP. Studies on the cytology and life history of a Giardia from the laboratory rat. *Univ Calif Publ Zool.* 1952; 57: 53-146.

FLETCHER, S. M. et al. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. **Clinical Microbiology Review**, v. 25, n. 3, p. 420-449, 2012.

FONSECA, R. E. P. High prevalence of enteroparasites in children from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 70, n. 3, p. 566-571, 2017.

FORBES, J. D. et al. Association of Exposure to Formula in the Hospital and Subsequent Infant Feeding Practices With Gut Microbiota and Risk of Overweight in the First Year of Life. **JAMA Pediatr.** v. 172, n. 7, p. 1–11, 2018.

FOUHY, F. et al. four years after birth. **Nature Communications**, v. 3, n. 10, p. 1–10, 2019.

FRANK DN, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.104: n.3 p.13780–13785, 2007.

FRANZÉN, O. et al. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: Is human giardiasis caused by two different species? **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, 2009.

GUIMARÃES S, SOGAYAR MI, FRANCO MF. *Giardia duodenalis*: inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 41, p. 45-58, 1999.

HILLMAN A. et al. Confirmation of a unic species of *Giardia*, parasitic in the quenda (*Isoodoin obesulus*). **International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 5, p. 110-115, 2016.

HOMAN, W. L.; MANK, T. G. Human giardiasis: Genotype linked differences in clinical symptomatology. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 822–826, 2001.

HOPKINS, R.M, et al. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **J. Parasitol.**v.83, n.1, p.44-51, 1997.

IGNACIO, C. F. et al. Socioenvironmental conditions and intestinal parasitic infections in Brazilian urban slums: a cross-sectional study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, p. e56, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Brasil em síntese**. Rio de Janeiro: IBGE, 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/itapetininga/panorama>>. Acesso em: 7 nov. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA IBGE. Censo demográfico 2000. Disponível em: <http://WWW.IBGE.gov.br>. Acesso em: 16 de Agosto de 2010.

JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8836–8847, 2015.

JARUSEVICIUS, J. Avaliação da Diversidade Microbiana Intestinal de Populações Naturais do Mosquito *Aedes Aegypti*. Tese – (Doutorado em Ciências Biológicas (Genética)- Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, Botucatu, p.57. 2018.

JERLSTRÖM-HULTQVIST, J. et al. Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. **BMC Genomics**. v.7, n.11, p. 7-11, 2010

KARANIS P, KOURENTI C, SMITH H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **J Water Health**. 2007; v. 5, n.1, p.1-38, 2007.

KOHLI, A. et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 7, p. 718-725, 2008.

KORPELA, K. et al. Probiotic supplementation restores normal microbiota composition and function in antibiotic-treated and in caesarean-born infants. p. **Microbiome**. v.6, n.6, p.1-11, 2018.

KROGSGAARD, L. R. et al. Characteristics of the bacterial microbiome in association with common intestinal parasites in irritable bowel syndrome. **Clinical and Translational Gastroenterology**,v.19, n.9, p.161, 2018.

KUMBHARE SV et al. Factors influencing the gut microbiome in children: from infancy to childhood. **J Biosci**. v.44 n.2. 2019.

KUNSTLER J. Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. C R **Seances Soc Biol Fil**. 1882; 95: 347-9.

LALLE, M. et al. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested-polymerase chain reaction assay. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 203-205, 2005.

LANE, S.; LLOYD, D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. **Critical reviews in microbiology**, v. 28, n. 2, p. 123–47, jan. 2002.

LEE, S. et al. Gene-targeted metagenomic analysis of glucan-branching enzyme gene profiles among human and animal fecal microbiota. **ISME Journal**, v. 8, n. 3, p. 493–503, 2014.

LEBBAD, M. et al. Multilocus Genotyping of Human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1262, 2011.

LEBBA, V et al. Gut microbiota related to *Giardia duodenalis*, *Entamoeba* spp. and *Blastocystis hominis* infections in humans from Côte d'Ivoire. **J Infect Dev Ctries**, v.10, n. 9, p.1035-1041,2016.

LIMA JUNIOR, O. A. et al. High occurrence of giardiasis in children living on a “landless farm workers” settlement in Araras, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 3, p. 185-188, 2013.

LIU, S. M. et al. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 108, n. 1, p. 137–140, 2000.

LIPOLDOVÁ, M. *Giardia* and Vilém Dušan Lamb. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. 1–4, 2014.

LYU, Z. *et al.* A new species of *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcomastigophora: Hexamitidae) in hamsters. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2018.

LUJAN HD, SVARD S (2011) *Giardia* a model organism. Springer Wien New York, printing by Holzhausen Druck GmbH, 1140 Wien, Austria.

MARTINS-MELO, F. et al. Reprint of “Neurocysticercosis-related mortality in Brazil, 2000–2011: epidemiology of a neglected neurologic cause of death” **Acta Tropica**, v. 165, p. 170-178, 2017.

MILANI, C. *et al.* crossm The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition , Activities , and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 81, n. 4, p. 1–67, 2017.

MCHARDY, I. H. et al. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 712–720, 2014.

MONIS, P.T. et al. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. **Parasitology**, v.116, p.7–19, 1998.

MONIS PT, ANDREWS RH, MAYRHOFER G, EY PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. **Mol Biol Evol.** v.16, p.1135–44, 1999.

MONIS, P. T. et al. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 29–38, 2003.

MONIS, P. T.; CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C. A. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 93-100, 2009.

MORRISON, H.G, et al. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Science.** v. 28, n.317, p.1921-6, 2007.

NUNES, B. C.; PAVAN, M. G.; JAEGER, L. H.; MONTEIRO, K. J. L.; XAVIER, S. C. C.; MONTEIRO, F. A.; BÓIA, M. N.; CARVALHO-COSTA, F. A. Spatial and Molecular Epidemiology of *Giardia intestinalis* Deep in the Amazon ., [s. l.], p. 1–8, 2016.

OLIVEIRA-ARBEX, A. et al. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare centre: evidence of high risk for anthroponotic transmission. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 7, p. 1418-1428, 2016.

OMAROVA, A. et al. Protozoários Parasitas em Água Potável: Uma Abordagem do Sistema para Melhoria da Água, Saneamento e Higiene nos países em desenvolvimento. **Int J Environ Res Saúde Pública.** 2018.

PARTIDA-RODRÍGUEZ O. et al. Human Intestinal Microbiota: Interaction Between Parasites and the Host Immune Response. **Arch Med Res.** v.48, n.8, p.690-700,2017.

PANNARAJ, P. S. *et al.* Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. **JAMA Pediatr.** v. 90095, n. 7, p. 647–654, 2017.

PAVANELLI, M. F. et al. Comparative study of effects of assemblages All and BIV of *Giardia duodenalis* on mucosa and microbiota of the small intestine in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 101, n. 02, p. 563–571, 2018.

PALMER, C. et al. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. **Plos Biol.** v. 5, n. 7, 2007.

PIPIKOVÁ J. et al. First report on *Giardia duodenalis* assemblage F in Slovakian children living in poor environmental conditions. **J Microbiol Immunol Infect.** v,1684, n.18, p.30157, 2018.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.

RAMAKRISHNA, B. S. The normal bacterial flora of the human intestine and its regulation. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 41, n. SUPPL. 1, p. 2–6, 2007.

RAMESHMA, MALIK SB, LOGSDON JM JR. A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. **Curr Biol.** v. 26, n.15, p.185-91,2005.

RYAN, U. et al. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. **J Parasitol.** 2003.

RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International journal for parasitology**, v. 43, n. 12–13, p. 943–56, 2013.

RYAN, U. *et al.* *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. **International Journal for Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 1–11, 2019.

RYAN, P. M. *et al.* Paediatrician 's perspective of infant gut microbiome research : current status and challenges. **Arch Dis Child.** v.104, n.7, p. 701–705, 2019.

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

REBOLLA, M. F. et al. High prevalence of *Blastocystis* spp. infection in children and staff members attending public urban schools in São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 58, p. 31, 2016.

RODRÍGUEZ, J.M. et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microb Ecol Health Dis.** v.2, n.26, p.26-50. 2015.

SANDOVAL, N. R. et al. A survey of intestinal parasites including associated risk factors in humans in Panama. **Acta Tropica**, v. 147, p. 54-63, 2015.

SANTOS, C. K. S. et al. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 8, p. 473-479, 2012.

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

SHIN, J. A. E. H. et al. *Clostridium difficile* Infection. **Microbiol Spectr**, v. 4, n.3, p. 1–21, 2016.

SMITH, H. V. et al. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 160–167, 2006.

STILES CW. ZOOLOGICAL NOMENCLATURE. **Science**. 1932 Jul 8;76(1958):35.

SOUZA, S. L. P. et al. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 258-264, 2007.

SPRONG, H.; CACCIÒ, S. M.; VAN DER GIESSEN, J. W. B. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, p. 1–12, 2009.

STENSVOLD, C. R.; VAN DER GIEZEN, M. Associations between Gut Microbiota and Common Luminal Intestinal Parasites. **Trends in Parasitology**, p. 1–9, 2018.

STEWART, C. J. et al. early childhood from the TEDDY study. **Nature**. v. 562 n.7728, p. 583-588, 2018.

SULAIMAN, I. M. et al. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia Duodenalis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n.11, p. 1444-1452, 2003.

SCICLUNA, S. M.; TAWARI, B.; CLARK, C. G. DNA barcoding of *Blastocystis*. **Protist**, v. 157, n. 1, p. 77–85, 2006.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

THOMPSON, R. C. A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12, p. 1259-1267, 2000.

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

THOMPSON, R. C.; MONIS, P. *Giardia* from genome to proteome. **Advances in Parasitology**, v. 78, p. 57-95, 2012.

THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, n. 6, p. 315–323, 2019.

TITO, R. Y. et al. Population-level analysis of Blastocystis subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. **Gut**, v.68, n.7, p. 1180–1189, 2019.

TSUI, C. K.-M. *et al.* Beaver Fever: Whole-Genome Characterization of Waterborne Outbreak and Sporadic Isolates To Study the Zoonotic Transmission of Giardiasis. **mSphere**, v. 3, n. 2, p. 1–17, 2018.

TORO-LONDONO, M. A. et al. Intestinal parasitic infection alters bacterial gut microbiota in children. **PeerJ**, v.7, n.7, p. 1–24, 2019.

VOLOTÃO, A. C. et al. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using β -giardin gene: a phylogenetic analysis. **Acta Tropica**, v. 102, n. 1, p. 10–19, 2007.

WANG, W. et al. Application of metagenomics in the human gut microbiome. v. 21, n. 3, p. 803–814, 2015.

WEGAYEHU, T. et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from calves in Oromia Special Zone, Central Ethiopia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 281–288, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. **WHO child growth standards**. Growth reference data for 5-19 years.

Referências

Geneva: World Health Organization, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/growthref/en/>>. Acesso em: 15 maio 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. **WHO child growth standards**: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization, 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/childgrowth/en/>>. Acesso em: 17 maio 2018.

YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**.v.9, n. 486, p.222-7, 2012.