

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 02/10/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**O TRANSCRIPTOMA DOS ESPOROZOÍTOS DE
Cryptosporidium parvum E ESTÁGIOS INTRACELULARES**

Lucas Vinicius Shigaki de Matos

Médico Veterinário

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**O TRANSCRIPTOMA DOS ESPOROZOÍTOS DE
Cryptosporidium parvum E ESTÁGIOS INTRACELULARES**

Lucas Vinicius Shigaki de Matos

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani

Coorientador: Prof. Dr. Giovanni Widmer

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária, área: Medicina Veterinária Preventiva

2018

M433t	<p>Matos, Lucas Vinicius Shigaki de</p> <p>O transcriptoma dos esporozoítos de <i>Cryptosporidium parvum</i> e estágios intracelulares / Lucas Vinicius Shigaki de Matos. -- Jaboticabal, 2018</p> <p>47 p. : tabs., fotos + 1 CD-ROM</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientadora: Katia Denise Saraiva Bresciani</p> <p>Coorientador: Giovanni Widmer</p> <p>1. Bioinformática. 2. Criptosporidiose. 3. Excitação. 4. Expressão gênica. 5. RNA. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).


Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: O TRANSCRIPTOMA DOS ESPOROZOÍTOS DE *Cryptosporidium parvum* E ESTÁGIOS INTRACELULARES

AUTOR: LUCAS VINICIUS SHIGAKI DE MATOS
ORIENTADORA: KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
COORIENTADOR: GIOVANNI WIDMER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:


Prof. Adjunto KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. JANCARLO FERREIRA GOMES
Faculdade de Ciências Médicas (FCM) / Campinas/SP


Prof. Dr. GILSON PEREIRA DE OLIVEIRA
Centro de Pesquisa em Sanidade Animal - CPPAR / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. JOÃO LUIS GARCIA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva-UEL / Londrina/PR


Prof. Dr. GILSON HELIO TONIOLLO
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 02 de outubro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS VINICIUS SHIGAKI DE MATOS – Nascido em São José do Rio Preto, São Paulo, em 09 de Dezembro de 1987, filho de José Carlos de Matos e Helaine Cristina Shigaki de Matos. Em 2007, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba FMVA/UNESP câmpus de Araçatuba, obtendo título de Médico Veterinário em 2011. Durante a graduação, foi bolsista da Pró Reitoria de Extensão Universitária (PROEX) no período de 2009 a 2011 sob orientação da Professora Associada Katia Denise Saraiva Bresciani; estagiou de junho a agosto de 2011 no Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR) sob orientação do Professor Titular Alvimar José da Costa e tornou-se pesquisador neste Centro de pesquisas de Novembro de 2011 a Julho de 2013. No ano de 2012 iniciou o mestrado com bolsa Fapesp na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP) câmpus de Jaboticabal/SP obtendo o título em julho de 2014. Foi pesquisador de Parasitologia e Grandes Animais no Centro de Pesquisas em Animais do Brasil (CPABR) de março de 2015 a julho de 2016. Ingressou no doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área da Medicina Veterinária Preventiva, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP câmpus de Jaboticabal), sob orientação da Professora Associada Katia Denise Saraiva Bresciani e coorientação do Professor Dr. Giovanni Widmer.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia”. (Robert Collier)

Dedico e Ofereço

Aos meus pais, José Carlos e Helaine por sempre ter me apoiado em minhas
decisões.

Ao meu irmão Daniel por me dar forças e conselhos quando necessário.

Aos meus avôs, Joaquim e João (*in memorian*) e avós Maria e Aparecida (*in
memorian*).

AGRADECIMENTOS

A Deus por me oferecer saúde, uma família maravilhosa e por colocar pessoas boas em meu caminho.

Aos meus queridos pais, pelo amor incondicional. Por sempre estarem ao meu lado e me ter educado para a vida.

Ao meu irmão, meu grande exemplo de honestidade e simplicidade. Meu melhor amigo, que está sempre ao meu lado, dando conselhos e opinando em minhas decisões.

A minha namorada, Julia, pelo amor, respeito e por me apoiar nos momentos difíceis.

A toda minha família que sempre esteve ao meu lado, garantindo bons momentos de alegria e afeto.

A minha orientadora, mãe e amiga, Profa. Ass. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani, uma pessoa inteligente, humilde e competente, meu exemplo profissional e que sempre esteve a meu lado me ajudando a tornar tudo possível.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Giovanni Widmer, por ser um amigo e exemplo de competência. Obrigado pela paciência e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. John McEvoy da North Dakota State University pelo auxílio intelectual e de forma financeira no desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Abhineet Sheoran da Tufts Cummings por fornecer os anticorpos e ideias para a realização da pesquisa.

Ao Prof. Saul Tzipori Tufts Cummings pelo apoio a pesquisa e ceder os laboratórios do Department of Infectious Disease and Global Health para a execução dos experimentos.

A Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (UNESP), responsável pela minha formação profissional, e que me proporcionou tantos momentos proveitosos

durante minha vida acadêmica.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp Jaboticabal, por ter me preparado para a vida profissional.

A Tufts Cummings por oferecer toda a estrutura para a realização dos experimentos.

Aos membros da minha banca de Qualificação Profa Ass. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani, Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo e Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe e aos membros da minha banca de Defesa Dr. Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira, Prof. Dr. Jancarlo Ferreira Gomes e Prof. Dr. João Luis Garcia pelas sugestões e melhorias no trabalho.

A minha segunda família, minha República In-Dependência. Obrigado pelas conversas e conselhos. Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil. Obrigado a cada um por acrescentar em minha vida muitos momentos de alegria, companheirismo, que só uma família é capaz de dividir.

Ao Bruno por me auxiliar nas análises de bioinformática.

Aos amigos da Tufts Cummings: Ruby, Ali, Bairon, Julia, Justyna e Denise. Obrigado pela amizade, companheirismo e pelos inúmeros conselhos.

Aos meus amigos da Unesp, Weslen e Luiz, pelo companheirismo, ensinamentos e trabalhos realizados.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a minha formação profissional com orientações, críticas ou elogios.

Sumário	Páginas
CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO	v
CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Análise RNA-seq.....	3
2.2. Expressão Gênica.....	4
2.3. Ontologia de Genes.....	6
2.4. Criptosporidiose.....	6
OBJETIVO GERAL.....	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
REFERÊNCIAS	9
CAPÍTULO 2 - O TRANSCRIPTOMA DOS ESPOROZOÍTOS DE <i>Cryptosporidium</i> <i>parvum</i> E ESTÁGIOS INTRACELULARES.	16
Introdução.....	17
Material e Métodos.....	19
Obtenção dos oocistos.....	19
Preparo das células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney)	21
Experimento com células MDBK para avaliar a penetração de esporozoítos.....	22
Métodos de biologia molecular e análise dos dados.....	23
Qualidade do RNA.....	24
Análise de expressão gênica.....	25
Análises LDA e RDA.....	27
Resultados.....	27
Expressão gênica diferencial.....	29
Discussão.....	30
Conclusão.....	33
Referências.....	33

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Institutional Animal Care and Use Committee
Tufts University & Tufts Medical Center
136 Harrison Avenue
Boston, Massachusetts 02111
Phone: (617) 636-4109 Fax: (617) 636-8354

April 13, 2016

Dr. Giovanni Widmer
Tufts University
Cummings School of Veterinary Medicine

Re: Verification of Approval by the Institutional Animal Care and Use Committee for
Research Involving Animals

Dear Dr. Widmer,

The Institutional Animal Care and Use Committee reviewed your NIH proposal "The role of host glycans in *Cryptosporidium* development". The animal work (mouse work only) in this proposal is congruent with the animal protocol #G2016-40 entitled "Genetics of *Cryptosporidium*".

#G2016-40 was originally approved on **April 11, 2016**.

Tufts University Cummings School of Veterinary Medicine has an Animal Welfare Assurance on file with the Office of Laboratory Animal Welfare at the National Institutes of Health. The Assurance number is **A4059-01**.

If you have any questions, please call me at 508-887-4639.

Best regards,



Ann Holm, B.S., CPIA
IACUC Coordinator
Tufts University
T: 508-887-4639
ann.holm@tufts.edu

LISTA DE ABREVIATURAS

2E5: anticorpo específico para esporozoítos

5F10: anticorpo específico para oocistos

SFB : soro fetal bovino

FDA: Food and Drug Administration

FPKM: Fragments Per Kilobase Million

GalNAc:N-Acetilgalactosamina(Benzyl 2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside).

GO: Gene Ontology

HCT-8: Human ileocecal adenocarcinoma

LDA: Linear discriminant analysis

MDBK: Madin-Darby Bovine Kidney

mL - Mililitro

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

PBS: Phosphate buffered saline

RDA: Redundancy analysis

RQN: RNA Quality Number

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1. Estatística do mapeamento do genoma de amostras de <i>Cryptosporidium parvum</i> em células de <i>Bos taurus</i> ao longo do tempo de 2 a 48h, esporozoítos e oocistos.....	49
Tabela 2. Funções significativamente enriquecidas no transcriptoma da célula hospedeira incubadas por 48 horas e infectadas com <i>Cryptosporidium parvum</i> com base na análise dos valores de FPKM significativos nas análises de LDA e RDA.....	52

O TRANSCRIPTOMA DOS ESPOROZOÍTOS DE *Cryptosporidium parvum* E ESTÁGIOS INTRACELULARES

RESUMO – Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* spp. são parasitos intracelulares obrigatórios, pertencentes ao filo Apicomplexa. Estes parasitos são capazes de se desenvolver nas microvilosidades das células epiteliais do intestino delgado de hospedeiros vertebrados, sendo potencialmente letais em adultos e crianças imunodeficientes. Não existem medicamentos eficazes para controlar essa doença e o desenvolvimento de medicamentos é dificultado pela falta de métodos de cultura eficazes que atuam permitindo detecção completa do ciclo de vida do parasito. Uma lacuna fundamental existe em relação ao entendimento de como os esporozoítos de *Cryptosporidium* spp. interagem com as células para iniciar a invasão e sua replicação. Assim, foi estudada essa lacuna para explicar a distinção entre aspectos da biologia do *Cryptosporidium* spp. e a especificidade do hospedeiro. Por meio de um ensaio de imunofluorescência detectou-se separadamente parasitos ligados e que invadiram às células e qual foi sua evolução ao longo de 2, 24 e 48 horas do parasitismo nas células hospedeiras. Com base nos genes mais significativos nas análises LDA (análise linear discriminante) e RDA (análise de redundância) e com maior valor FPKM (fragmentos por quilobase de transcritos por milhão de leituras mapeadas), pode-se perceber uma diferença significativa na expressão gênica desse parasito extracelular e intracelular. Os genes que mais se expressaram em células incubadas por 48 horas após a infecção foram analisados quanto as espécies biológicas de Ontologia de Genes (GO) e estes mostraram significativamente os processos enriquecidos e funções do parasito intracelular. O conhecimento dos genes que são mais expressados pelo *Cryptosporidium parvum* é muito importante pelo fato de conhecer o comportamento desse parasito nas células, e futuramente impedir sua replicação celular, e desenvolver uma droga eficaz capaz de combater este parasito. Diferenças significativas na expressão gênica foram detectadas,

tanto em termos de diversidade quanto de perfil transcricional, por meio da análise de RNA-Seq de transcriptoma replicados intracelulares e esporozoítos. Considerando que as funções enriquecidas do transcriptoma intracelular são relacionadas aos ribossomos e síntese proteica, enquanto dos esporozoítos não possui uma assinatura funcional característica. Genes altamente expressos em esporozoítos parecem cumprir funções mais especializadas enquanto nas células infectadas com *C. parvum* observamos várias funções metabólicas relacionadas a síntese proteica.

Palavras-chave: bioinformática, criptosporidiose, excitação, expressão gênica, RNA.

THE TRANSCRIPT OF SPOROZOITES OF *Cryptosporidium parvum* AND INTRACELLULAR STAGES

ABSTRACT: The protozoa of the genus *Cryptosporidium spp.* are obligate intracellular parasites that belongs to the phylum Apicomplexa. These parasites are capable to develop in the microvilli of epithelial cells of the small intestine of vertebrate hosts, being potentially lethal in immunodeficient adults and children. There are no effective medications to control cryptosporidiosis, and drug development is hampered by the lack of effective culture methods that act to allow the complete life cycle of the parasite. It is fundamental to understand how *Cryptosporidium spp.* sporozoites interact with cells to initiate invasion and replication. Thus, this subject has been studied to explain the distinction between *Cryptosporidium spp.* biology and host specificity. By an immunofluorescence assay we detected bounded parasites invading host cells and their evolution over two, 24 and 48 hours. Based on the most significant genes in the LDA (Linear Discriminant Analysis) and RDA (redundancy analysis) analysis and with higher FPKM value (fragments per kilobase of transcribed per million mapped readings), we can perceive a significant difference in the expression of this extracellular and intracellular parasite. The genes that most expressed in cells incubated for 48 hours after infection were analyzed for the biological species of Ontology of Genes (GO) that show significantly the enriched processes and functions of the intracellular parasite. The knowledge of the genes that are most expressed by *C. parvum* is very important in order to better understand the behavior of this parasite in the cells, and in the future prevent its cellular replication and develop an effective drug capable of countering this parasite. Significant differences in gene expression were detected, both in terms of diversity and transcriptional profile, by RNA-Seq analysis of replicated intracellular and sporozoite transcripts. Considering that the enriched functions of the intracellular transcriptome are related to the ribosomes and protein synthesis, the transcriptome of sporozoites doesn't have a characteristic functional signature. Genes highly

expressed in sporozoites seem to execute more specialized functions whereas in cells infected with *C. parvum* we observed several metabolic functions related to protein synthesis.

Keywords: bioinformatics, cryptosporidiosis, excystation, gene expression, RNA.

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* spp. são parasitos intracelulares obrigatórios, pertencentes ao filo Apicomplexa, tem distribuição cosmopolita, acometem 150 espécies de vertebrados e está distribuído em 90 países nos cinco continentes. Trata-se de uma antropozoonose cosmopolita de interesse tanto da patologia humana como animal, sendo considerado um dos protozoários patogênicos mais prevalentes em vertebrados (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000), incluindo mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (SLAPETA, 2013). Estes parasitos são capazes de se desenvolver nas microvilosidades das células epiteliais do intestino delgado de hospedeiros vertebrados, sendo potencialmente letais em adultos e crianças imunodeficientes (XIAO et al., 2004; CERTAD et al., 2017).

A rápida multiplicação assexuada do parasito no epitélio do intestino delgado compromete a função desse órgão, o que pode ocasionar uma diarreia severa, levando a sérias consequências a longo prazo (KEUSCH et al., 2013). Não existem medicamentos eficazes para controlar a criptosporidiose, e o desenvolvimento desses é dificultado pela falta de métodos de cultura eficazes que atuam permitindo o completo ciclo de vida do parasito.

Os métodos comumente utilizados para cultivar *Cryptosporidium* spp. (CURRENT e HAYNES, 1984) não suportam a conclusão do ciclo de vida desse parasito, possivelmente devido à diferenciação ineficiente de gametas e/ou fertilização deficiente. Os oocistos excretados nas fezes de animais infectados naturalmente ou experimentalmente podem ser utilizados para infectar células epiteliais cultivadas. Os oocistos liberam esporozoítos que são capazes de invadir células hospedeiras no epitélio intestinal ou em cultura. Após a invasão, os esporozoítos se transformam em trofozoítos, os quais se dividem assexuadamente

originando os merontes de primeira e segunda geração em um processo conhecido como merogonia. Os estádios posteriores, especificamente a fase sexual do ciclo de vida, não são capazes de ocorrer em monocamadas de células convencionais.

Uma das maiores dificuldades em se realizar estudos com *Cryptosporidium* spp. é o fato dele infectar células ileocecais humanas (HCT-8) e outras linhagens de células epiteliais intestinais *in vitro*, entretanto, não completa seu ciclo de vida e produz oocistos infectantes quando cultivada em uma monocamada típica de cultura de células (UPTON, et al,1994). Após a infecção *in vitro* de uma monocamada de célula hospedeira, o *Cryptosporidium parvum* progride por meio dos estádios de vida assexuada (merozoítas dos tipos I e II) e sexual (microgamonte e macrogamonte), mas nenhum oocisto infeccioso viável é produzido (FAYER e UNGAR et al., 1986).

Em comparação com os organismos do filo Apicomplexa, a regulação gênica durante o ciclo de vida do *Cryptosporidium* spp. tem sido pouco estudada (MAUZY et al., 2012, LIPPUNER et al., 2018). Refletindo os obstáculos técnicos enfrentados pela pesquisa sobre esses parasitos, as análises do transcriptoma de *Cryptosporidium* spp. baseadas em RNA-Seq são limitadas a um estudo bastante abrangente da expressão gênica extra e intracelular de *C. parvum* no epitélio intestinal de bezerros e em cultura de células (LIPPUNER et al., 2018) e a uma análise do transcriptoma do ciclo de vida de *C. parvum* em organoides desenvolvidos a partir do intestino delgado e células epiteliais do pulmão (HEO et al., 2018). Com o objetivo de melhorar a compreensão da regulação gênica em *Cryptosporidium* spp., foi realizada uma análise de RNA-Seq do transcriptoma de *Cryptosporidium parvum* em oocistos, esporozoítos e monocamadas de células infectadas.

Conclusão

Por meio da análise de RNA-Seq de transcriptomas intracelulares e esporozoítos, ambos replicados, foram detectadas diferenças significativas na expressão gênica, tanto em termos de diversidade quanto de perfil transcricional. Considerando que as funções enriquecidas do transcriptoma intracelular são relacionadas aos ribossomos e síntese proteica, o transcriptoma dos esporozoítos não possui uma assinatura funcional característica. Genes altamente expressos em esporozoítos parecem cumprir funções mais especializadas enquanto nas células infectadas com *C. parvum* observou-se várias funções metabólicas relacionadas a síntese proteica.

Referências

Abrahamsen, M. S., Templeton, T. J., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Zhu, G., Lancto, C. A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G.A., Xu, P., Bankier, A.T., Dear, P.H., Konfortov, B. A., Spriggs, H.F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind,

L., Kapur, V. 2004. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*. 304, 441–445. doi: 10.1126/science.1094786.

Afgan, E., Baker, D., Van Den Beek M., Blankenberg, D., Bouvier D., Cech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Eberhard, C., Grüning, B., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Von Kuster, G., Rasche, E., Soranzo, N., Turaga, N., Taylor, J., Nekrutenko, A., Goecks, J. 2016. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic. Acids. Res.* 44 W1, W3–W10. doi: 10.1093/nar/gkw343.

Assis, D. C., Resende, D. V., Santos, M. C., Correia, D., Oliveira-Silva, M. B. 2013. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 55(3), 149-154.

Belloze, K. T., Dávila, A., Araujo, R. M., Cavalcanti, M. C. Ampliando o Uso Colaborativo de Ontologias em Processos de Anotação Genômica. In: E-Science Workshop- SBBB/SBES, p. 71-80. João Pessoa, Paraíba, Brazil, 2007.

Benjamini, Y., Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.* 57(1), 289–300.

Brosnahan, A. J., Brown, D. R. 2012. Porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells in microbiological investigations. *Vet. Microbiol.* 156, 229–237. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.10.017.

Certad, G., Viscogliosi, E., Chabé, M., Cacciò, S. M. 2017. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends in Parasitology*, 33(7), 561-576.

Cieloszyk, J., Gonía, P., García, A., Remachab, M. A., Sánchez, E., Clavel, A. 2012. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2(30), 549-551.

Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., Robles, M. (2005) Blast2go: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21, 3674–3676.

Current, W. L., Thaynes, B. 1984. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science*, 224 (4649), 603-605.

EBI. 2018. European Bioinformatic Institute. Disponível em (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO>). Acesso em: 15 de julho de 2018.

Fayer, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. 2010. Exp. Parasitol. 124(1), 90-97.

Heiges, M., Wang, H., Robinson, E., Aurrecochea, C., Gao, X., Kaluskar, N., Rhodes, P., Wang, S., He, C. Z., Su, Y., Miller, J., Kraemer, E., Kissinger, J. C. 2006. CryptoDB: a *Cryptosporidium* bioinformatics resource update. Nucleic. Acids. Res. 34, D419–D422. doi: 10.1093/nar/gkj078.

Jiao, X., Sherman, B. T., Huang, D. W., Stephens, R., Baseler, M. W., Lane, H. C., Lempicki, R. A. 2012. DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. Bioinformatics. 28, 1805–1806. doi: 10.1093/bioinformatics/bts251.

Kim, D, Langmead, B., Salzberg, S.L. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. Nat. Methods. 12, 357–360. doi: 10.1038/nmeth.3317.

Maikai, B. V., Baba-Onoja, E. B. T., Elisha, I. A. 2013. Contamination of raw vegetables with *Cryptosporidium* oocysts in markets within Zaria metropolis, Kaduna State, Nigeria. Food Control, Vurrey, 31(1), 45-48.

Mirhashemi, M. E., Noubary, F., Chapman-Bonofiglio, S., Tzipori, S., Huggins, G. S., & Widmer, G. 2018. Transcriptome analysis of pig intestinal cell monolayers infected with *Cryptosporidium parvum* asexual stages. Parasit. & Vectors. 11, 176. <http://doi.org/10.1186/s13071-018-2754-3>.

Moore, C. E., Elwin, K., Phot, N., Seng, C., Suy, K., Mao, S., Kumar, V., Nader, J., Bousfield, R., Perera, S., Bailey, J. W., Beeching, N. J., Day, N. P., Parry, C. M. Chalmers, R. M. 2016. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Species and *Giardia duodenalis* from Symptomatic Cambodian Children. PLoS Negl. Trop. Dis. 10(7). e0004822. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004822>

Morada, M., Lee, S., Gunther-Cummins, L., Weiss, L. M., Widmer, G., Tzipori, S., Yarlett, N. 2015. Continuous culture of *Cryptosporidium parvum* using hollow fiber technology. Int. J. Parasitol. 46(1), 21-29. doi: 10.1016/j.ijpara.2015.07.006

Okhuysen, P. C., Rich, S. M., Chappell, C. L., Grimes, K. A., Widmer, G., Feng, X., Tzipori, S. 2002. Infectivity of a *Cryptosporidium parvum* Isolate of Cervine

Origin for Healthy Adults and Interferon- γ Knockout Mice, *J. Infect. Dis.*, 185(9), 1320–1325. <https://doi.org/10.1086/340132>.

Peakall, R., Smouse, P. E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. 2012. *Bioinformatics*. 28, 2537–2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.

Ryan, U., Fayer R, Xiao, L. 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*. 141, 1667-1685.

Ryan, U., Hijjawi, N. 2015. New developments in *Cryptosporidium* research. *Int. J. Parasitol.* 45, 367-373.

Savioli, L., Smith, H., Thompson, A. 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'neglected diseases initiative'. *Trends in Parasitol.* 22(5), 203-208.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., Weber, C.F. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., Huttenhower, C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 12(6) R60. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.

Shoultz, D. A., de Hostos, E. L., Choy, R. K. M. 2016. Addressing *Cryptosporidium* Infection among Young Children in Low-Income Settings: The Crucial Role of New and Existing Drugs for Reducing Morbidity and Mortality. *PLoS Negl. Dis.* 10(1): e0004242. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004242>

Smith, H. V., Cacció, S. M., Tait, A., Mclauchlin, J., Thompson, A. R. C. 2006. Tools for investigating the environment transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends in Parasitol.* 22(4), 160-167.

Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Baren, V., Marijke, J., Salzberg, S. L., Wold, B. J., Pachter, L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* 28 (5), 511–515.

Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S. J. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. J. Clin. Microbiol. Reviews, Washington, 17(1) 72-97.

Widmer, G., Feng, X., Tanriverdi, S. 2004. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* with microsatellite markers. Methods Mol. Biol. 268, 177–187.

Widmer, G., Lee, Y., Hunt, P., Martinelli, A., Tolkoff, M., Bodi, K. 2012. Comparative genome analysis of two *Cryptosporidium parvum* isolates with different host range. Infect. Genet. Evol. 12(6), 1213-1221.

Widmer, G., Ras, R., Chalmers, R. M., Elwin, K., Desoky, E., Badawy, A. 2015. Population structure of natural and propagated isolates of *Cryptosporidium parvum*, *C. hominis* and *C. meleagridis*. Environ. Microbiol. 17(4), 984-993.