

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

DÉBORA REGINA ROMUALDO DA SILVA

**O PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL NA GRAVIDADE DA
CRIPTOSPORIDIOSE NO CAMUNDONGO**

**Araçatuba
2025**

DÉBORA REGINA ROMUALDO DA SILVA

**O PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL NA GRAVIDADE DA
CRIPTOSPORIDIOSE NO CAMUNDONGO**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientador: Prof. Ass. Dr. Alex Akira Nakamura

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Felippelli

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

Araçatuba

2025

S586p

Silva, Débora Regina Romualdo da

O papel da microbiota intestinal na gravidade de criptosporidiose no camundongo / Débora Regina Romualdo da Silva. -- Araçatuba, 2025

73 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientador: Alex Akira Nakamura

Coorientador: Gustavo Felippelli; Marcelo Vasconcelos Meireles

1. Cryptosporidium spp.. 2. Zoonoses. 3. Microbiota fecal. 4. Tratamento. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE DÉBORA REGINA ROMUALDO DA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.

Aos 17 dias do mês de fevereiro do ano de 2025, às 10h30min, totalmente por meios remotos, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de DÉBORA REGINA ROMUALDO DA SILVA, intitulada **O papel da microbiota intestinal na gravidade da criptosporidiose no camundongo**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Ass. Dr. ALEX AKIRA NAKAMURA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Dra. ANAIÁ DA PAIXÃO SEVÁ (Participação Virtual) Doutora em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP, Dr. GIOVANNI FRIEDRICH WIDMER (Participação Virtual) do(a) Department of Infectious Disease & Global Health / Cummings School of Veterinary Medicine - Tufts University. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Ass. Dr. ALEX AKIRA NAKAMURA

AGRADECIMENTOS

A finalização deste projeto é um dos maiores triunfos da minha existência. Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus, pois sempre me fortaleceu e, mesmo diante das adversidades, consegui continuar avançando.

Aos meus pais, Sandra Pereira da Silva e Elias Romualdo da Silva, que desde a minha infância me ensinaram o valor da perseverança e me inspiraram a seguir meus sonhos. À minha irmã, Vanessa Aparecida Romualdo da Silva, por sua presença constante nos momentos desafiadores. À minha amiga Alessandra Balbino da Silva, por sua amizade e apoio. Ao meu esposo, Giovanni Brandão Elias, por sua paciência, carinho e parceria inabalável, por se aventurar ao meu lado em momentos incertos, segurando minha mão e enxugando minhas lágrimas. Aos meus sogros, Ana Claudia Brandão Elias e Paulo César Elias, pelo apoio e carinho de sempre.

Aos professores Dr. Alex Akira Nakamura e Dr. Giovanni Widmer, pelas motivações, compreensão e amizade, por acompanharem todo o processo de criação deste trabalho, oferecendo orientações importantes e contribuindo com o meu crescimento pessoal.

Aos professores, em especial à professora Dra. Kátia Denise Saraiva Bresciani e ao coordenador do Programa de Pós-Graduação, por ajudarem no meu desenvolvimento pessoal. A todos os colaboradores do Departamento de Produção e Saúde Animal – DPSA e da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – FMVA/UNESP. Ao Departamento de Doenças Infecciosas e Saúde Global da Universidade Tufts, especialmente à equipe do laboratório do professor Dr. Widmer, pelo suporte e infraestrutura que possibilitaram a execução deste trabalho.

Às amigadas formadas durante todos esses anos de Pós-Graduação que levarei comigo para sempre, em especial minha amiga Dra. Camila Michele de Souza Hossotani.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização e conclusão deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“A persistência é o caminho do êxito!”

Charles Chaplin

RESUMO

A criptosporidiose, causada pelo protozoário *Cryptosporidium parvum*, é uma infecção entérica de grande impacto em humanos e animais, especialmente em indivíduos imunocomprometidos e crianças pequenas. Devido à ausência de tratamentos eficazes, novas abordagens terapêuticas são necessárias. Estudos indicam que a microbiota intestinal e metabólitos derivados do hospedeiro, como os ácidos biliares, podem influenciar a infecção pelo parasito. Este estudo investigou o efeito da administração oral de ácidos biliares na carga parasitária e na microbiota intestinal de camundongos infectados com *C. parvum*. Foram realizados três experimentos com camundongos CD-1 e C57BL/6, divididos em grupos controle e tratamento. Todos os animais receberam dexametasona na água, para tornar os camundongos susceptíveis à infecção, o grupo de tratamento também recebeu 0.27% de ácido biliar. A carga parasitária foi avaliada por PCR quantitativo, e a microbiota intestinal foi analisada por sequenciamento de 16S rRNA. Os resultados mostraram que a administração de ácidos biliares reduziu significativamente a eliminação de oocistos nas fezes dos camundongos, com reduções de 63%, 88% e 36,8% nos três experimentos, respectivamente. No entanto, as análises da microbiota intestinal não identificaram uma relação direta entre a modulação bacteriana e a carga parasitária. Fatores como alojamento e variações entre lotes experimentais foram determinantes na composição da microbiota, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos na redução da carga parasitária. Esses achados indicam que os ácidos biliares podem representar uma estratégia potencial para avaliar se a perturbação da microbiota pode modular o crescimento do parasito, embora mais estudos sejam necessários para compreender seus mecanismos de ação e seu impacto na microbiota intestinal.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp.; zoonoses; microbiota fecal; tratamento.

ABSTRACT

Cryptosporidiosis, caused by the protozoan *Cryptosporidium parvum*, is a highly contagious enteric infection in humans and animals, especially in immunocompromised individuals and young children. Due to the lack of effective treatments, new therapeutic approaches are needed. Studies indicate that the intestinal microbiota and host-derived metabolites, such as bile acids, can influence parasite infection. This study investigated the effect of oral administration of bile acids on the parasite load and intestinal microbiota of mice infected with *C. parvum*. Three experiments were performed with CD-1 and C57BL/6 mice, divided into control and treatment groups. All animals received dexamethasone in the water to make the mice susceptible to infection, the treatment group also received 0.27% bile acid. Parasite load was assessed by quantitative PCR, and the intestinal microbiota was analyzed by 16S rRNA sequencing. The results showed that bile acid administration significantly reduced oocyst shedding in the feces of mice, with reductions of 63%, 88% and 36.8% in the three experiments, respectively. However, analyses of the intestinal microbiota did not identify a direct relationship between bacterial modulation and parasite load. Factors such as housing and variations between experimental batches were determinants of microbiota composition, suggesting that other mechanisms may be involved in the reduction of parasite load. These findings indicate that bile acids may represent a potential strategy to evaluate whether microbiota disturbance can modulate parasite growth, although further studies are needed to understand their mechanisms of action and their impact on the intestinal microbiota.

Keywords: *Cryptosporidium* spp.; zoonoses; gut microbiota; treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fatores que afetam a transformação bacteriana dos ácidos biliares	20
Figura 2 -	PCoA das réplicas com base na distância UniFrac por experimento	33
Figura 3 -	Consumo de água diário para cada camundongo.....	35
Figura 4 -	Concentração de DNA de <i>C. parvum</i> nas fezes.....	36
Figura 5 -	Concentração de DNA de <i>C. parvum</i> nas fezes estimado com COWP qPCR e normalizados pelo peso das fezes.....	37
Figura 6 -	Produção de oocistos normalizada para o volume de fezes, plotada contra a diversidade de Shannon.....	38
Figura 7 -	Análise de PCoA de distâncias pareadas entre a microbiota fecal do camundongo com base na diversidade β	40
Figura 8 -	Análise de PCoA de distâncias pareadas entre a microbiota fecal dos camundongos dos três experimentos juntos com base na diversidade β do UniFrac.....	41
Figura 9 -	Taxonomia do microbioma fecal de camundongos tratados e controles	42
Figura 10 -	Gráfico biplot elaborado a partir de uma análise feita através da RDA e representa os três experimentos realizados.....	43
Figura 11 -	Gráfico biplot dos três experimentos realizados, destacando as variações das OTUs que têm menor e maior ligação com os experimentos	44
Figura 12 -	Gráfico de barras criado utilizando as contagens de OTUs da coluna FitE .	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos experimentos com camundongos	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

UNESP	Universidade Estadual Paulista
g	grama
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
EUA	Estados Unidos
FDA	Federal Drug Administration
pH	Potencial hidrogeniônico de uma solução
rRNA	RNA ribossomal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	PCR em tempo real
Ct	Ciclo Limite
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
OTU	Unidades Taxonômicas Operacionais
RDA	Análise de Redundância
DP	Desvio Padrão
PCoA	Análise de Coordenadas Principais
ANOSIM	Análise de SIMilaridade
MI	Microbiota Intestinal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1	Criptosporidiose	15
1.2	Interação microbiota e <i>Cryptosporidium</i>	17
1.3	O papel do ácido biliar	18
1.4	Objetivo	21
2	CAPÍTULO 1- EFEITOS DO ÁCIDO BILIAR E DA MICROBIOTA INTESTINAL NO DESENVOLVIMENTO DA CRIPTOSPORIDIOSE NO CAMUNDONGO	22
2.1	Resumo.....	22
2.2	Introdução	23
2.3	Material e métodos	25
2.3.1	<i>Comitê de Ética.....</i>	25
2.3.2	<i>Grupos experimentais</i>	26
2.3.3	<i>Infecção e coleta de amostras fecais.....</i>	27
2.3.4	<i>Biologia Molecular</i>	28
2.3.5	<i>Procedimentos de análise de sequência 16S.....</i>	29
2.3.6	<i>Controle de qualidade das reações de PCR e da biblioteca de sequenciamento</i>	29
2.3.7	<i>Disponibilidade de dados</i>	30
2.3.8	<i>Análise estatística</i>	30
2.4	Resultados	32
2.4.1	<i>Controle de qualidade das análises.....</i>	32
2.4.2	<i>Camundongos alojados individualmente vs camundongos alojados em grupo.....</i>	33
2.4.3	<i>Consumo de água.....</i>	34
2.4.4	<i>Eliminação de oocistos</i>	35
2.4.5	<i>Eliminação de oocistos vs diversidade α.....</i>	38
2.4.6	<i>Diversidade β</i>	39
2.4.7	<i>Diferenças encontradas devido ao lote de camundongos.....</i>	40

2.5	Discussão.....	45
2.6	Conclusão	49
2.7	Agradecimentos.....	49
2.8	Referências	49
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	55
	ANEXO A - OFÍCIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	61
	ANEXO B - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA.....	62

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Criptosporidiose

A criptosporidiose é uma doença negligenciada causada por parasitos apicomplexos do gênero *Cryptosporidium* que têm efeitos devastadores nas populações mais vulneráveis, principalmente crianças e pessoas imunossuprimidas (Checkley *et al.*, 2015), estando entre as principais causas de diarreia fatal (Kotloff *et al.*, 2013). O oocisto, forma evolutiva ambiental do parasito, é transmitido pela via fecal-oral e é altamente resistente à desinfecção. Como resultado, este parasito é responsável por surtos em grande escala de doenças transmitidas pela água e pelos alimentos (Zahedi; Ryan, 2020). Os sintomas da criptosporidiose em humanos incluem diarreia aquosa grave, dores fortes na região abdominal, febre baixa, náuseas e/ou vômitos. O curso da doença pode durar até duas semanas ou prolongar por mais tempo (Chalmers *et al.*, 2011).

A quantidade de oocistos presentes nas fezes representa um risco significativo de contaminação do meio ambiente e de transmissão para os seres humanos (Brook *et al.*, 2009). Um bezerro doente pode eliminar aproximadamente 1×10^6 oocistos/g de fezes no meio ambiente (Nydham *et al.*, 2001). O número de oocistos eliminados pelo hospedeiro infectado, a resistência dos oocistos no ambiente e a baixa dose para causar infecção são fatores que tornam o *Cryptosporidium* spp. um patógeno altamente infectante (Vanathy *et al.*, 2017).

Globalmente, *Cryptosporidium* ocupa o terceiro lugar entre os patógenos entéricos mais comuns em crianças menores de cinco anos (Hlavsa *et al.*, 2021), sendo responsável por 9% das mortes infantis relacionadas a diarreias no mundo (Liu *et al.*, 2016). Entre 2007 e 2017, a prevalência de *Cryptosporidium* em pacientes com AIDS foi estimada em 10% (Wang *et al.*, 2018), embora não haja dados comparativos de períodos anteriores ou posteriores para afirmar se essa taxa tem aumentado ao longo do tempo. Além disso, até 2020, o protozoário esteve envolvido em mais de 40 surtos de origem alimentar notificados, com uma estimativa de mais de 8 milhões de casos de intoxicação alimentar anualmente (Zahedi; Ryan, 2020). No entanto, não está claro desde quando essa contagem anual foi estabelecida nem se todos esses dados se

referem ao mesmo período de análise.

O primeiro evento documentado na literatura ocorreu em 1984, em um subúrbio do Texas – EUA, afetando cerca de 34% da população devido à contaminação da água de um poço artesiano (D'Antonio *et al.*, 1985). Outro grande surto se deu em 1987 na Geórgia – EUA, onde cerca de 13.000 indivíduos apresentaram sintomas da doença (Hayes *et al.*, 1989). O primeiro surto associado a água para recreação foi registrado em 1988, em uma piscina no Reino Unido (Joce *et al.*, 1991). Em 1993, mais de 400.000 pessoas foram afetadas em Milwaukee, WI, EUA (Mackenzie *et al.*, 1994). Em 2006, cinco estados nos EUA relataram surtos de criptosporidiose. No Colorado, alguns participantes de uma festa desenvolveram gastroenterite após uma celebração em um parque aquático comunitário. Em Illinois, após um acampamento, 48 crianças que tiveram contato com água em um parque aquático apresentaram sintomas. Na Luisiana, foram confirmados trinta e cinco casos de criptosporidiose em laboratório, enquanto na Carolina do Sul foram cento e vinte e três e em Wyoming, trinta e quatro, todos vinculados ao uso recreativo da água (Center for Disease Control and Prevention - CDC, 2007). Em novembro de 2010, cerca de 45% da população de Östersund, Suécia, contraíram a doença. O parasito foi encontrado na água potável por um período superior a dois meses, configurando-se como o maior surto documentado na Europa e o segundo no mundo (Widerström *et al.*, 2014).

A nitazoxanida, o único medicamento licenciado pela FDA como agente antiprotozoário para humanos, é apenas 38% eficaz em indivíduos imunocompetentes e é ineficaz em indivíduos imunocomprometidos (Amadi *et al.*, 2009). Muitos compostos, como clofazimina, azitromicina etc., têm sido utilizados em pacientes com AIDS, porém sem sucesso clínico suficiente (Gupta *et al.*, 2020). Atualmente não existe nenhum medicamento eficaz conhecido contra a criptosporidiose. A paromomicina é um medicamento comumente utilizado para combater a criptosporidiose em animais (como cabras, ovelhas, bezerros, leitões, etc.). No entanto, não proporciona tratamento parasitológico completo (Khan; Witola, 2023).

1.2 Interação microbiota e *Cryptosporidium*

Os tecidos mucosos são barreiras físicas compostas por componentes bioquímicos bacterianos e imunológicos na interface entre o hospedeiro e o ambiente externo.

A imunidade mucosa desempenha um papel importante na promoção de respostas imunes para manter a homeostase e como primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos e não patogênicos (McGhee; Fujihashi, 2012). O trato gastrointestinal é o maior tecido mucoso do corpo humano, que abriga uma ampla comunidade diversificada de comensais, incluindo bactérias, fungos e protozoários. Esse conjunto de microrganismos são comumente chamados de simbióticos, benéficos para seu hospedeiro, e é cada vez mais evidente que sua presença desempenha um papel importante na remodelação do sistema imunológico (Sardinha-Silva; Alves-Ferreira; Grigg, 2022).

Ainda não está claro até que ponto uma configuração específica da microbiota intestinal (MI) pode ser responsável, ou um fator que contribua para doença, ou em que medida é apenas um resultado de uma condição patológica (Asnicar *et al.*, 2021). A MI constitui uma parte essencial do organismo, capaz de alcançar um equilíbrio sutil entre saúde e enfermidades. Influenciada por diversos fatores da vida, como a introdução de alimentos, estilo de vida, tratamentos e estímulos ambientais, a MI também é moldada por várias características do hospedeiro, incluindo genética, hormônios, pH, bile e secreções do pâncreas. Juntos, esses aspectos tornam sua composição variável e altamente individualizada (Chen *et al.*, 2021). Outras pesquisas relacionadas à relação entre microbiota e parasitos foram analisadas e foi sugerido que a alteração do sistema imunológico por parasitos pode ser um mecanismo que influencia na composição da microbiota (Bancroft; Hayes; Grencis, 2012; Berrilli *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse no papel da MI na manutenção da saúde do hospedeiro. Esse interesse se deve, em parte, às evidências que mostram que a composição da microbiana pode influenciar a suscetibilidade a

diversas doenças. Pesquisas anteriores indicam que patógenos responsáveis por infecções diarreicas podem provocar alterações na estrutura da MI, o que, por sua vez, pode estar relacionado tanto à vulnerabilidade quanto à imunidade do organismo frente a infecções por protozoários (Rahman *et al.*, 2022). Diversas pesquisas analisaram como a criptosporidiose afeta a ecologia do intestino. Por meio de experimentos com camundongos que apresentavam deficiências imunológicas e que eram isentos de bactérias, assim como aqueles que possuíam MI, Harp, Chen e Harmsen (1992) mostraram que a MI saudável atrasou o início da liberação de oocistos de *Cryptosporidium parvum* por várias semanas. Estes pesquisadores também demonstraram que a imunidade de camundongos contra *C. parvum* pode ser incrementada por meio da transferência do revestimento intestinal (Harp, 2003).

Em uma pesquisa acerca do impacto dos inibidores da inosina monofosfato desidrogenase em camundongos afetados por *C. parvum*, foi observado que a virulência do parasito se elevou em decorrência de um tratamento com inibidor de IMP desidrogenase, o qual foi associado a uma modificação na MI (Gorla *et al.*, 2014). Alguns estudos investigaram que o impacto do *Cryptosporidium parvum* na MI de camundongos infectados era diferente da dos que não foram infectados, independentemente do isolado utilizado (Oliveira; Widmer, 2018; Ras *et al.*, 2015). Apesar disso, o efeito do ambiente intestinal no curso da infecção não foi compreendido e os mecanismos subjacentes continuam desconhecidos. Compreender como a MI se relaciona com patógenos é fundamental para criar terapias alternativas eficazes e que evitem a resistência a fármacos (Ras *et al.*, 2015).

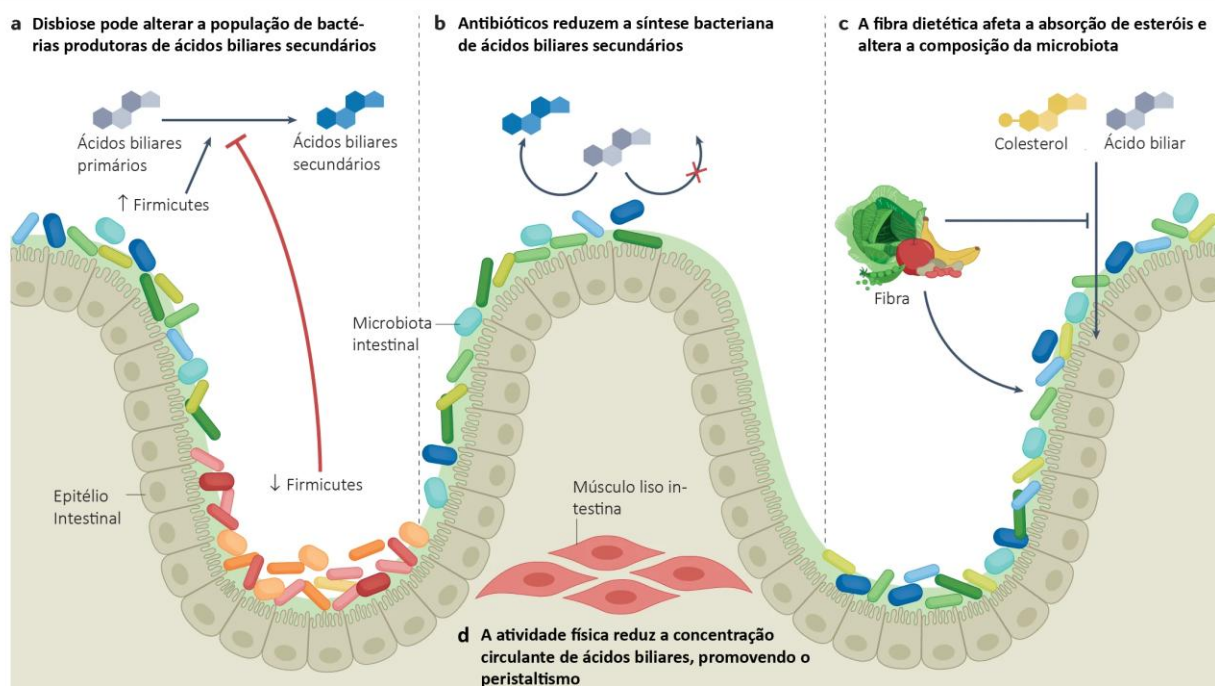
1.3 O papel do ácido biliar

Os ácidos biliares constituem moléculas anfipáticas que são produzidas no fígado a partir do colesterol. Elas são armazenadas na vesícula biliar e, após a ingestão de alimentos, são liberadas no intestino delgado (Shiffka; Kane; Swaan, 2017). Esses ácidos desempenham vários papéis importantes, sendo uma das suas funções principais a facilitação da emulsificação de gorduras presentes nos alimentos e o auxílio na absorção de lipídios e vitaminas lipossolúveis pelo intestino (Begley *et al.*, 2005).

A produção de ácidos biliares é um processo complexo que ocorre em várias etapas, envolvendo diversas enzimas situadas no retículo endoplasmático, nas mitocôndrias, no citosol e nos peroxissomos das células. A formação desses ácidos a partir do colesterol pode seguir duas vias: 1) clássica: que acontece nos hepatócitos e é frequentemente chamada de via neutra. É responsável pela produção de ácidos biliares primários e representa mais de 90% dessa biossíntese, sendo por isso considerada a principal rota de síntese (González-Regueiro *et al.*, 2017); e 2) alternativa: que ocorre no intestino (Russell, 2003), e está envolvida na formação de ácidos biliares secundários, correspondendo a menos de 10% da síntese sob condições fisiológicas normais (González-Regueiro *et al.*, 2017).

As bactérias intestinais e o hospedeiro se comunicam por meio da produção e modificação de metabólitos, muitos dos quais impactam na fisiologia do hospedeiro (Herrema; Ijzerman; Nieuwdorp, 2017; Romano *et al.*, 2017). Os ácidos biliares são metabólitos produzidos pelo hospedeiro e, ao chegarem ao intestino, sofrem modificações por ação de bactérias intestinais, que os transformam em formas secundárias bioativas. Essas formas modificadas desempenham um papel essencial na regulação do microbioma intestinal e no metabolismo do hospedeiro, como demonstrado na Figura 1 (Wahlström *et al.*, 2016). Além disso, os ácidos biliares contribuem para a proteção do fígado e do intestino contra processos inflamatórios (Torres-Fuentes *et al.*, 2017).

Figura 1 - Fatores que afetam a transformação bacteriana dos ácidos biliares.



Fonte: Adaptado de Collins *et al.*, 2023.

Legenda: A) Disbiose; b) Antibióticos reduzem populações de Firmicutes e, portanto, perturbam os níveis de ácido biliar secundário; c) O consumo alimentar de colesterol aumenta os pools totais de ácidos biliares, mas a fibra insolúvel pode se ligar e sequestrar colesterol e ácidos biliares no lúmen intestinal. A fibra prebiótica e outros componentes alimentares também modulam a composição da microbiota; d) O tempo de trânsito intestinal encurtado associado ao exercício reduz as concentrações de ácidos secundários e a reabsorção de ácidos biliares porque eles são excretados mais rapidamente.

Mudanças na composição da MI afetam o metaboloma, em particular a formação de ácidos biliares secundários. Determinados ácidos biliares têm a capacidade de desencadear a germinação de esporos de *Clostridioides difficile* e também podem impedir o crescimento de *C. difficile in vitro* (Theriot; Bowman; Young, 2016). A bile também induz a excitação de oocistos de algumas espécies de *Cryptosporidium* (Widmer; Klein; Bonilla, 2007). Ademais, foi identificado que os ácidos possuem atividades antimicrobianas que podem danificar as membranas das células bacterianas, ajudando assim a controlar o crescimento excessivo de bactérias (Zheng *et al.*, 2017).

Pesquisadores identificaram metabólitos intestinais que são mais prevalentes em camundongos neonatais, período em que esses animais apresentam maior suscetibilidade à infecção por *C. parvum*. Além disso, observaram que os níveis de ácidos biliares, como o ácido cólico e o desoxicólico, eram significativamente mais

elevados em camundongos de 6 semanas de idade, cuja MI já se assemelhava à de animais adultos (VanDussen *et al.*, 2020). Esses achados sugerem que a composição dos metabólitos intestinais nos neonatais pode estar relacionada à maior vulnerabilidade à infecção, enquanto a maturação da microbiota e o aumento dos níveis de ácidos biliares em camundongos mais velhos podem contribuir para maior resistência ao parasito. Funkhouser-Jones e colaboradores analisaram os 85 principais metabólitos intestinais murinos e avaliaram seu impacto no crescimento de *C. parvum*. Oocistos do protozoário foram adicionados simultaneamente com metabólitos individuais às monocamadas de células HCT-8. Eles identificaram um total de 8 metabólitos que inibiram significativamente o crescimento de *Cryptosporidium* e nenhum que aumentou a infecção, demonstrando que várias classes de metabólitos microbianos prejudicaram o crescimento destes parasitos, incluindo três ácidos biliares secundários ou sais (desoxicolato, ácido desoxicólico e ácido litocólico) (Funkhouser-Jones *et al.*, 2023).

1.4 Objetivo

O objetivo do presente estudo foi investigar se a administração oral de ácidos biliares pode influenciar a interação entre a microbiota intestinal e *Cryptosporidium parvum* em camundongos. Para isso, foi analisado o impacto dos ácidos biliares na composição da microbiota intestinal, na susceptibilidade à infecção pelo parasito e na resposta do hospedeiro à criptosporidiose.

2 CAPÍTULO 1 - EFEITOS DO ÁCIDO BILIAR E DA MICROBIOTA INTESTINAL NO DESENVOLVIMENTO DA CRIPTOSPORIDIOSE NO CAMUNDONGO¹

Débora Regina Romualdo da Silva^{1,2}; Alex Akira Nakamura^{1*}; Giovanni Widmer^{2*}

¹Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

²Department of Infectious Diseases and Global Health, Cummings School of Veterinary Medicine, Tufts University, North Grafton, MA 01536, USA

*Autor correspondente

Endereço postal completo:

Rua Clóvis Pestana, 793 - Dona Amélia – Araçatuba, São Paulo - CEP 16050-680.

e-mail: alex.nakamura@unesp.br

*Autor correspondente

Endereço postal completo: Department of Infectious Diseases and Global Health, Cummings School of Veterinary Medicine, Tufts University, North Grafton, MA 01536, USA

e-mail: giovanni.widmer@tufts.edu

2.1 Resumo

A criptosporidiose, causada pelo protozoário *Cryptosporidium parvum*, é uma infecção entérica de grande impacto em humanos e animais, especialmente em indivíduos imunocomprometidos e crianças pequenas. Devido à ausência de tratamentos eficazes, novas abordagens terapêuticas são necessárias. Estudos indicam que a microbiota intestinal e metabólitos derivados do hospedeiro, como os ácidos biliares, podem influenciar a infecção pelo parasito. Este estudo investigou o efeito da administração oral de ácidos biliares na carga parasitária e na microbiota intestinal de camundongos infectados com *C. parvum*. Foram realizados três experimentos com camundongos CD-1 e C57BL/6, divididos em grupos controle e tratamento. Todos os animais receberam dexametasona na água, para tornar os camundongos susceptíveis à infecção, o grupo de tratamento também recebeu 0.27% de ácido biliar. A carga parasitária foi avaliada por PCR quantitativo, e a microbiota intestinal foi analisada por

¹ Citações e referências de acordo com as normas da Revista *PLOS Pathogens* (Anexo B).

sequenciamento de 16S rRNA. Os resultados mostraram que a administração de ácidos biliares reduziu significativamente a eliminação de oocistos nas fezes dos camundongos, com reduções de 63%, 88% e 36,8% nos três experimentos, respectivamente. No entanto, as análises da microbiota intestinal não identificaram uma relação direta entre a modulação bacteriana e a carga parasitária. Fatores como tipo de alojamento e variações entre lotes experimentais foram determinantes na composição da microbiota, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos na redução da carga parasitária. Esses achados indicam que os ácidos biliares podem representar uma estratégia potencial para avaliar se a perturbação da microbiota pode modular o crescimento do parasito, embora mais estudos sejam necessários para compreender seus mecanismos de ação e seu impacto na microbiota intestinal.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp.; zoonoses; microbiota fecal; tratamento.

2.2 Introdução

A criptosporidiose é uma doença negligenciada, causada por parasitos apicomplexos do gênero *Cryptosporidium* spp, sendo um risco maior em indivíduos imunossuprimidos e imunocomprometidos [1]. Possui transmissão pela via fecal-oral pelo consumo de alimentos ou água contaminados por oocistos ou por contato indireto ou direto com fezes de hospedeiros infectados [2,3]. A classificação taxonômica ou a posição sistemática de *Cryptosporidium* spp. está em permanente atualização com o auxílio de métodos moleculares e filogenéticos [4,5]. Alguns autores sugerem a existência de 44 espécies de *Cryptosporidium*, das quais *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis* são as principais espécies causadoras de infecção intestinal em humanos [6].

A criptosporidiose é um grande desafio para a medicina humana e veterinária, devido à dificuldade de controle da infecção. Isso se deve à alta resistência dos oocistos no ambiente (sendo capazes de suportar congelamento, seca e processos de tratamento de água), à baixa dose necessária para causar infecção, à grande quantidade de oocistos esporulados eliminados pelos hospedeiros infectados e ao

amplo espectro de hospedeiros suscetíveis. Os oocistos não são inativados pela maioria dos desinfetantes, assim como outros parasitos [7]. Várias opções químicas e naturais foram testadas para tratar a criptosporidiose, mas sem resultados promissores [8]. Além disso, infecções simultâneas por diferentes espécies de *Cryptosporidium* são bastante comuns e a proteção contra reinfecção é incompleta [9]. Na ausência de medicamentos eficazes, o tratamento da criptosporidiose limita-se a terapia de suporte. Como não existe vacina disponível, a higiene pessoal, o saneamento básico e o tratamento da água para reduzir a infecção continuam a ser os métodos de prevenção mais eficazes [10].

Existem várias premissas que explicam por que a microbiota intestinal (MI) pode influenciar a gravidade da infecção por *Cryptosporidium* spp., principalmente devido à sua replicação no epitélio intestinal e à sua dependência de metabólitos do hospedeiro para seu crescimento e sobrevivência. O parasito não possui algumas vias metabólicas essenciais e, por isso, depende da captação de metabólitos diretamente da célula hospedeira para sustentar seu desenvolvimento e replicação [11,12]. A hipótese de que a MI regula a proliferação de parasitos começou a atrair a atenção de pesquisadores, e a investigação inicialmente proposta por Harp e colaboradores demonstrou que quando está normal atrasa a excreção de oocistos de *C. parvum* por pelo menos três semanas [13]. Esses autores também descobriram que a resistência do camundongo ao *C. parvum* poderia ser aumentada pela transferência da MI de animais resistentes para camundongos suscetíveis [14].

Os ácidos biliares são moléculas produzidas pelo hospedeiro e posteriormente modificadas por bactérias intestinais. Além de atuarem na digestão e absorção de lipídios, esses metabólitos também influenciam a composição da microbiota, servindo como fonte de nutrientes para algumas bactérias e exercendo efeito antimicrobiano sobre outras. Além disso, eles desempenham um papel na comunicação entre o hospedeiro e a microbiota, regulando a expressão de genes bacterianos e influenciando o metabolismo intestinal [15]. Estudos em modelos de camundongos tratados com antibióticos mostraram que a recuperação de ácidos biliares secundários estava associada à resistência à infecção por *C. difficile*. A análise do microbioma revelou que a quantidade de genes do operon ativado por esses

compostos estava fortemente relacionada à capacidade do organismo de resistir à colonização pelo patógeno [16].

Determinados ácidos biliares podem induzir a germinação de esporos de *C. difficile* e também inibir seu crescimento em ambiente controlado [17]. Supõe-se que a redução de grupos bacterianos responsáveis por converter ácidos biliares primários em secundários diminua a resistência à colonização por *C. difficile*, pois essa conversão gera metabólitos que normalmente inibem o crescimento do patógeno. Assim, a menor produção de ácidos biliares secundários pode resultar em um ambiente mais permissivo para a proliferação de *C. difficile*, reduzindo assim a barreira natural contra sua proliferação [18]. Assim, foi observado que os ácidos biliares são determinantes importantes da abundância, diversidade e atividade metabólica da microbiota, além de induzir a excitação de oocistos de algumas espécies de *Cryptosporidium* [19] e impactar a estrutura e a função da comunidade do microbioma [20].

A infecção por *Cryptosporidium* spp. pode alterar a MI [21,22,23]. No entanto, ainda não existem terapias ou vacinas eficazes contra a criptosporidiose, o que motiva a busca por novas estratégias para minimizar seu impacto, especialmente em grupos vulneráveis. Dada a importância da microbiota para a fisiologia intestinal, nossa hipótese é que a administração oral de ácidos biliares pode modular o crescimento do parasito ao influenciar a composição da microbiota. Com base nisso, este estudo teve como objetivo investigar se essa intervenção afeta a interação entre a microbiota intestinal e *Cryptosporidium parvum* em camundongos.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Comitê de Ética

Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Uso e Cuidados com Animais da Universidade Tufts, Massachusetts, EUA, sob o protocolo G2021-115. Todos os métodos foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentações relevantes. O estudo foi realizado em conformidade com as diretrizes ARRIVE.

2.3.2 Grupos experimentais

Todas as amostras analisadas no presente trabalho se originaram de camundongos alojados em grupos e individualmente. Camundongos CD-1 e C57BL/6 entre quatro e seis semanas de idade foram comprados da Charles River Laboratories (Wilmington, MA, EUA). Foram três experimentos, sendo que os CD-1 foram utilizados nos experimentos de nº43 e 50, e os C57BL/6 no de nº44. Os três lotes de camundongos utilizados em cada experimento foram solicitados separadamente, de modo que nenhum dos experimentos se sobrepôs no tempo (Tabela 1) e procederam de uma instalação de criação diferente. Todos os camundongos incluídos em um mesmo experimento foram comprados juntos e se originaram da mesma instalação.

Tabela 1 - Resumo de experimentos com camundongos.

Exp.	Cepa de camundongo	Sexo	Gaiola	Total de camundongos	Nº de camundongos: controle/tratamento	Sequência 16S
43	CD-1	macho	3/4/3/4	14	7	sim
44	C57BL/6	macho	4/1/1/1/4/1/1/1	14	7	sim
50	CD-1	fêmea	3/3/3/3	12	6	sim

Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Legenda: Abreviações: exp., experimento. Sequência 16S: Amostras sequenciadas utilizando o protocolo de código de barras duplo usado para amplificar a região V4 do gene 16S rRNA. Os números nas colunas das gaiolas referem-se ao número de animais colocados em cada gaiola para cada experimento.

Os camundongos de cada lote foram alojados em grupos e/ou individualmente em gaiolas esterilizadas de aproximadamente 27×17×20 cm de tamanho com tampa de filtro. As gaiolas continham cama de maravalha esterilizados e eram mantidas a uma temperatura de 20°C, em um ciclo claro-escuro de 12 horas. O manuseio dos camundongos e as trocas semanais de gaiola eram realizadas pelos envolvidos neste trabalho utilizando aventais, máscaras e luvas estéreis em uma cabine de biossegurança classe II B2. Em três a quatro momentos durante cada experimento, coincidindo com o pico de eliminação de oocistos, os camundongos eram transferidos à noite para gaiolas com fundo de arame, mantendo-se nos mesmos grupos

experimentais. Essa transferência facilitava a coleta de material fecal para a propagação da linhagem MD. Os camundongos foram tratados tanto quanto possível de forma idêntica em todos os três experimentos e foram alimentados com a mesma dieta, com acesso irrestrito à ração padrão estéril para roedores contendo 18% de proteína (Teklad 2018, Envigo, Indianápolis, IN, EUA).

A partir da chegada dos camundongos à instalação, todos os animais receberam água potável esterilizada suplementada com 16 mg/L de dexametasona 21-fosfato. A administração da dexametasona começou 5 dias antes da infecção e foi mantida durante todo o experimento, para tornar os camundongos suscetíveis a *C. parvum* [24], (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Os camundongos foram divididos em dois grupos experimentais: (i) grupo controle, que recebeu apenas a água suplementada com dexametasona, e (ii) grupo tratamento, que recebeu a mesma água suplementada com dexametasona, acrescida de 0,27% de ácido biliar, diluído diretamente na água de consumo (CAS-No. 8008-63-7, Sigma-Aldrich), desde o dia 0 da infecção por *C. parvum* até o final do experimento. Essa dosagem de ácido biliar foi definida com base em experimentos anteriores do grupo de pesquisa do Dr. Widmer (estudos não publicados).

2.3.3 Infecção e coleta de amostras fecais

Os oocistos de *Cryptosporidium parvum* isolado MD foram purificados do material fecal em gradientes de 10% p/v—25% p/v Nycodenz em água estéril (Alere Technologies, Oslo, Noruega), conforme descrito por Widmer e colaboradores [25], para infecção dos animais. Os camundongos foram infectados oralmente com 50.000 oocistos.

As amostras foram coletadas individualmente de cada camundongo nos dias -3, 1, 5, 9 e 15 para o experimento 43; dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10 para o experimento 44 e dias -3, -1, 3, 7, 12, 16 e 18 para o experimento 50. Os oocistos eliminados nas fezes foram analisados por microscopia óptica, corados com coloração ácido-resistente em esfregaços fecais [26] e, em seguida, quantificados utilizando qPCR.

2.3.4 *Biologia Molecular*

A concentração média de eliminação de oocistos foi estimada usando uma curva padrão desenhada com base no ponto de cruzamento de PCR (Ct) obtido para quatro padrões de DNA de *C. parvum*, sendo 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 / oocistos contados em 100 μ L. Para cada camundongo a detecção média de *Cryptosporidium* foi obtido normalizando o número estimado de cópias de DNA COWP em relação ao peso das fezes. O DNA foi extraído das amostras após pesagem em um volume não superior a 250 mg em um instrumento QIAcube usando o kit QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Cat. n.º 51804) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi eluído em 50 μ L de tampão de eluição e armazenado a -20 °C.

Para o mix da reação na qPCR utilizamos as quantidades de 4 μ L de amostra; 10 μ L de Mastermix QuantiNova Probe (Qiagen, Applied Biosystems); 4 μ L de água ultrapura e 2 μ L de Primer Probe preparado com 100 μ L de cada um dos reagentes a seguir: CryptoCOWP FWD GAT GCT ATC TGT CCA CCA GAA T, concentração final de 50 μ M; CryptoCOWP REV CAC CTG TTC CCA CTC AAT GTA concentração final de 50 μ M e CryptoCOWP PRB-Cy3 /5Cy3/TCT CCA GTC ACA AAG GAA TGC CCA /3IAbRQSp/ concentração final de 25 μ M, depois de fazer a mistura dos primers com probe no volume de 300 μ L, adicionamos água suficiente para completar 1mL (700 μ L). Os primers foram desenhados por Lee, Sangum (dados não publicados). As amostras foram colocadas no termociclador micPCR version 2.12 Rev D, a desnaturação inicial do DNA foi feita a 95°C por 3 minutos, seguida de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 1 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos. Um total de 177 amostras fecais de 39 camundongos pertencentes a três experimentos separados foram incluídos nas análises apresentadas aqui.

O protocolo de código de barras duplo descrito por Kozich e colaboradores [27], foi usado para amplificar a região V4 do gene 16S rRNA e codificar cada amplicon de forma única. A concentração do amplicon foi estimada usando um fluorômetro Qubit 3 (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts). Os amplicons foram combinados em concentrações aproximadamente iguais. A biblioteca foi selecionada

por tamanho com o sistema Pippin Prep. A biblioteca foi sequenciada em pares de 300 nucleotídeos em um instrumento Illumina MiSeq operado pela instalação central de genômica da Tufts University (tucf.org).

2.3.5 Procedimentos de análise de sequência 16S

As sequências formatadas em FASTQ foram processadas usando programas do pipeline *mothur* [28], essencialmente como descrito por Ferrari e colaboradores [29]. Resumidamente, subamostras aleatórias de 10.000 sequências por amostra foram processadas usando o programa *sub.sample* em *mothur* e os contigs de sequência foram obtidos dos pares de sequência R1 e R2 usando *make.contigs*, com a opção *trimoverlap* definida como “T”. Distâncias filogenéticas UniFrac pareada [30], entre amostras foram calculadas em *mothur*. Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) foram obtidas usando o comando *classify.otu*, este comando é usado para obter uma taxonomia de consenso para uma OTU (uma unidade taxonômica operacional (OTU) é uma definição prática utilizada para categorizar conjuntos de indivíduos que estão estreitamente associados, abordagens baseadas em OTU possibilitam a investigação da distribuição de sequências identificadas por meio de diferentes técnicas, as quais nos permitem medir atributos ecológicos como abundância, variedade e semelhança), também em *mothur*. A extensão do excel *GenAlEx* [31,32], foi usado para desenhar os gráficos de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) usando matrizes de distância UniFrac ponderadas como entrada. Os índices de diversidade alpha (α) foram calculados usando o programa *summary.single* em *mothur*.

2.3.6 Controle de qualidade das reações de PCR e da biblioteca de sequenciamento

Como os amplicons 16S de diferentes experimentos foram sequenciados em diferentes bibliotecas, avaliamos o efeito da reação de sequenciamento nos dados da sequência. Para esse objetivo, um amplicon V4 separado amplificado de uma população bacteriana sintética (BEI Resources HM-782D) foi incluído em cada

biblioteca. As sequências desses amplicons foram comparadas usando o mesmo pipeline de *mothur* e a distância UniFrac ponderada entre todas as combinações em pares foi calculada. Um segundo procedimento para avaliar a qualidade dos dados da sequência e estimar a variação técnica foi a inclusão em cada biblioteca de sequenciamento de amplicons com código de barras exclusivo originários da mesma amostra fecal. Essas réplicas nos permitiram estimar a magnitude do erro técnico introduzido pela reação de PCR e sequenciamento.

Como controle de qualidade de sequenciamento comparamos valores de distância UniFrac entre as réplicas com a distância entre pares aleatórios de amostras. O mesmo foi feito para os valores de diversidade de Shannon.

2.3.7 Disponibilidade de dados

Os dados da sequência 16S foram depositados no formato FASTQ no Sequence Read Archive, National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information (NIH), sob os números de projeto PRJNA1055972 para os experimentos 43 e 44; PRJNA1219597 para o experimento 50.

2.3.8 Análise estatística

A análise estatística foi conduzida utilizando diferentes abordagens para avaliar a influência da administração oral de ácidos biliares na microbiota intestinal e no curso da infecção por *C. parvum* em camundongos. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SigmaPlot (versão 15). Para comparar grupos experimentais, diferentes testes estatísticos foram aplicados conforme a natureza dos dados e as comparações realizadas. A comparação entre dois grupos foi feita por meio do teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Para comparações entre múltiplos grupos, utilizou-se a análise de variância (*Two Way Repeated Measures ANOVA*), seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas quando os dados apresentavam distribuição normal. Quando a distribuição não era normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. Além

disso, foi realizado o teste de Correlação de Pearson para investigar possíveis relações entre a produção de oocistos e a diversidade microbiana. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. Adicionalmente, a média de Z-score que foi calculada para normalizar os dados e facilitar a comparação entre diferentes experimentos. A estrutura da comunidade microbiana foi analisada por meio da distância UniFrac ponderada, um método que considera diferenças filogenéticas entre as amostras. A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi empregada para visualizar a diversidade beta (β) e possíveis agrupamentos conforme o tratamento. Para testar a significância do agrupamento por tratamento, foi utilizada a análise multivariada não paramétrica de Similaridade de Análise (ANOSIM), [33]. O programa ANOSIM foi executado em *mothur* usando uma matriz de distância UniFrac ponderada como entrada. A Análise Discriminante Linear conforme implementada no programa LEfSe [34], foi usada para identificar diferenças estatisticamente significativas nos perfis de abundância de OTU entre dois grupos de amostras definidos pelo tratamento com ácido biliar e o grupo controle. O comando LefSE (*Linear Discriminant Analysis Effect Size*), no *mothur* é usado para identificar táxons bacterianos que são significativamente diferentes entre grupos. Ele integra testes estatísticos para detectar características (como OTUs) que determinam agrupamentos de diferentes amostras. Utilizamos como entrada no programa as abundancias relativas de OTUs para identificar os taxons bacterianos, que caracterizam os agrupamentos (exp.43= 72 amostras, exp.44= 64 amostras, exp.50= 40 amostras). Utilizamos o teste Qui-quadrado para avaliar diferenças estatísticas entre os táxons do grupo controle em comparação ao tratamento. Os índices de diversidade α , como o índice de Shannon, foram calculados para avaliar a diversidade taxonômica das comunidades microbianas nas amostras. Para examinar a relação entre a concentração de oocistos e o perfil da microbiota, foi utilizada a Análise de Redundância (RDA), que permite testar associações estatísticas entre variáveis ambientais e comunidades microbianas. Esta análise foi executada com o programa CANOCO [35]. Gráficos de dispersão, boxplots e gráficos de barras foram gerados para ilustrar os resultados das análises.

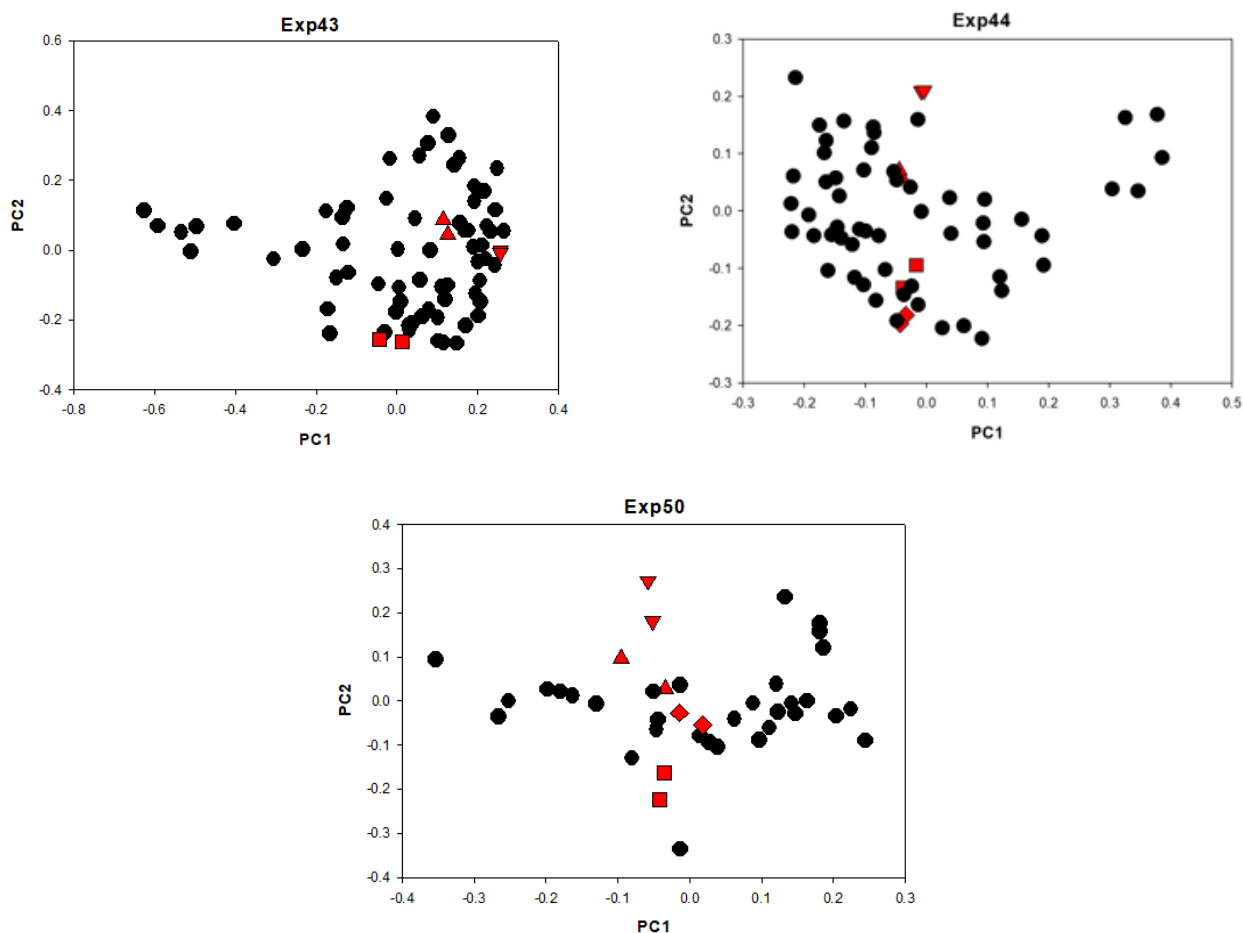
2.4 Resultados

2.4.1 Controle de qualidade das análises

Nossas análises de controle de qualidade nos mostraram que as sequências dos amplicons que foram comparadas usando o mesmo pipeline de *mothur* e a distância UniFrac ponderada entre todas as combinações em pares não mostra nenhuma evidência de que a biblioteca ou a reação de sequenciamento tenham impactado os resultados. Em média, as distâncias em pares entre os controles amplificados de uma população bacteriana sintética (BEI Resources HM-782D) foram muito pequenas, com média de 0,08 unidades de distância UniFrac (3 comparações, DP = 0,03). Esta métrica de distância varia de 0 para duas populações idênticas a 1 para duas populações que não compartilham sequências ou OTUs.

Um segundo procedimento para avaliar a qualidade dos dados da sequência e estimar a variação técnica foi a inclusão em cada biblioteca de sequenciamento de amplicons com código de barras exclusivo originários da mesma amostra fecal. A distância UniFrac ponderada entre amplicons duplicados foi de 0,0466; 0,0898; 0,0907 (experimento 43, 3 amostras duplicadas), 0,0751; 0,0563; 0,0648; 0,0316; (experimento 44, 4 amostras duplicadas), 0,1886; 0,1284; 0,1335; 0,1160 (experimento 50, 4 amostras duplicadas). Nossas análises de controle de qualidade de sequenciamento comparando valores de distância UniFrac entre réplicas com a distância entre amostras não replicadas demonstrou que réplicas são mais semelhantes entre si do que pares de amostras não replicadas (Figura 2), enquanto réplicas possuem média de 0,09 unidades de distância UniFrac (11 comparações, DP = 0,05), amostras não aleatórias possuem média de 0,45 unidades de distância UniFrac (177 comparações, DP = 0,13). Experimento 43, unidade de distância UniFrac para amostras não replicadas 0,39 e réplicas 0,08, experimento 44, unidade de distância UniFrac para amostras não replicadas 0,35 e réplicas 0,06 e experimento 50, unidade de distância UniFrac para amostras não replicadas 0,33 e réplicas 0,14 respectivamente.

Figura 2 - PCoA com base na distância UniFrac por experimento.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Legenda: As réplicas são representadas por triângulos e quadrados em vermelho, enquanto amostras não duplicadas são representadas exclusivamente por círculos na cor preta. A distância entre réplicas é uma medida de variação técnica.

2.4.2 Camundongos alojados individualmente vs camundongos alojados em grupo

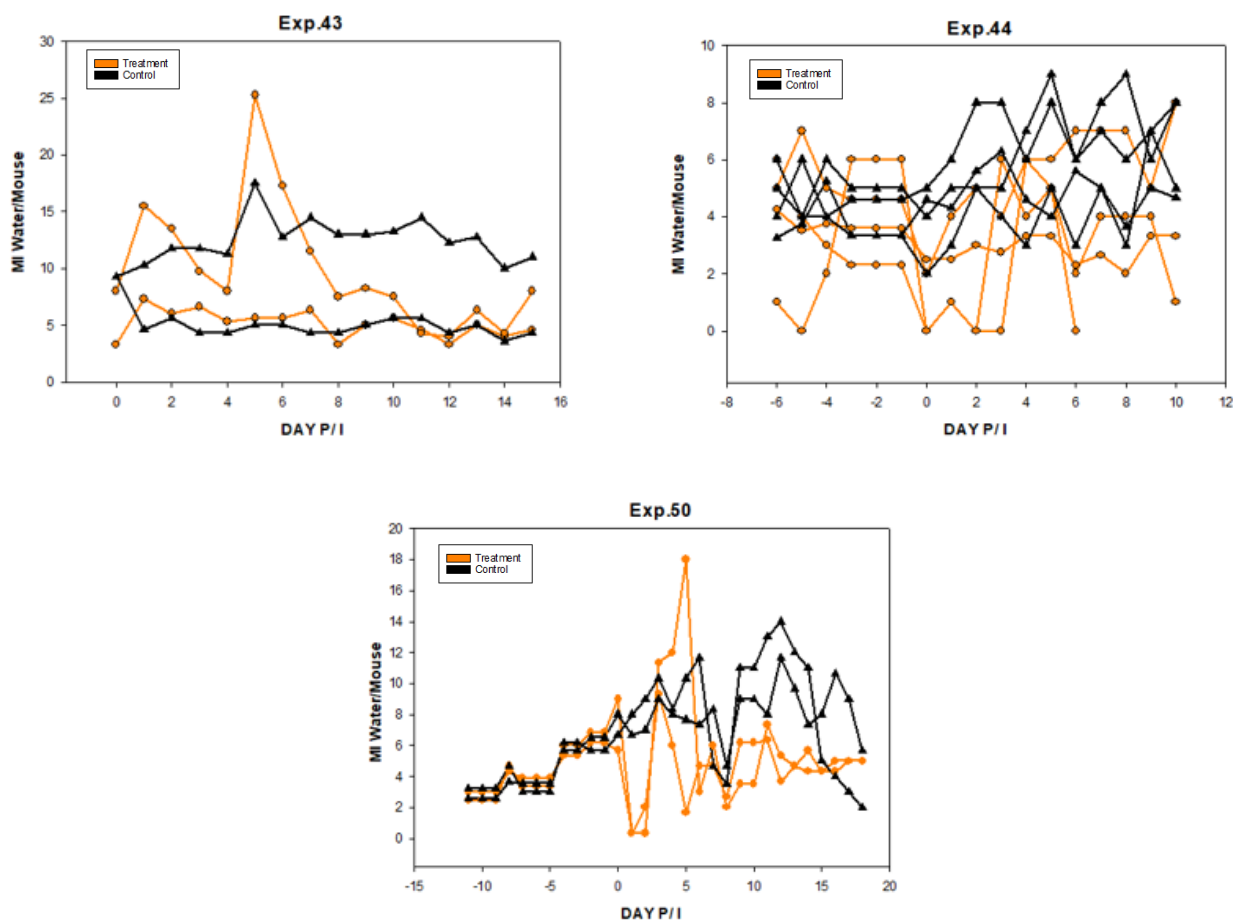
Porque a forma do alojamento e o comportamento dos animais pode influenciar no microbioma fecal dos camundongos [22] fizemos experimentos para verificar se o mesmo ocorreu com os nossos camundongos do experimento 44, nessa análise observamos mudanças significativas na microbiota dos grupos alojados individualmente em comparação com os camundongos alojados em grupo (ANOSIM $p=$

<0.001). A distância UniFrac ponderada [30], foi usada como uma medida da diversidade β . O número de valores de diversidade β entre camundongos alojados em conjunto foi 32. Para camundongos alojados individualmente, 28 valores de diversidade. Neste experimento, ao contrário do que já foi observado anteriormente [22], camundongos co-alojados não abrigaram populações bacterianas muito divergentes (média UniFrac = 0,34, DP = 0,10) em comparação com camundongos alojados individualmente (média UniFrac = 0,38, DP = 0,11). Entretanto o número reduzido de amostras pode ter influência nos resultados.

2.4.3 Consumo de água

Um aspecto que devemos considerar neste estudo é a ingestão de água pelos camundongos. A água oferecida aos camundongos foi enriquecida com dexametasona para promover a imunossupressão. Portanto, a diminuição no consumo de água pode resultar em um menor grau de imunossupressão e uma infecção menos severa. Os grupos controles consumiram em média mais água (experimentos 43, 44 e 50: 8,71ml, 5,14ml e 6,77ml, respectivamente) em comparação aos grupos tratados (experimentos 43, 44 e 50: 7,51 ml, 3,5ml e 4,9ml, respectivamente). Apesar da média diária de consumo de água por camundongo, considerando os três experimentos, apresentar variação entre os grupos (Figura 3), essa diferença não é estatisticamente significativa, (Mann-Whitney Rank Sum Test, bile vs. controle: $p= 0,08$). Experimento 43: (i) grupo tratamento, 32 observações, sendo dois grupos que receberam tratamento com ácido biliar, (ii) grupo controle, 32 observações, sendo dois grupos designados controle; Experimento 44: (i) grupo tratamento, 64 observações, sendo quatro grupos que receberam tratamento com ácido biliar, (ii) grupo controle, 68 observações, sendo quatro grupos designados controle; Experimento 50: (i) grupo tratamento, 59 observações, sendo dois grupos que receberam tratamento com ácido biliar, (ii) grupo controle, 60 observações, sendo dois grupos designados controle.

Figura 3 - Consumo de água diário para cada camundongo.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

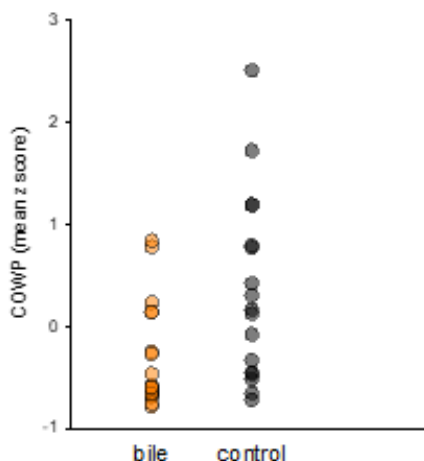
Legenda: As cores indicam o tratamento: sendo laranja os grupos tratados com ácido biliar e preto os grupos controles. Cada linha representa um camundongo.

2.4.4 Eliminação de oocistos

Em nossos experimentos, em média, os camundongos tratados com bile eliminaram menos oocistos (teste de soma de postos de Mann-Whitney, bile vs controle: $p=0,01$), as pontuações médias para Z score foram calculadas a partir de 19 pontuações de COWP de camundongos tratados com bile, o tamanho da amostra para os controles é 17 de pontuações de COWP. Através da análise de todos os dados de DNA COWP/grama de fezes, ao distinguir as amostras de camundongos que foram tratados das que não receberam tratamento, utilizando a média normalizada com base

no número de observações em cada conjunto de experimentos, conseguimos notar que houve uma diminuição de 63% na concentração de DNA fecal de *C. parvum* no experimento 43, com 18 amostras no grupo de tratamento e 21 amostras no grupo controle; uma queda de 88,0% no experimento 44, que contou com 22 amostras no grupo de tratamento e 25 amostras no grupo controle e uma redução de 36,8% no experimento 50, com 30 amostras no grupo de tratamento e 22 amostras no grupo controle. Utilizando os mesmos dados, aplicamos o teste estatístico *Two Way Repeated Measures ANOVA*, resultando em $p=0,181$ para o exp.43; $p=0,036$ para o exp.44; e $p=0,153$ para o exp.50, respectivamente, comparar os grupos de tratamento com os grupos de controle (Figura 4 e Figura 5).

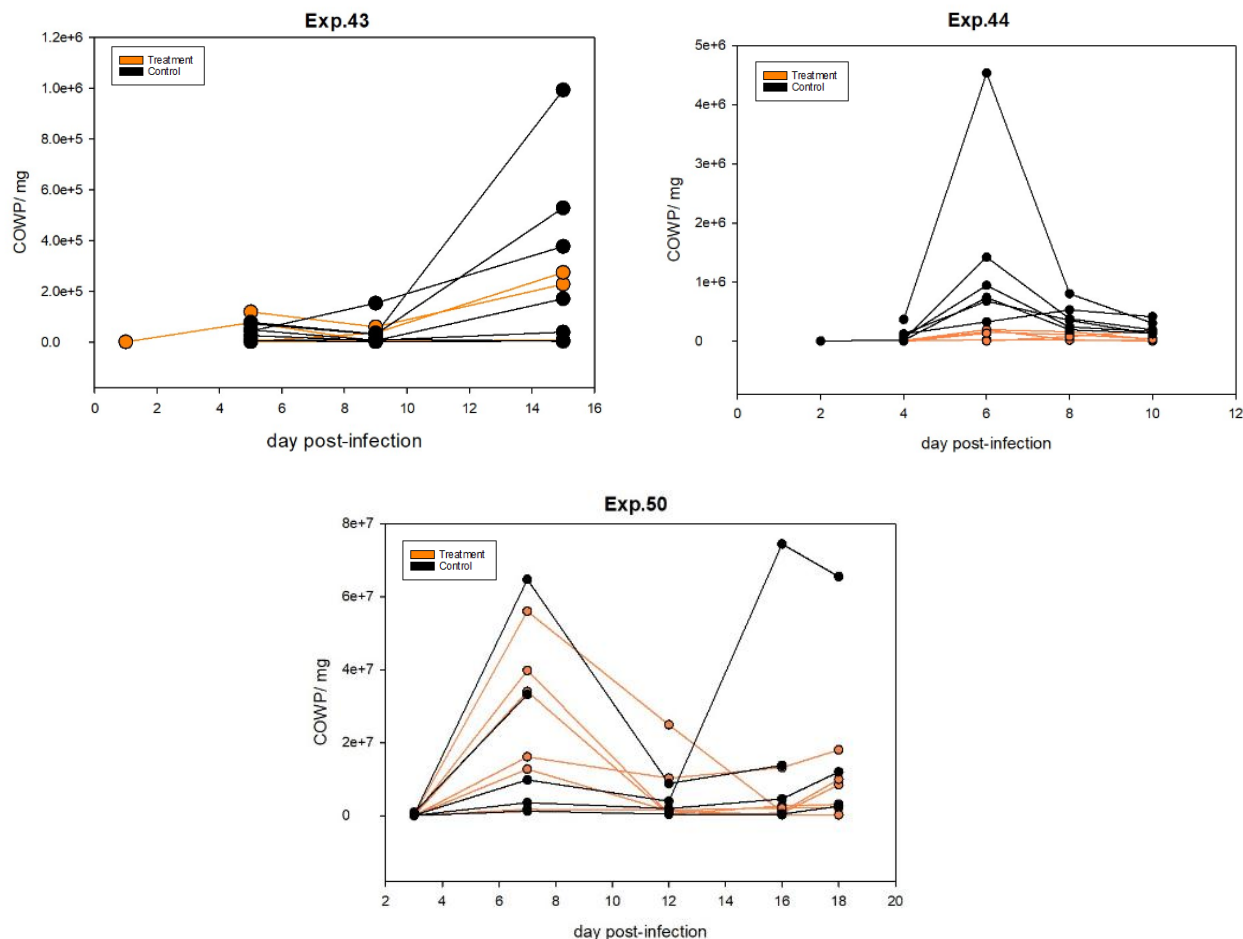
Figura 4 - Concentração de DNA de *C. parvum* nas fezes estimado com COWP qPCR e normalizados para pontuações Z (média subtraída e dividida por DP).



Fonte: Widmer, 2024.

Legenda: O gráfico mostra dados de 3 experimentos. Os dados são originários de 3 experimentos independentes.

Figura 5 - Concentração de DNA de *C. parvum* nas fezes estimado com COWP qPCR e normalizados pelo peso das fezes.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

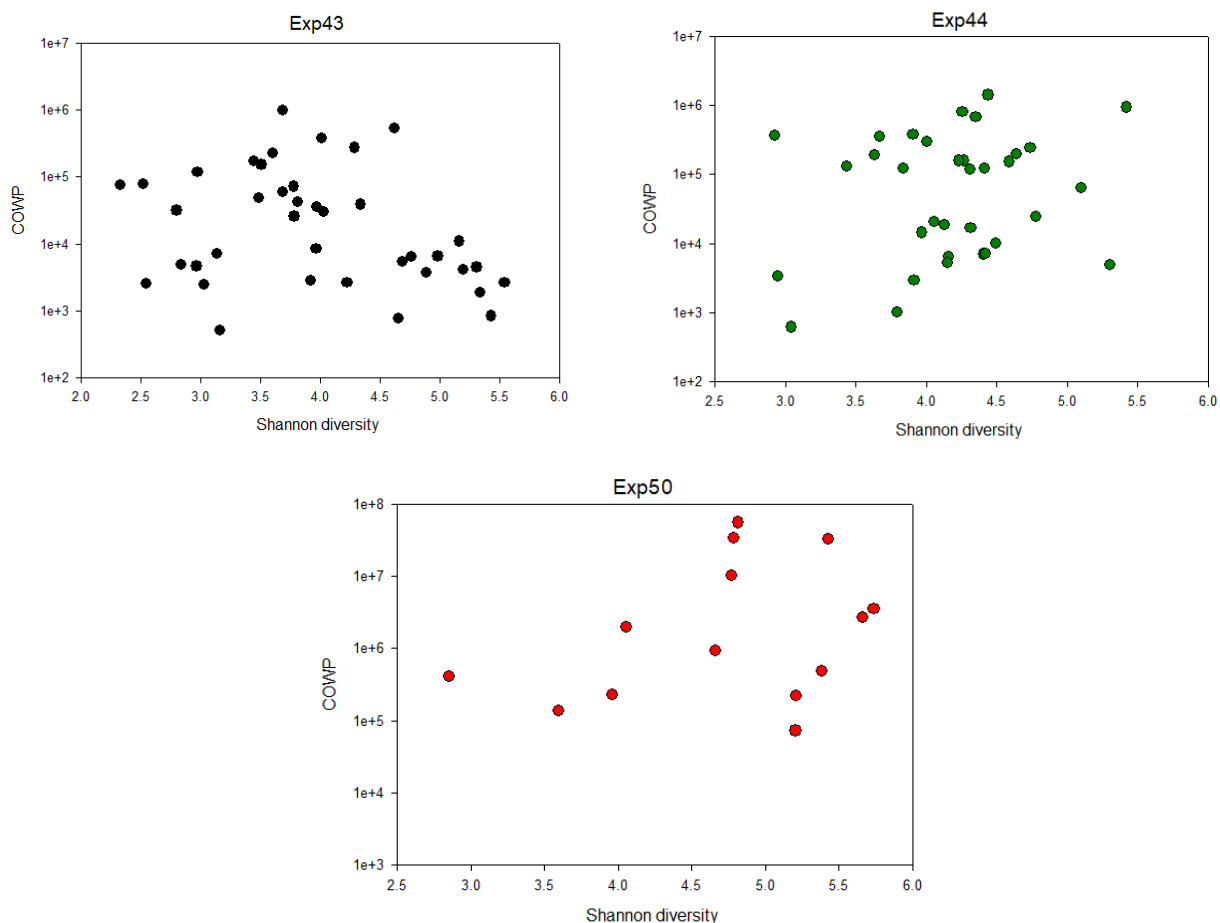
Legenda: As cores indicam o tratamento: sendo laranja os grupos tratados com ácido biliar e preto os grupos controles. Cada linha representa um camundongo.

Durante os experimentos, alguns camundongos em condições moribundas foram submetidos à eutanásia devido ao seu estado crítico. A distribuição dos casos por experimento e grupo foi a seguinte: Experimento 43 (i) grupo tratamento: 1 camundongo eutanasiado; (ii) grupo controle: 0 camundongos eutanasiados; Experimento 44 (i) grupo tratamento: 1 camundongo eutanasiado; (ii) grupo controle: 0 camundongos eutanasiados; Experimento 50 (i) grupo tratamento: 0 camundongos eutanasiados; (ii) grupo controle: 3 camundongos eutanasiados. No total, 5 camundongos foram submetidos à eutanásia ao longo dos experimentos, sendo 2 do grupo tratamento e 3 do grupo controle.

2.4.5 Eliminação de oocistos vs diversidade α

O teste de *Pearson Correlation* mostrou que não há relações significativas entre nenhum par de variáveis na tabela de correlação ($p > 0,050$). A produção de oocistos normalizada para o volume de fezes foi plotada contra a diversidade de Shannon para 39, 34 e 14 amostras nos experimentos 43, 44 e 50, respectivamente que foram analisadas para ambas as propriedades (Figura 6).

Figura 6 - Produção de oocistos normalizada por volume de fezes foi plotada contra a diversidade de Shannon.



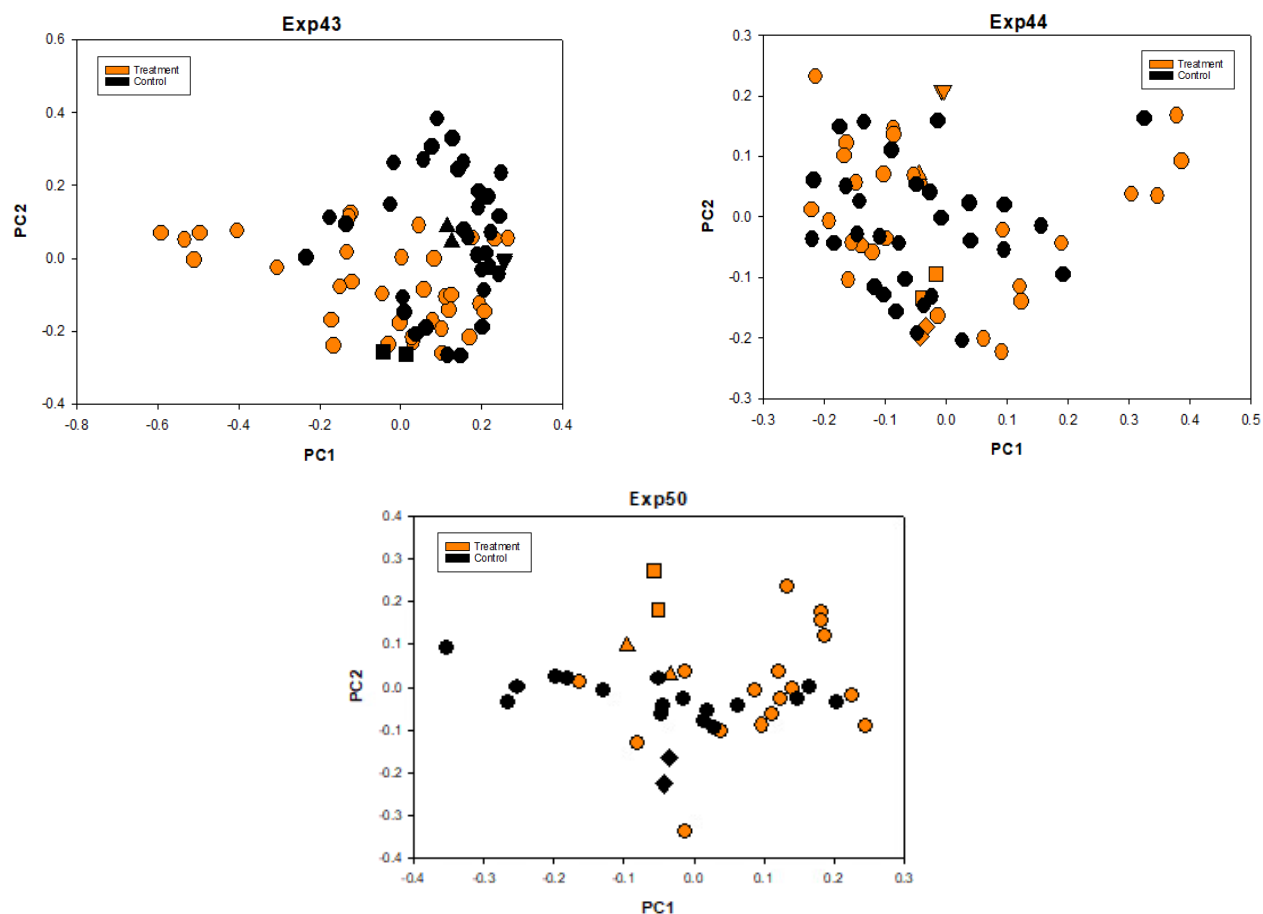
Fonte: Elaborado pela autora, 2025

Legenda: A cor indica o grupo experimental, sendo experimento 43 preto, experimento 44 verde, e experimento 50 vermelho.

2.4.6 Diversidade β

A análise de coordenadas principais (PCoA) da microbiota fecal dos três experimentos separadamente mostra mudanças significativas na microbiota dos grupos tratados com bile em comparação aos controles (exp.43, n= 72 amostras, *ANOSIM* p = <0.001, R = 0.162; exp.44, n= 60 amostras, *ANOSIM* p = 0.089, R = 0.026; exp.50, n= 40 amostras, *ANOSIM* p = <0.001, R = 0.211, (Figura 7). Porque a infecção é conhecida por impactar a microbiota [36], fizemos a mesma análise dos três experimentos separadamente das amostras antes do dia zero, ou seja, antes da infecção. Desta forma a análise das amostras antes do dia zero elimina o efeito da infecção por criptosporidiose na microbiota e permite detectar qualquer efeito do microbioma na criptosporidiose. Os dados nos mostram que nos experimentos exp.43, n= 14 amostras, *ANOSIM* p = 0.28, R = 0.029 e exp.50, n= 14, *ANOSIM* p = 0.059, R = 0.098, não possuíam nenhuma diferença significativa no microbioma, enquanto no exp.44, n= 14 amostras, *ANOSIM* p = 0.044, R = 0.026, havia uma leve diferença observada na microbiota fecal dos grupos tratados e controles.

Figura 7. Análise de PCoA de distâncias pareadas entre a microbiota fecal do camundongo com base na diversidade beta do UniFrac.



Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

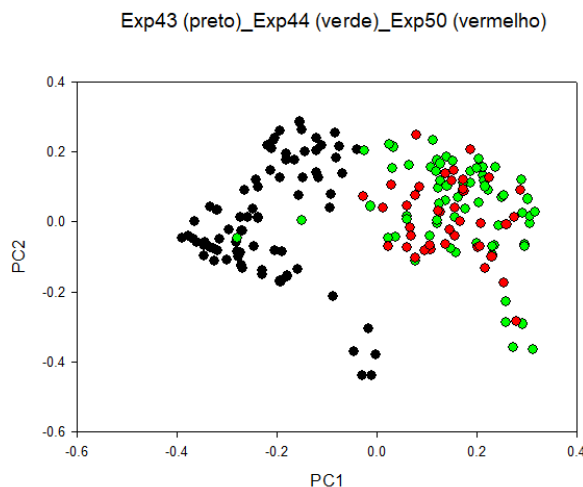
Legenda: Cada ícone indica uma amostra coletada, com as amostras sendo coloridas de acordo com o tratamento, onde o laranja representa o grupo de tratamento e o preto refere-se ao grupo controle. Esses são os mesmos gráficos mostrados na Figura 2, exceto que os pontos de dados são coloridos de acordo com o tratamento. Assim como na Figura 2, os quadrados e triângulos denotam as amostras que foram replicadas.

2.4.7 Diferenças encontradas devido ao lote de camundongos

Realizamos uma análise de coordenadas principais (PCoA) da microbiota fecal dos três experimentos combinados para verificar variações entre os três grupos de camundongos (todos os experimentos juntos 43-44-50, *ANOSIM* $p < 0,001$, $R = 0,609$; experimentos 43-44, *ANOSIM* $p < 0,001$, $R = 0,675$; experimentos 43-50 *ANOSIM* $p <$

0,001, $R = 0,713$; experimentos 44-50 *ANOSIM* $p < 0,001$, $R = 0,415$), observando variações na microbiota de acordo com o lote de camundongos (Figura 8).

Figura 8 - Análise de PCoA de distâncias pareadas entre a microbiota fecal dos camundongos dos três experimentos juntos com base na diversidade beta do UniFrac.

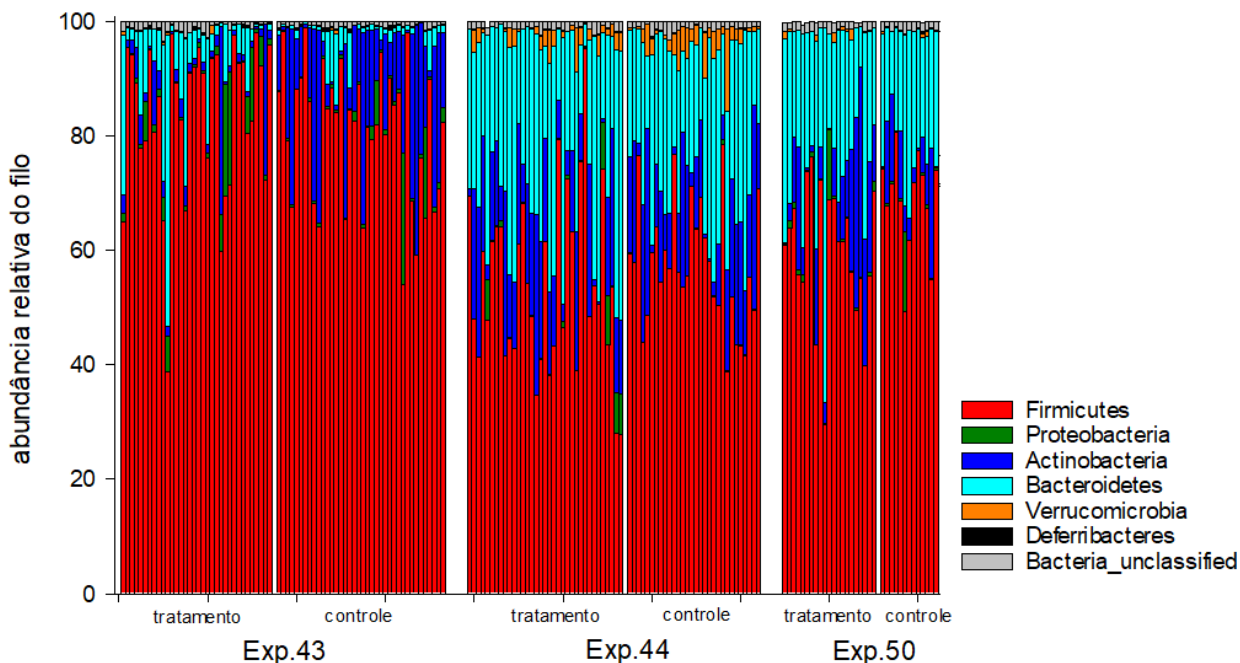


Fonte: Elaborado pela autora, 2024

Legenda: A cor indica o experimento, sendo experimento 43 preto, experimento 44 verde, e experimento 50 vermelho.

A Análise Discriminante Linear conforme implementada no programa *LEfSe* [34], foi usada para identificar diferenças estatisticamente significativas nos perfis de abundância de OTU entre dois grupos de amostras definidos pelo tratamento com ácido biliar e o grupo controle. Observamos com esses dados da saída do programa *LefSe* para OTUs individuais uma diferença significativa por meio do Qui-quadrado entre os táxons do grupo controle em comparação ao tratamento, Experimento 43 $p = <0.001$, Experimento 44 $p = 0,0273$, Experimento 50 $p = <0.001$. A figura 9 representa as taxonomias mais abundantes em cada experimento.

Figura 9 - A taxonomia do microbioma fecal de camundongos tratados e controles mostra uma grande diferença entre cada experimento, quando comparada a diferença mínima entre tratado e controle.



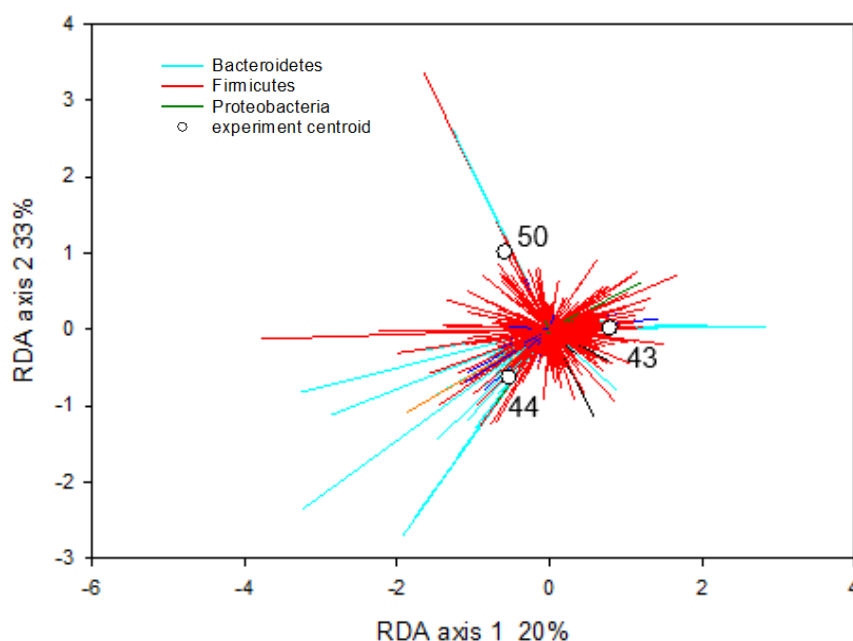
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Legenda: Gráficos de barras empilhadas de taxonomia: a cor indica filo identificado; Proteobactérias verdes; Firmicutes vermelho; Actinobactérias azul escuro; Verrucomicrobia laranja; Bacteroidetes azul turquesa. O gráfico foi criado utilizando a saída do comando *classify.seqs*, nível 2.

Empregamos o gráfico biplot gerado a partir de uma análise conduzida via RDA, nele consta os três experimentos, destacando as pontuações de OTUs e a variação das OTUs que têm menor e maior ligação com os experimentos e revela o efeito reduzido do tratamento com bile em relação ao experimento (Figura 10). Os vetores apontam para maior variação explicada pela variável independente (tratamento), quanto maior o vetor, maior a variação explicada por ela. Podemos perceber que os Bacteroidetes (vetores em azul) são os mais variáveis, ou seja as OTUs melhor explicadas pelo experimento são em sua maioria Bacteroidetes (Figura 11A), sendo que as OTUs menos correlacionados com o experimento são em sua maioria Firmicutes (vetores em vermelho) (Figura 11B). Ou seja, Bacteroidetes são os filos mais variáveis nos três experimentos e Firmicutes são relativamente uniformes em sua abundância independente do experimento ou tratamento utilizado. Na Figura 12

podemos visualizar o gráfico de barras empilhadas criado usando as contagens de OTUs da coluna FitE, nele podemos observar como a proporção de filos muda. Enquanto as porcentagens baixas de FitE são principalmente (85%) Firmicutes, o grupo muito alto (96-100% FitE) é principalmente Bacteroidetes. Isso nos diz que OTUs de Firmicutes tendem a ter uma abundância semelhante em todos os 3 experimentos, enquanto Bacteroidetes são muito mais variáveis e variam em abundância de acordo com o experimento. Isso também ficou aparente nos biplots (Figura 11A e 11B).

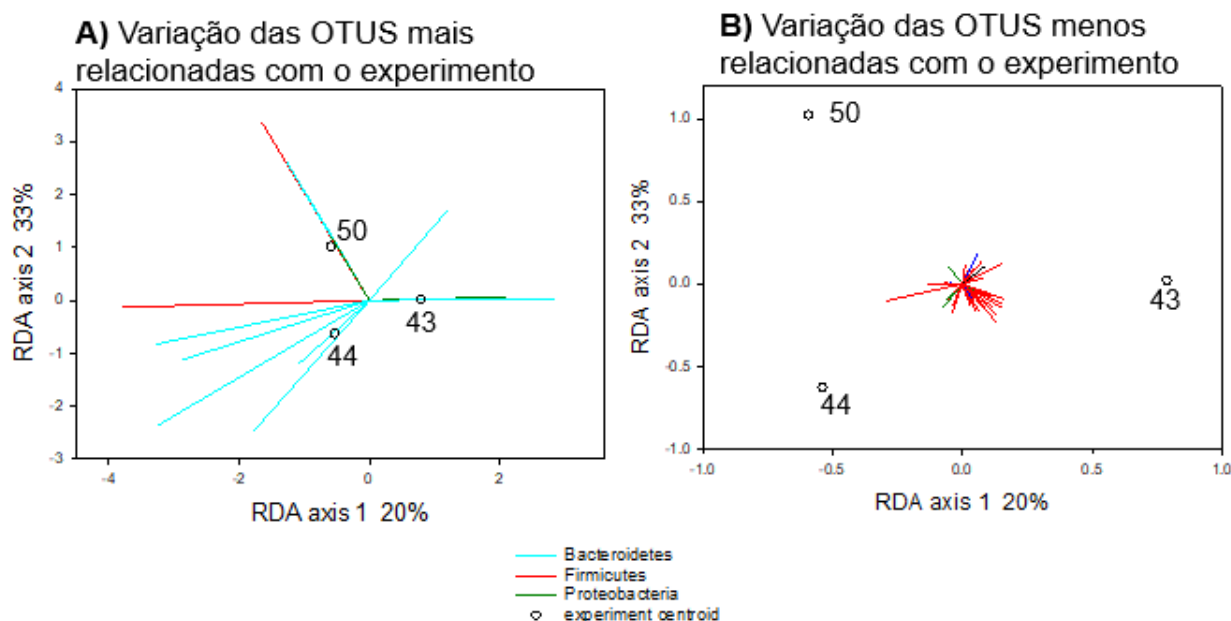
Figura 10 - O gráfico biplot mostrado a seguir foi elaborado a partir de uma análise de RDA e representa os três experimentos realizados.



Fonte: Widmer, 2025.

Legenda: As linhas do gráfico representam as pontuações das OTUs, que estão codificadas por cores de filos, como, por exemplo, Proteobactérias em verde; Firmicutes em vermelho; Actinobactérias em azul escuro; Verrucomicrobia em laranja; e Bacteroidetes em azul turquesa. Uma linha mais longa indica maior ajuste ao modelo RDA, ou seja, linhas mais longas indicam que uma OTU específica estava fortemente associada ao experimento, enquanto uma linha curta indica que uma OTU específica variou pouco entre a microbiota de diferentes experimentos.

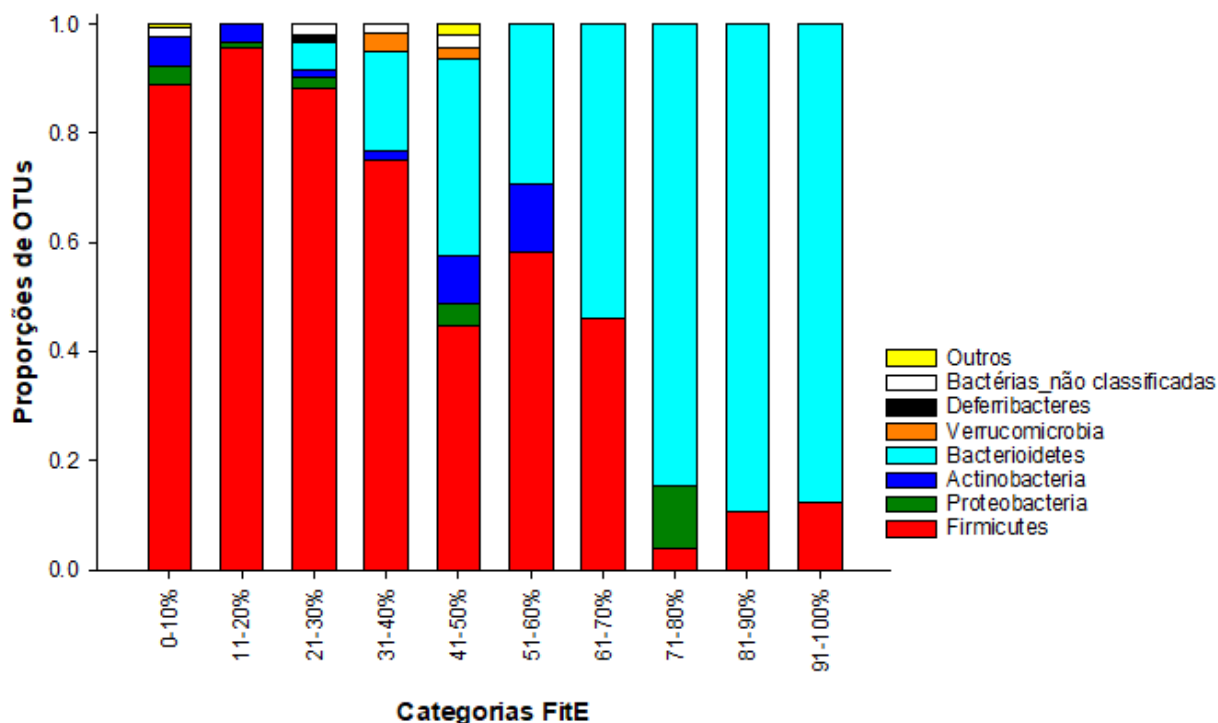
Figura 11 - O biplot ilustra os três experimentos realizados, foi criado a partir de uma RDA e ilustra os três experimentos, destacando as pontuações de OTUs e a variação das OTUs que têm menor e maior ligação com os experimentos.



Fonte: Widmer, 2025.

Legenda: Em particular, Firmicutes mostrados em vermelho são abundantes em 11B, indicando que bactérias neste filo tendem a variar menos entre experimentos. O oposto parece ser o caso de Bacteroidetes, pois são mais abundantes nas OTUs que são mais fortemente associadas ao experimento em 11A. As Proteobactérias estão em verde; as Firmicutes em vermelho; as Actinobactérias em azul escuro; as Verrucomicrobia em laranja; e as Bacteroidetes em azul turquesa. A variação observada entre os experimentos está intensamente ligada às Bacteroidetes, enquanto as Firmicutes apresentam uma grande diversidade. Os dois gráficos apresentam escalas diferentes para destacar de forma mais clara o ajuste ao modelo RDA.

Figura 12 - Gráfico de barras abaixo foi criado utilizando as contagens de OTUs dos três experimentos juntos, em função da porcentagem da variação explicada pela variável independente, neste caso o experimento.



Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

Legenda: Categorias de baixa porcentagem, como 0-10% e 11-20%, compreendem OTUs que não variam de acordo com o experimento, enquanto categorias de alta porcentagem incluem OTUs que variaram em abundância entre os experimentos. Os dados necessários para fazer os gráficos de barras empilhadas são as porcentagens de FitE produzidas por RDA. As cores indicam uma classificação taxonômica para cada OTU.

2.5 Discussão

O ácido biliar foi selecionado por quatro razões principais; (a) a bile induz a excitação de oocistos de espécies de *Cryptosporidium* que infetam regiões distais do trato gastrointestinal [19,37,38,39], (b) o crescimento de *C. parvum* pode ser prejudicado *in vitro* pela adição de ácidos biliares secundários [40], (c) podem impedir o crescimento de *C. difficile* *in vitro* [18] e (d) os ácidos biliares possuem atividades antimicrobianas [41].

Nossas análises de controle de qualidade indicaram que as sequências dos amplicons, processadas pelo mesmo pipeline do *mothur*, não apresentaram sinais de

influência da biblioteca, da reação de PCR ou da reação de sequenciamento nos resultados. Além disso, a distância UniFrac ponderada entre todas as comparações em pares não revelou qualquer evidência de impacto desses fatores na análise dos dados. Isso aumenta a confiabilidade em nossos resultados.

Observações esporádicas revisadas acima [11,12,42,43], indicam que a proliferação de *Cryptosporidium* pode ser afetada pela MI e vice-versa, e nos levaram a investigar o efeito do alojamento dos camundongos na microbiota fecal e a associação entre a microbiota e o curso da infecção. Para esta análise, utilizamos as amostras do experimento 44, no qual camundongos foram alojados tanto em grupo quanto individualmente. Observamos mudanças significativas na microbiota dos camundongos mantidos individualmente em comparação com aqueles alojados em grupo. No entanto, a análise da distância UniFrac ponderada indicou que as populações bacterianas desses dois grupos não eram drasticamente diferentes. Vale ressaltar que o número reduzido de amostras pode ter influenciado os resultados. Na ausência de interação entre camundongos, camundongos alojados individualmente são um modelo ideal para medir o efeito de condições experimentais específicas no curso da criptosporidiose, na MI e para detectar possíveis associações entre infecção e microbiota.

Em nossos experimentos, em média, os camundongos tratados com bile eliminaram menos oocistos. Esses resultados lembram *C. difficile*, onde um aumento nos níveis de ácidos biliares secundários foi associado à diminuição em sua recorrência [18]. Experimentos feitos por Funkhouser- Jones e colaboradores mostraram que a administração oral de ácidos biliares secundários atrasou a progressão do ciclo de vida do parasito *in vitro* e reduziu a gravidade da infecção em camundongos, porque os metabólitos da microbiota prejudicam a função mitocondrial e contribuem para a resistência da colonização à infecção por *Cryptosporidium* [40]. Essa observação também pode explicar os resultados observados por nós. Outros autores também já comprovaram *in vitro* o efeito dos ácidos biliares secundários no *Cryptosporidium* [19,44], como por exemplo na excitação de algumas espécies de *Cryptosporidium* que afetam o duodeno, e órgãos GI distais. De forma significativa, o efeito do ácido biliar não foi observado em espécies de *Cryptosporidium* que infectam o estômago [19]. Além disso, os metabólitos intestinais mais prevalentes em camundongos adultos, que

apresentam maior resistência à infecção por *C. parvum*, também não demonstraram uma relação clara com a ação do ácido biliar.

Os ácidos biliares também influenciam na diversidade da microbiota. Em humanos, o ácido tauro- β -muricólico (tauro- β -MCA) e o ácido taurocólico são essenciais para o desenvolvimento de uma microbiota diversa, semelhante à adulta [45]. Além disso, o metabolismo do hospedeiro pode ser afetado tanto por modificações microbianas dos ácidos biliares, o que leva à alteração da sinalização via receptores de ácidos biliares, quanto por alterações na composição da microbiota [20].

Um estudo que analisou a composição de ácidos biliares nas fezes de pacientes com infecção recorrente por *Clostridioides difficile* demonstrou que essa condição leva a uma disbiose intestinal, resultando no acúmulo de ácidos biliares primários no trato gastrointestinal. Alguns desses ácidos primários podem favorecer a germinação dos esporos e o crescimento vegetativo de *C. difficile*. Em contrapartida, os ácidos biliares secundários, que são produzidos pela conversão microbiana dos primários, desempenham um papel fundamental na homeostase do hospedeiro e na resistência contra infecções, incluindo *C. difficile* [18,46,47]. Assim, acredita-se que o equilíbrio entre ácidos biliares primários e secundários seja um fator determinante na resistência ou suscetibilidade à infecção [48]. A conversão de ácidos biliares primários em secundários, realizada pela microbiota intestinal, é essencial para limitar a proliferação de *C. difficile* e evitar infecções recorrentes.

A produção de oocistos não está relacionada à diversidade do microbioma bacteriano em nenhum dos experimentos, o teste de *Pearson Correlation* mostrou não haver relações significativas entre os dados de COWP com a diversidade de Shannon, métrica de diversidade utilizada para avaliar a diversidade α . Nossas análises de coordenadas principais (PCoA) da microbiota fecal comparando os três experimentos separadamente mostra mudanças significativas na microbiota dos grupos tratados em comparação aos controles. A mesma análise foi feita para as amostras colhidas antes de realizarmos a infecção por *Cryptosporidium* para sabermos se a mesma diferença estatística estaria presente. Com exceção do experimento 44 não tinha nenhuma diferença da microbiota do grupo tratamento em comparação ao grupo controle. Todavia, já foi observado anteriormente que pode haver uma segregação da microbiota

que povoa camundongos de diferentes lotes, antes mesmo de haver qualquer intervenção experimental [22].

A MI é composta predominantemente por dois grupos bacterianos – Firmicutes e Bacteroidetes – que, em microbiotas saudáveis, representam mais de 90% da comunidade, além de outros grupos menores como Proteobacteria, Actinobacteria e Verrucomicrobia [49]. Em nossos experimentos, a análise taxonômica do microbioma fecal revelou que os níveis de Bacteroidetes variaram significativamente entre os diferentes lotes de camundongos, enquanto Firmicutes apresentaram variações mínimas entre os experimentos. Essa disparidade é importante, pois a MI modula processos biológicos essenciais, incluindo a resposta imunológica, o metabolismo e a resposta a infecções. Assim, camundongos de lotes diferentes, que possuem microbiotas distintas, podem apresentar respostas imunológicas e fisiológicas variadas, reagindo de maneiras diversas a patógenos [50,51]. Com base nisso, duas estratégias podem ser consideradas: (i) Normalizar a microbiota antes da infecção experimental, realizando uma análise prévia para identificar e ajustar as diferenças na abundância de filos variáveis entre camundongos e grupos experimentais, de modo a reduzir as variações na resposta à infecção; (ii) Melhorar a proteção contra infecções entéricas através da introdução de microbiota intestinal de doadores resistentes, promovendo uma composição microbiana mais homogênea e favorável à defesa do hospedeiro.

Firmicutes (recentemente reclassificado para Bacillota [52] e Bacteroidetes, quando em proporções muito baixas podem ser biomarcadores precisos para suscetibilidade à criptosporidiose, isso também foi observado por Hurle e colaboradores [53]. Enquanto, diversas bactérias inflamatórias são vistas se estabelecendo no intestino disbiótico. Bactérias da família Proteobacteria são reconhecidas por sua habilidade de se instalar no intestino em situações disbióticas, incluindo enfermidades [54].

Nossos dados mostram que não houve um efeito do tratamento da bile, comparado ao experimento e podemos notar que os filos Bacteroidetes são os mais variáveis entre os três experimentos, enquanto os filos de Firmicutes não são correlacionados com o experimento estando presente de forma mais uniforme independente da cepa de camundongo ou tratamento utilizado. Por falta de controles

negativos (camundongos não infectados) e visto que os tratamentos com ácido biliar nos três experimentos foram iniciados no dia zero, mesmo dia da infecção por *Cryptosporidium*, não podemos afirmar que a microbiota intestinal bacteriana modulada pelo ácido biliar exerceu alguma influência sobre a gravidade da infecção.

2.6 Conclusão

Nossos dados mostram que não houve um efeito do tratamento da bile sobre o microbioma, ao passo que o impacto de cada experimento se mostrou mais evidente do que o tratamento. O estudo apresentado é importante para nosso objetivo de criar intervenções que ajudem a reduzir os efeitos debilitantes causados pela criptosporidiose. Essas iniciativas tornam-se ainda mais relevantes, considerando os desafios relacionados à criação e à avaliação de medicamentos curativos. Ademais, essa pesquisa fornece informações valiosas para promover o entendimento do ácido biliar como uma possível terapia tanto para humanos quanto para animais afetados pela criptosporidiose.

2.7 Agradecimentos

Financiamento: Bolsa de doutorado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001. Nossos agradecimentos ao Departamento de Doenças Infecciosas e Saúde Global da Universidade Tufts.

2.8 Referências

1. Checkley, W., White, A.C. Jr., Jaganath, D., Arrowood, M.J., Chalmers, R.M., Chen, X.M., Fayer, R., Griffiths, J.K. et al. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. **Lancet Infect Dis.**, v. 15, n. 1, p. 85-94, 2015. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70772-8.

2. Cacciò, S.M., Chalmers, R.M. Human cryptosporidiosis in Europe. **Clin Microbiol Infect.**, v. 22, n. 6, p. 471-80, 2016. doi: 10.1016/j.cmi.2016.04.021. Epub 2016 May 10. PMID: 27172805.
3. Dumaine, J.E., Tandel, J., Striepen, B. *Cryptosporidium parvum*. **Trends Parasitol.**, v. 5, p. 485-486, 2020. doi: 10.1016/j.pt.2019.11.003. PMID: 31836286.
4. Wegayehu, T., Karim, R., Anberber, M., Adamu, H., Erko, B., Zhang, L., Tilahun, G. Prevalence and Genetic Characterization of *Cryptosporidium* Species in Dairy Calves in Central Ethiopia. **PLoS One.**, v. 11, n. 5, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0154647. PMID: 27135243; PMCID: PMC4852944.
5. Xiao, L., Feng, Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Food Waterborne Parasitol.**, 2017.
6. Ryan, U.M., Feng, Y., Faye, R., Xiao, L. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* - a 50 year perspective (1971–2021) **Int J Parasitol.**, 2021. doi: 10.1016/j.ijpara.2021.08.007.
7. Chalmers, R.M., Giles, M. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK - challenges for control. **J Appl Microbiol.**, v. 109, p. 1487–1497, 2010. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04764.x.
8. Santín, M. *Cryptosporidium* and *Giardia* in ruminants. **Vet Clin N Am Food Anim Pract.**, v. 36, n. 1, p. 223–238, 2020. doi: 10.1016/j.cvfa.2019.11.005.
9. Yang, X., Guo, Y., Xiao, L., Feng, Y. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis in low- and middle-income countries. **Clin Microbiol Rev.** v. 34, n. 2, 2021. doi: 10.1128/CMR.00087-19.
10. Silva, D.R.R., Oliveira, T.C.B. de., Marta, B.B.F., Baptista, C.B., Bottaro, M.C.Z., Bresciani, K.D.S. Vaccine development for cryptosporidiosis: Systematic review. **Research, Society and Development**, 2021. doi: 10.33448/rsd-v10i6.15540.
11. Striepen, B., Kissinger, J.C. Genomics meets transgenics in search of the elusive *Cryptosporidium* drug target. **Trends Parasitol.** v. 20, p. 355–358, 2004. doi: 10.1016/j.pt.2004.06.003.
12. Striepen, B., Pruijssers, A.J., Huang, J., Li C., Gubbels, M.J., Umejiego, N.N., Hedstrom, L., Kissinger, J.C. Gene transfer in the evolution of parasite nucleotide biosynthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 2004. doi: 10.1073/pnas.0304686101.
13. Harp, J.A., Chen, W., Harmsen, A.G. Resistance of severe combined immunodeficient mice to infection with *Cryptosporidium parvum*: The importance of intestinal microflora. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 3509–3512, 1992. doi: 10.1128/iai.60.9.3509-3512.1992.

14. Harp, J.A. *Cryptosporidium* and host resistance: Historical perspective and some novel approaches. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 4, p. 53–62, 2003. doi: 10.1079/AHRR200352.
15. Kemis, J.H., Linke, V., Barrett, K.L., Boehm, F.J., Traeger, L.L., Keller, M.P., Rey, F.E. Genetic determinants of gut microbiota composition and bile acid profiles in mice. **PLOS Genetics**, v. 15, n. 8, 2019. doi:10.1371/journal.pgen.1008073.
16. Buffie, C.G., Bucci, V., Stein, R.R., McKenney, P.T., Ling, L., Gobourne, A., No, D., Liu, H., Kinnebrew, M., Viale, A., Littmann, E., van den Brink, M.R., Jenq, R.R., Taur, Y., Sander, C., Cross, J.R., Toussaint, N.C., Xavier, J.B., Pamer, E.G. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. **Nature**, 2015. doi: 10.1038/nature13828.
17. Wilson, K.H. Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of *Clostridium difficile* spore germination. **J Clin Microbiol.**, v. 18, n. 4, p. 1017-9. 1983. doi: 10.1128/jcm.18.4.1017-1019.1983. PMID: 6630458; PMCID: PMC270959.
18. Theriot, C.M., Bowman, A.A., Young, V.B. Antibiotic-Induced Alterations of the Gut Microbiota Alter Secondary Bile Acid Production and Allow for *Clostridium difficile* Spore Germination and Outgrowth in the Large Intestine. v. 1, n. 1, 2016. doi: 10.1128/mSphere.00045-15.
19. Widmer, G., Klein, P., Bonilla, R. Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. **Parasitology**, v. 134, n. 11, p. 1583-1588, 2007.
20. Collins, S.L., Stine, J.G., Bisanz, J.E. et al. Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease. **Nat Rev Microbiol.**, v. 21, p. 236–247. 2023.
21. Oliveira, B.C.M., Widmer, G. Probiotic product enhances susceptibility of mice to cryptosporidiosis. **Appl Environ Microbiol.**, 2018. doi: 10.1128/aem.01408-18.
22. Creasey, H.N., Zhang, W., Widmer, G. Effect of Caging on *Cryptosporidium parvum* Proliferation in Mice. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1242, 2022. doi: 10.3390/microorganisms10061242. PMID: 35744762; PMCID: PMC9230662.
23. Widmer, G., Creasey, H.N. Fecal microbiota impacts development of *Cryptosporidium parvum* in the mouse. **Sci Rep.**, v. 14, n. 1, p. 5498, 2024. doi: 10.1038/s41598-024-56184-1. PMID: 38448682; PMCID: PMC10917813.
24. Yang, S., Healey, M.C. The immunosuppressive effects of dexamethasone administered in drinking water to C57BL/6N mice infected with *Cryptosporidium parvum*. **J Parasitol.**, v. 79, n. 4, p. 626-30, 1993. PMID: 8331488.
25. Widmer, G., Feng, X. & Tanriverdi, S. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* with microsatellite markers. **Methods Mol. Biol.**, 2004.

26. Ma, P. & Soave, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **J. Infect. Dis.** v. 147, p. 824–828, 1983.
27. Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., Schloss, P.D. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. **Appl Environ Microbiol.**, 2013. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>.
28. 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. Introducing mothur: open-source, platformindependent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, p. 7537-41, 2009.
29. Ferrari, E.D., Oliveira, B.C.M., Creasey, H.N., Romualdo da Silva, D.R., Nakamura, A.A., Bresciani, K.D.S., Widmer, G. The Impact of Physical Effort on the Gut Microbiota of Long-Distance Fliers. **Microorganisms**, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071766>
30. Becker-Dreps, S., Allali, I., Monteagudo, A., Vilchez, S., Hudgens, M.G., Rogawski, E.T., Carroll, I.M., Zambrana, L.E., Espinoza, F., Azcarate-Peril, M.A. Gut Microbiome Composition in Young Nicaraguan Children During Diarrhea Episodes and Recovery. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 93, p.1187-93, 2015.
31. Peakall, R. and Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2006.
32. Peakall, R. and Smouse P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537-2539, 2012. Disponível: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/19/2537>. Acesso em 15 de outubro de 2024
33. Clarke, K.R. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, v. 18, p. 117-143, 1993.
34. Segata, N., J. Izard, L. Waldron, D. Gevers, L. Miropolsky, W. S. Garrett, and C. Huttenhower. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biol**, 2011.
35. Braak, C.t., Šmilauer, P. CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, New York. 2002.

36. Ras, R., Huynh, K., Desoky, E., Badawy, A., Widmer, G. Perturbation of the intestinal microbiota of mice infected with *Cryptosporidium parvum*. **Int J Parasitol.** v. 45, n. 8, p. 567–73, 2015. pmid:25913477.
37. Campbell, A.T., Robertson, L.J. and Smith, H.V. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3488–3493, 1992.
38. Robertson, L.J., Campbell, A.T. and Smith, H.V. In vitro excystation of *Cryptosporidium parvum*. **Parasitology**, v. 106, p. 13–19, 1993.
39. Kato, S., Jenkins, M.B., Ghiorse, W C. and Bowman, D.D. Chemical and physical factors affecting the excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 575–581, 2001.
40. Funkhouser-Jones, L. J., Xu, R., Wilke, G., Fu, Y., Shriefer, L. A., Makimaa, H., Rodgers, R., Kennedy, E. A., Vandussen, K. L., Stappenbeck, T. S., Baldrige, M. T., Sibley, L. D. Microbiota produced indole metabolites disrupt host cell mitochondrial energy production and inhibit *Cryptosporidium parvum* growth. **Cell Rep.**, v. 42, n. 7, p.112680, 2023. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112680.
41. Zheng, X., Huang, F., Zhao, A., LEI, S., Zhang, Y., Xie, G., Chen, T., Qu, C., Rajani, C., Dong, B., Li, D., Jia, W. Bile acid is a significant host factor shaping the gut microbiome of diet-induced obese mice. **BMC Biol.**, v. 15, n. 1, p. 120, 2017. doi: 10.1186/s12915-017-0462-7.
42. Berrilli, F., Di Cave, D., Cavallero, S., D'amelio, S. Interactions between parasites and microbial communities in the human gut. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 16, p. 2-141, 2012. doi: 10.3389/fcimb.2012.00141.
43. Bancroft, A.J., Hayes, K.S., Grencis, R.K. Life on the edge: the balance between macrofauna, microflora and host immunity. **Trends Parasitol.**, v. 28, n. 3, p. 93-8, 2012. doi: 10.1016/j.pt.2011.12.001.
44. Vandussen, K.L., Funkhouser-Jones, L.J., Akey, M.E., Schaefer, D.A., Ackman, K., Riggs, M.W., Stappenbeck, T.S., Sibley, L.D. Neonatal Mouse Gut Metabolites Influence *Cryptosporidium parvum* Infection in Intestinal Epithelial Cells, v. 11, n. 6, 2020. doi: 10.1128/mBio.02582-20.
45. Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I. The human microbiome project. **Nature.**, 2007. doi: 10.1038/nature06244. PMID: 17943116; PMCID: PMC3709439.
46. Ridlon, J.M., Kang, D.-J., Hylemon, P.B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. **J. Lipid. Res.**, v. 47, p. 241–259, 2006.

47. Robinson, JI et al. Redes metabólicas conectam processos do microbioma hospedeiro a infecções humanas por *Clostridioides difficile* . **J. Clin. Invest.**, v. 129, p. 3792–3806 2019.
48. Papazyan, R., Ferdyan, N., Srinivasan, K., Gonzalez, C., Shannon, W.D., Blount, K., Fuchs, B.C. Human Fecal Bile Acid Analysis after Investigational Microbiota-Based Live Biotherapeutic Delivery for Recurrent *Clostridioides difficile* Infection. **Microorganisms**, v. 11, p. 135, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010135>.
49. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K., Manichanh, C., et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, p. 59–65, 2010.
50. Yu, A.I., Zhao, L., Eaton, K.A., Ho, S., Chen, J., Poe, S., ... Chen, G. Y. Gut Microbiota Modulate CD8 T Cell Responses to Influence Colitis-Associated Tumorigenesis. **Cell Reports**, v. 31, n. 1, p. 107471, 2020. doi:10.1016/j.celrep.2020.03.035.
51. Porras, A.M., Shi, Q., Zhou, H., Callahan, R., Montenegro-Bethancourt, G., Solomons, N., & Brito, I.L. Geographic differences in gut microbiota composition impact susceptibility to enteric infection. **Cell Reports**, v. 36, n. 4, p. 109457, 2021. doi:10.1016/j.celrep.2021.109457.
52. Oren, A., Garrity, G.M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. **Int J Syst Evol Microbiol.**, 2021. doi: 10.1099/ijsem.0.005056. PMID: 34694987.
53. Hurle, G.R., Brainard, J., Tyler, KM. Microbiome diversity is a modifiable virulence factor for cryptosporidiosis. *Virulence*, 2023. doi: 10.1080/21505594.2023.2273004. Epub 2023 Nov 10. PMID: 37872759; PMCID: PMC10653618.
54. Gilbert, J.A., Quinn, R.A., Debelius, J., et al. Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. **Nature.**, v. 535, n. 7610, p. 94–103, 2016. doi: 10.1038/nature18850.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AMADI, B.; MWIYA, M.; SIANONGO, S.; PAYNE, L.; WATUKA, A.; KATUBULUSHI, M.; KELLY, P. High dose prolonged treatment with nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian children: a randomised controlled trial. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 9, art. 195, p. 1-7, 2009. DOI: 10.1186/1471-2334-9-195.

ASNICAR, F.; BERRY, S. E.; VALDES, A. M.; NGUYEN, L. H.; PICCINNO, G.; DREW, D. A.; LEEMING, E.; GIBSON, R.; LE ROY, C.; KHATIB, H. A.; FRANCIS, L.; MAZIDI, M.; MOMPEO, O.; VALLES-COLOMER, M.; TETT, A.; BEGHINI, F.; DUBOIS, L.; BAZZANI, D.; THOMAS, A. M.; MIRZAYI, C.; KHLEBORODOVA, A.; OH, S.; HINE, R.; BONNETT, C.; CAPDEVILA, J.; DANZANVILLIERS, S.; GIORDANO, F.; GEISTLINGER, L.; WALDRON, L.; DAVIES, R.; HADJIGEORGIOU, G.; WOLF, J.; ORDOVÁS, J. M.; GARDNER, C.; FRANKS, P. W.; CHAN, A. T.; HUTTENHOWER, C.; SPECTOR, T. D.; SEGATA, N. Microbiome connections with host metabolism and habitual diet from 1,098 deeply phenotyped individuals. **Nature Medicine**, New York, v. 27, n. 2, p. 321-332, 2021. DOI: 10.1038/s41591-020-01183-8.

BANCROFT, A. J.; HAYES, K. S.; GRENCIS, R. K. Life on the edge: the balance between macrofauna, microflora and host immunity. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 93-98, 2012. DOI: 10.1016/j.pt.2011.12.001.

BEGLEY, M.; SLEATOR, R. D.; GAHAN, C. G.; HILL, C. Contribution of three bile-associated loci, *bsh*, *pva*, and *btlB*, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 894-904, 2005. DOI: 10.1128/IAI.73.2.894-904.2005.

BERRILLI, F.; DI CAVE, D.; CAVALLERO, S.; D'AMELIO, S. Interactions between parasites and microbial communities in the human gut. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 16, n. 2, art. 141, p. 1-6, 2012. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00141.

BROOK, E. J.; HART, A. C.; FRENCH, N. P.; CHRISTLEY, R. M. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. **Veterinary Journal**, London, v. 179, n. 3, p. 378-382, 2009. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.10.023.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Cryptosporidiosis outbreaks associated with recreational water use - five states, 2006. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 56, n. 29, p. 729-732, 2007.

CHALMERS, R. M.; CAMPBELL, B. M.; CROUCH, N.; CHARLETT, A.; DAVIES, A. P. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven cryptosporidium assays used in the UK. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 60, , pt. 11, p. 1598-1604, 2011. DOI: 10.1099/jmm.0.034181-0.

CHECKLEY, W.; WHITE, A. C. Jr.; JAGANATH, D.; ARROWOOD, M. J.; CHALMERS, R. M.; CHEN, X. M.; FAYER, R.; GRIFFITHS, J. K.; GUERRANT, R. L.; HEDSTROM, L.; HUSTON, C. D.; KOTLOFF, K. L.; KANG, G.; MEAD, J. R.; MILLER, M.; PETRI JR, W. A.; PRIEST, J. W.; ROOS, D. S.; STRIEPEN, B.; THOMPSON, R. C. A.; WARD, H. D.; VOORHIS, W. A. V.; XIAO, L.; ZHU, G.; HOUP, E. R. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. **The Lancet. Infectious Diseases**, New York, v. 15, n. 1, p. 85-94, 2015. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70772-8.

CHEN, L.; WANG, D.; GARMAEVA, S.; KURILSHIKOV, A.; VICH VILA, A.; GACESA, R.; SINHA, T.; LIFELINES COHORT STUDY; SEGAL, E.; WEERSMA, R. K.; WIJMENGA, C.; ZHERNAKOVA, A.; FU, J. The long-term genetic stability and individual specificity of the human gut microbiome. **Cell**, Cambridge, v. 184, n. 9, p. 2302-2315.e12, 2021. DOI: 10.1016/j.cell.2021.03.024.

COLLINS, S. L.; STINE, J.G.; BISANZ, J. E.; OKAFOR, C. D.; PATTERSON, A. D. Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 21, n. 4, p. 236-247, 2023. DOI: 10.1038/s41579-022-00805-x.

D'ANTONIO, R. G.; WINN, R. E.; TAYLOR, J. P.; GUSTAFSON, T. L.; CURRENT, W. L.; RHODES, M. M.; GARY JR, G. W.; ZAJAC, R. A. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 103, n. 6, pt. 1, p. 886-888, 1985. DOI: 10.7326/0003-4819-103-6-886.

FUNKHOUSER-JONES, L. J.; XU, R.; WILKE, G.; FU, Y.; SHRIEFER, L. A.; MAKIMAA, H.; RODGERS, R.; KENNEDY, E. A.; VANDUSSEN, K. L.; STAPPENBECK, T. S.; BALDRIDGE, M. T.; SIBLEY, L. D. Microbiota produced indole metabolites disrupt host cell mitochondrial energy production and inhibit *Cryptosporidium parvum* growth. **Cell Reports**, Cambridge, v. 42, n. 7, art. 112680, p. 1-45, 2023. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112680.

GONZÁLEZ-REGUEIRO, J. A.; MORENO-CASTAÑEDA, L.; URIBE, M.; CHÁVEZ-TAPIA, N. C. The role of bile acids in glucose metabolism and their relation with diabetes. **Annals of Hepatology**, Mexico, v. 16, n. s3-105, p. 16-21, 2017. Supl. 1. DOI:10.5604/01.3001.0010.5672.

GORLA, S. K.; MCNAIR, N. N.; YANG, G.; GAO, S.; HU, M.; JALA, V. R.; HARIBABU, B.; STRIEPEN, B.; CUNY, G. D.; MEAD, J. R.; HEDSTROM, L. Validation of IMP dehydrogenase inhibitors in a mouse model of cryptosporidiosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington-DC, v. 58, n. 3, p.1603-1614, 2014. DOI: 10.1128/AAC.02075-13.

GUPTA, M.; PETSALIS, M.; POWERS, K.; CHEN, H. Y.; CHAUHAN, S. P.; WAGNER, S. Randomized clinical trials in obstetrics-gynecology registered at ClinicalTrials.gov: characteristics and factors associated with publication. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 251, p. 223-228, 2020. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2020.05.060.

HARP, J. A. *Cryptosporidium* and host resistance: historical perspective and some novel approaches. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 4, n. 1, p. 53-62, 2003. DOI: 10.1079/AHRR200352.

HARP, J. A.; CHEN, W.; HARMSSEN, A. G. Resistance of severe combined immunodeficient mice to infection with *Cryptosporidium parvum*: the importance of intestinal microflora. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 60, n. 9, p. 3509-3512, 1992. DOI: 10.1128/iai.60.9.3509-3512.1992.

HAYES, E. B.; MATTE, T. D.; O'BRIEN, T. R.; MCKINLEY, T. W.; LOGSDON, G. S.; ROSE, J. B.; UNGAR, B. L. P.; WORD, D. M.; PINSKY, P. F.; CUMMINGS, M. L.; WILSON, M. A.; LONG, E. G.; HURWITZ, E. S.; JURANEK, D. D. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 320, p. 1372-1376, 1989. DOI: 10.1056/NEJM198905253202103.

HERREMA, H.; IJZERMAN, R. G.; NIEUWDORP, M. Emerging role of intestinal microbiota and microbial metabolites in metabolic control. **Diabetologia**, Berlin, v. 60, n. 4, p. 613-617, 2017. DOI: 10.1007/s00125-016-4192-0.

HLAVSA, M. C.; ALUKO, S. K.; MILLER, A. D.; PERSON, J.; GERDES, M. E.; LEE, S.; LACO, J. P.; HANNAPEL, E. J.; HILL, V. R. Outbreaks associated with treated recreational water - United States, 2015-2019. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 70, n. 20, p. 733-738, 2021. DOI: 10.15585/mmwr.mm7020a1.

JOCE, R. E.; BRUCE, J.; KIELY, D.; NOAH, N. D.; DEMPSTER, W. B.; STALKER, R.; GUMSLEY, P.; CHAPMAN, P. A.; NORMAN, P.; WATKINS, J.; SMITH, H. V.; PRICE, T. J.; WATTS, D. An outbreak of cryptosporidiosis associated with a swimming pool. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 107, n. 3, p. 497-508, 1991. DOI: 10.1017/s0950268800049190.

KHAN, S. M.; WITOLA, W. H. Past, current, and potential treatments for cryptosporidiosis in humans and farm animals: a comprehensive review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 13, art. 1115522, p. 1-29, 2023. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1115522.

KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C.; NASRIN, D.; FARAG, T. H.; PANCHALINGAM, S.; WU Y.; SOW, S.O.; SUR, D.; BREIMAN, R. F.; FARUQUE, A. S.; ZAIDI, A. K.; SAHA, D.; ALONSO, P. L.; TAMBOURA, B.; SANOGO, D.; ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J. B.; OMORE, R.; OUNDO, J. O.; HOSSAIN, A.; DAS, S. K.; AHMED, S.; QURESHI, S.; QUADRI, F.; ADEGBOLA, R. A.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M. J.; AKINSOLA, A.; MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSA, T.; ACÁCIO, S.; BISWAS, K.; O'REILLY, C. E.; MINTZ, E. D.; BERKELEY, L. Y.; MUHSEN, K.; SOMMERFELT, H.; ROBINS-BROWNE, R. M.; LEVINE, M. M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, London, v. 382, n. 9888, p. 209-222, 2013. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60844-2.

LIU, L.; OZA, S.; HOGAN, D.; CHU, Y.; PERIN, J.; ZHU, J.; LAWN, J. E.; COUSENS, S.; MATHERS, C.; BLACK, R. E. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. **Lancet**, London, v. 338, n. 10063, p. 3027-3035, 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31593-8.

MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIR, K. A.; PETERSON, D. E.; KAZMIERCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. B.; DAVIS, J. P. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 331, n. 3, p. 161-167, 1994. DOI: 10.1056/NEJM199407213310304.

MCGHEE, J. R.; FUJIHASHI, K. Inside the mucosal immune system. **PloS Biology**, San Francisco, v. 10, n. 9, art. e1001397, p. 1-5, 2012. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001397.

NYDAM, D. V.; WADE, S. E.; SCHAAF, S. L.; MOHAMMED, H. O. Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp cysts shed by dairy calves after natural infection. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62, n. 10, p. 1612-1615, 2001. DOI: 10.2460/ajvr.2001.62.1612.

OLIVEIRA, B. C. M.; WIDMER, G. Probiotic product enhances susceptibility of mice to cryptosporidiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington-DC, v. 84, n. 21, art. e01408-18, p. 1-12, 2018. DOI: 10.1128/aem.01408-18.

RAHMAN, S. U.; ZHOU, K.; ZHOU, S.; SUN, T.; MI, R.; HUANG, Y.; HAN, X.; GONG, H.; CHEN, Z. Curcumin mitigates *Cryptosporidium parvum* infection through modulation of gut microbiota and innate immune-related genes in immunosuppressed neonatal mice. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 164, art. 105424, p. 1-12, 2022. DOI: 10.1016/j.micpath.2022.105424.

RAS, R.; HUYNH, K.; DESOKY, E.; BADAWY, A.; WIDMER, G. Perturbation of the intestinal microbiota of mice infected with *Cryptosporidium parvum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 45, n. 8, p. 567-573, 2015. DOI: 10.1016/j.ijpara.2015.03.005.

ROMANO, K. A.; MARTINEZ-DEL CAMPO, A.; KASAHARA, K.; CHITTIM, C. L.; VIVAS, E.I.; AMADOR-NOGUEZ, D.; BALSUS, E. P.; REY, F. E. Metabolic, epigenetic, and transgenerational effects of gut bacterial choline consumption. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 22, n. 3, art. 279-290.e7, p. 1-35, 2017. DOI: 10.1016/j.chom.2017.07.021.

RUSSELL, D. W. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 72, p. 137-174, 2003. DOI: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712.

SARDINHA-SILVA, A.; ALVES-FERREIRA, E. V. C.; GRIGG, M. E. Intestinal immune responses to commensal and pathogenic protozoa. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 16, n. 13, art. 963723, p. 1-17, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.963723.

SHIFFKA, S. J.; KANE, M. A.; SWAAN, P. W. Planar bile acids in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes**, Amsterdam, v. 1859, n. 11, p. 2269-2276, 2017. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.08.019.

THERIOT, C. M.; BOWMAN, A. A.; YOUNG, V. B. Antibiotic-induced alterations of the gut microbiota alter secondary bile acid production and allow for *Clostridium difficile* spore germination and outgrowth in the large intestine. **mSphere**, Washington-DC, v. 1, n. 1, art. e00045-15, p. 1-16, 2016. DOI: 10.1128/mSphere.00045-15.

TORRES-FUENTES, C.; SCHELLEKENS, H.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. The microbiota-gut-brain axis in obesity. **Lancet Gastroenterology and Hepatology**, Amsterdam, v. 2, n. 10, p. 747-756, 2017. DOI: 10.1016/S2468-1253(17)30147-4.

VANATHY, K.; PARIJA, S. C.; MANDAL, J.; HAMIDE, A.; KRISHNAMURTHY, S. *Cryptosporidiosis*: a mini review. **Tropical Parasitology**, Mumbai, v. 7, n. 2, p. 72-80, 2017. DOI: 10.4103/tp.TP_25_17.

VANDUSSEN, K. L.; FUNKHOUSER-JONES, L. J.; AKEY, M. E.; SCHAEFER, D. A.; ACKMAN, K.; RIGGS, M. W.; STAPPENBECK, T. S.; SIBLEY, L. D. Neonatal mouse gut metabolites influence *Cryptosporidium parvum* infection in intestinal epithelial cells. **mBio**, Washington-DC, v. 11, n. 6, art. e02582-20, p. 1-16, 2020. DOI: 10.1128/mBio.02582-20.

WAHLSTRÖM, A.; SAYIN, S. I.; MARSCHALL, H. U.; BÄCKHED, F. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 24, n. 1, p. 41-50, 2016. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.05.005.

WANG, R.; LI, J.; CHEN, Y.; ZHANG, L.; XIAO, L. Widespread occurrence of *Cryptosporidium* infections in patients with HIV/AIDS: epidemiology, clinical feature, diagnosis, and therapy. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 187, p. 257-263, 2018. DOI: 10.1016/j.actatropica.2018.08.018.

WIDERSTRÖM, M.; SCHÖNNING, C.; LILJA, M.; LEBBAD, M.; LJUNG, T.; ALLESTAM, G.; FERM, M.; BJÖRKHOLM, B.; HANSEN, A.; HILTULA, J.; LÅNGMARK, J.; LÖFDAHL, M.; OMBERG, M.; REUTERWALL, C.; SAMUELSSON, E.; WIDGREN, K.; WALLENSTEN, A.; LINDH, J. Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 20, n. 4, p. 581-589, 2014. DOI: 10.3201/eid2004.121415.

WIDMER, G.; KLEIN, P.; BONILLA, R. Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. **Parasitology**, London, v. 134, n. 11, p. 1583-1588, 2007. DOI: 10.1017/S0031182007002922.

ZAHEDI, A.; RYAN, U. *Cryptosporidium*: an update with an emphasis on foodborne and waterborne transmission. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 132, p. 500-512, 2020. DOI:10.1016/j.rvsc.2020.08.002.

ZHENG, X.; HUANG, F.; ZHAO, A.; LEI, S.; ZHANG, Y.; XIE, G.; CHEN, T.; QU, C.; RAJANI, C.; DONG, B.; LI, D.; JIA, W. Bile acid is a significant host factor shaping the gut microbiome of diet-induced obese mice. **BMC Biology**, London, v. 15, n. 1, art. 120, p. 1-15, 2017. DOI: 10.1186/s12915-017-0462-7.

ANEXO A - OFÍCIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Office of the Vice Provost for Research
Institutional Animal Care and Use Committee

June 12, 2023

Dr. Giovanni Widmer
Tufts University

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 the NIAID proposal "*Cryptosporidium mutagenesis*". The animal work described in the grant proposal is congruent with the IACUC protocol #G2021-115 entitled "*Genetics of Cryptosporidium species*" which was approved on October 1, 2021 and will expire on October 1, 2024.

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 **D16-00572 (A4059-01)**.

Best regards,

Sarah Cass

Sarah Cass
IACUC Analyst II
Tufts University
Sarah.cass@tufts.edu

ANEXO B - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA

09/02/2025, 22:02

Submission Guidelines | PLOS Pathogens

[About the Journal](#)
[Style and Format](#)
[Manuscript Organization](#)
[Parts of a Submission](#)
[Additional Information Requested at Submission](#)
[Other Article Types](#)
[You may be eligible for APC support](#)

Submission Guidelines

About the Journal

PLOS Pathogens publishes original research that clearly demonstrates novelty, importance to its particular field, biological significance, and conclusions that are justified by the study.

Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, and to offer the best possible support to our authors throughout this process. Authors are encouraged to decide how best to present their ideas, results, and conclusions. The writing style should be concise and accessible. Editors may make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument.

Related information for authors

- › [PLOS Writing Center](#)
- › [Submission system](#)
- › [Journal scope and publication criteria](#)
- › [Getting started guide](#)
- › [Guidelines for other article types](#)
- › [Guidelines for revisions](#)
- › [Publication fees](#)

Style and Format

- ❗ When you first submit to the journal, providing you include all the necessary information needed for editorial assessment and review, we will not ask you to make any formatting changes. During resubmission, we may ask you to meet formatting requirements.

09/02/2025, 22:02

Submission Guidelines | PLOS Pathogens

File format	Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected. LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. Read the LaTeX guidelines.
Length	Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information. We encourage you to present and discuss your findings concisely.
Font	Use a standard font size and any standard font, except for the font named "Symbol". To add symbols to the manuscript, use the Insert → Symbol function in your word processor or paste in the appropriate Unicode character.
Headings	Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.
Layout and spacing	Manuscript text should be double-spaced. Do not format text in multiple columns.
Page and line numbers	Include page numbers and line numbers in the manuscript file. Use continuous line numbers (do not restart the numbering on each page).
Tables	Insert tables immediately after the first paragraph in which they are cited.
Supporting Information	Upload Supporting Information (SI) files separately.
Footnotes	Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.
Language	Manuscripts must be submitted in English. You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.
Abbreviations	Define abbreviations upon first appearance in the text. Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text. Keep abbreviations to a minimum.
Reference style	PLOS uses "Vancouver" style, as outlined in the ICMJE sample references. See reference formatting examples and additional instructions below.
Equations	We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor or Microsoft's Insert→Equation function is acceptable. Avoid using MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function to insert single variables (e.g., "$a^2 + b^2 = c^2$"), Greek or other symbols (e.g., β, Δ, or '[prime]'), or mathematical operators (e.g., $\times$, $\geq$, or $\pm$) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values. Do not use MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Equations should not contain a mix of different equation tools. Avoid "hybrid" inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.
Nomenclature	Use correct and established nomenclature wherever possible. <i>Units of measurement</i> Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units. <i>Drugs</i> Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).

Species names	Write in italics (e.g., <i>Homo sapiens</i>). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., <i>H. sapiens</i>).
Genes, mutations, genotypes, and alleles	Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).
Allergens	The systematic allergen nomenclature of the World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee should be used for manuscripts that include the description or use of allergenic proteins. For manuscripts describing new allergens, the systematic name of the allergen should be approved by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee prior to manuscript publication. Examples of the systematic allergen nomenclature can be found at the WHO/IUIS Allergen Nomenclature site .

Copyediting manuscripts

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from in-depth professional copyediting are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service".

Note that if your manuscript is accepted, PLOS will not perform a detailed copyediting step. Therefore, please carefully review your manuscript, paying special attention to spelling, punctuation, and grammar, as well as scientific content.

Manuscript Organization

Most manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below.

- › Title
- › Authors
- › Affiliations
- › Abstract
- › Author Summary
- › Introduction
- › Results
- › Discussion
- › Materials and Methods
- › Acknowledgments
- › References
- › Supporting information captions

Uniformity in format facilitates the experience of readers and users of the journal. To provide flexibility, however, authors are also able to include the Materials and Methods section before the Results section or before the Discussion section. Please also note that the Results and Discussion can be combined into one Results/Discussion section.



Ready to format your provisionally accepted manuscript?

Refer to our downloadable sample files to ensure that your submission meets our formatting requirements:

- › [Download sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)
- › [Download sample manuscript body \(PDF\)](#)



Viewing Figures and Supporting Information in the compiled submission PDF

The compiled submission PDF includes low-resolution preview images of the figures after the reference list. The function of these previews is to allow you to download the entire submission as quickly as possible. Click the link at the top of each preview page to download a high-resolution version of each figure. Links to download Supporting Information files are also available after the reference list.

Parts of a Submission

Title

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	200 characters	Specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the field	Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: A <i>Caenorhabditis elegans</i> model Solar drinking water disinfection (SODIS) to reduce childhood diarrhoea in rural Bolivia: A cluster-randomized, controlled trial
Short title	70 characters	State the topic of the study	Cigarette smoke exposure and innate immunity SODIS and childhood diarrhoea

Titles should be written in sentence case (only the first word of the text, proper nouns, and genus names are capitalized). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

Author list

Authorship requirements

All authors must meet the criteria for authorship as outlined in the [authorship policy](#). Those who contributed to the work but do not meet the criteria for authorship can be mentioned in the Acknowledgments. [Read more about Acknowledgments](#).

The corresponding author must provide an ORCID iD at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system. [Read more about ORCID](#).

Author names and affiliations

Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system.

On the title page, write author names in the following order:

- First name (or initials, if used)
- Middle name (or initials, if used)
- Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. Authors have the option to include a current address in addition to the address of their affiliation at the time of the study. The current address should be listed in the byline and clearly labeled "current address." At a minimum, the address must include the author's current institution, city, and country.

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation. Author affiliations will be listed in the typeset PDF article in the same order that authors are listed in the submission.

-  Author names will be published exactly as they appear in the manuscript file. Please double-check the information carefully to make sure it is correct.

Corresponding author

The submitting author is automatically designated as the corresponding author in the submission system. The corresponding author is the primary contact for the journal office and the only author able to view or change the manuscript while it is under editorial consideration.

The corresponding author role may be transferred to another coauthor. However, note that transferring the corresponding author role also transfers access to the manuscript. (To designate a new corresponding author while the manuscript is still under consideration, watch the video tutorial below.)

Only one corresponding author can be designated in the submission system, but this does not restrict the number of corresponding authors that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon

publication. Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

Consortia and group authorship

If a manuscript is submitted on behalf of a consortium or group, include its name in the manuscript byline. Do not add it to the author list in the submission system. You may include the full list of members in the Acknowledgments or in a supporting information file.

PubMed only indexes individual consortium or group author members listed in the article byline. If included, these individuals must qualify for authorship according to our [criteria](#).

 [Read the group authorship policy.](#)

Author contributions

Provide at minimum one contribution for each author in the submission system. Use the CRediT taxonomy to describe each contribution. [Read the policy and the full list of roles.](#)

Contributions will be published with the final article, and they should accurately reflect contributions to the work. The submitting author is responsible for completing this information at submission, and we expect that all authors will have reviewed, discussed, and agreed to their individual contributions ahead of this time.

PLOS Pathogens will contact all authors by email at submission to ensure that they are aware of the submission.

Cover letter

Upload a cover letter as a separate file in the online system.

The cover letter should address the following questions:

- Why is this manuscript suitable for publication in *PLOS Pathogens*?
- Why will your study inspire other members of your field, and how will it drive research forward?

You may recommend a suitable Associate Editor to handle your submission; however, the editors reserve the right to contact an alternative—either from the board or a guest editor.

The cover letter will only be available to the editor and the journal staff.

Title page

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

 [Download our sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract should be succinct; it must not exceed 300 words. Authors should mention the techniques used without going into methodological detail and should summarize the most important results.

While the Abstract is conceptually divided into three sections (Background, Methodology/Principal Findings and Conclusions/Significance), do not apply these distinct headings to the Abstract within the article file.

Do not include any citations. Avoid specialist abbreviations.

Author Summary

We ask that all authors of research articles include a 150-200 word non-technical summary of the work as part of the manuscript to immediately follow the abstract. This text is subject to editorial change, should be written in the first-person voice, and should be distinct from the scientific abstract.

Aim to highlight where your work fits within a broader context; present the significance or possible implications of your work simply and objectively; and avoid the use of acronyms and complex terminology wherever possible. The goal is to make your findings accessible to a wide audience that includes both scientists and non-scientists.

Authors may benefit from consulting with a science writer or press officer to ensure they effectively communicate their findings to a general audience.

Example Author Summary

Mosquitoes Inoculate High Doses of West Nile Virus as They Probe and Feed on Live Hosts

Introduction

The introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the Introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about whether that aim was achieved.

Results

The Results section should provide details of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper. There is no specific word limit for this section, but details of experiments that are peripheral to the main thrust of the article and that detract from the focus of the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. The section should be written in the past tense.

PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception. When submitting a manuscript online, authors must provide a *Data Availability Statement* describing compliance with PLOS's policy.

Our preference is for large data sets, including raw data, to be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories.](#)

In some cases, authors may provide their data within [supporting information files](#) accompanying the manuscript. Authors should take care to maximize the accessibility and reusability of the data by selecting a file format from which data can be efficiently extracted (for example, spreadsheets or flat files should be provided rather than PDFs when providing tabulated data).

For more information on how best to provide data, read our [policy on data availability](#). PLOS does not accept references to "data not shown."

Discussion

The Discussion should spell out the major conclusions of the work along with some explanation or speculation on the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done?

The Discussion should be concise and tightly argued.

The Results and Discussion may be combined into one section, if desired.

Materials and Methods

The Materials and Methods should provide enough detail to reproduce the findings. Submit detailed protocols for newer or less established methods. Well-established protocols may be referenced.

Details of algorithms and protocol documents for clinical trials, observational studies, and other **non-laboratory** investigations may be uploaded as supporting information. These are not included in the typeset manuscript, but are downloadable and fully searchable from the HTML version of the article. [Read the supporting information guidelines](#) for formatting instructions.

We recommend and encourage you to deposit **laboratory protocols** in [protocols.io](#), where protocols can be assigned their own persistent digital object identifiers (DOIs).

To include a link to a protocol in your article:

1. Describe your step-by-step protocol on protocols.io
2. Select **Get DOI** to issue your protocol a persistent digital object identifier (DOI)
3. Include the DOI link in the Methods section of your manuscript using the following format provided by protocols.io:
[http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io/\[PROTOCOL DOI\]](http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io/[PROTOCOL DOI])

At this stage, your protocol is only visible to those with the link. This allows editors and reviewers to consult your protocol when evaluating the manuscript. You can make your protocols public at any time by selecting **Publish** on the protocols.io site. Any referenced protocol(s) will automatically be made public when your article is published.

PLOS ONE offers an option for publishing peer-reviewed Lab Protocol articles, which describe protocols hosted on protocols.io articles. Read more [information on Lab Protocol articles](#).

Consult our [reporting guidelines](#), and include an ethics statement in the Materials and Methods section when reporting results from [human subjects research](#) and [animal research](#).

Acknowledgments

Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.

Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

- ❗ PLOS journals publicly acknowledge the indispensable efforts of our editors and reviewers on an annual basis. To ensure equitable recognition and avoid any appearance of partiality, do not include editors or peer reviewers—named or unnamed—in the Acknowledgments.

Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the submission system.

References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

- › Published or accepted manuscripts
- › Manuscripts on preprint servers, providing the manuscript has a citable DOI or arXiv URL.

Do not cite the following sources in the reference list:

- › Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., "unpublished work," "data not shown"). Instead, include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
- › Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)
- › Submitted research should not rely upon retracted research. You should avoid citing retracted articles unless you need to discuss retracted work to provide historical context for your submitted research. If it is necessary to discuss retracted work, state the article's retracted status in your article's text and reference list.

Ensure that your reference list includes full and current bibliography details for every cited work at the time of your article's submission (and publication, if accepted). If cited work is corrected, retracted, or marked with an expression of concern before your article is published, and if you feel it is appropriate to cite the work even in light of the post-publication notice, include in your manuscript citations and full references for both the affected article and the post-publication notice. Email the journal office if you have questions.

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., "We used the techniques developed by our colleagues [19] to analyze the data"). PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order *before* ordering the citations.

Formatting references

- ❗ Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of references is crucial.

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the "Vancouver" style. Example formats are listed below. Additional examples are in the [ICMJE sample references](#).

A reference management tool, EndNote, offers a current [style file](#) that can assist you with the formatting of your references. If you have problems with any reference management program, please contact the source company's technical support.

Journal name abbreviations should be those found in the [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\) databases](#).

09/02/2025, 22:02

Submission Guidelines | PLOS Pathogens

Source	Format
Published articles	Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpl9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>Genet Mol Res</i>. 2011;10: 1576-1588. Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. <i>Mol Immunol</i>. 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005. Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers. When providing a DOI, adhere to the format in the example above with both the label and full DOI included at the end of the reference (doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005). Do not provide a shortened DOI or the URL.
Accepted, unpublished articles	Same as published articles, but substitute "Forthcoming" for page numbers or DOI.
Online articles	Huynen MMTE, Martens P, Hilderink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. <i>Global Health</i> . 2005;1: 14. Available from: http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14
Books	Bates B. Bargaining for life: A social history of tuberculosis. 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.
Book chapters	Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. <i>AIDS and the historian</i> . Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.
Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)	Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity. <i>arXiv</i>.1403.3301v1 [Preprint]. 2014 [cited 2014 March 17]. Available from: https://128.84.21.199/abs/1403.3301v1 Kording KP, Mensh B. Ten simple rules for structuring papers. <i>BioRxiv</i> [Preprint]. 2016 bioRxiv 088278 [posted 2016 Nov 28; revised 2016 Dec 14; revised 2016 Dec 15; cited 2017 Feb 9]: [12 p.]. Available from: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/088278v5 doi: 10.1101/088278
Published media (print or online newspapers and magazine articles)	Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. <i>The New York Times</i> . 2014 Jan 29 [Cited 2014 March 17]. Available from: http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html
New media (blogs, web sites, or other written works)	Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: <i>PLOS Blogs</i> [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available from: http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/ .
Masters' theses or doctoral dissertations	Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available from: http://eprints.shef.ac.uk/archive/00000001/show/22e09
Databases and repositories (Figshare, arXiv)	Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013 [cited 2013 Oct 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214
Multimedia (videos, movies, or TV shows)	Hitchcock A, producer and director. <i>Rear Window</i> [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.

Supporting information

Authors can submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting information will be subject to peer review. All file types can be submitted, but files must be smaller than 20 MB in size.

Authors may use almost any description as the item name for a supporting information file as long as it contains an "S" and number. For example, "S1 Appendix" and "S2 Appendix," "S1 Table" and "S2 Table," and so forth.

Supporting information files are published exactly as provided, and are not copyedited.

Supporting information captions

List supporting information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.

The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title as well. You may also include a legend in your caption, but it is not required.

Example caption

S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.

In-text citations

We recommend that you cite supporting information in the manuscript text, but this is not a requirement. If you cite supporting information in the text, citations do not need to be in numerical order.

 Read the [supporting information guidelines](#) for more details about submitting supporting information and multimedia files.

Figures and Tables**Figure files**

You can include figures in the main manuscript file at initial submission. If the manuscript reaches the revise stage, prepare and submit each figure as an individual file.

Cite figures in ascending numeric order at first appearance in the manuscript file.

 For detailed instructions, [read the guidelines for figures](#).

Figure Captions

Insert figure captions in manuscript text, immediately following the paragraph where the figure is first cited (read order). Don't include captions as part of the figure files themselves or submit them in a separate document.

At a minimum, include the following in your figure captions:

- A figure label with Arabic numerals, and "Figure" abbreviated to "Fig" (e.g. Fig 1, Fig 2, Fig 3, etc). Match the label of your figure with the name of the file uploaded at submission (e.g. a figure citation of "Fig 1" must refer to a figure file named "Fig1.tif").
- A concise, descriptive title

The caption may also include a legend as needed.

 For detailed instructions, [read the guidelines for figures](#).

Tables

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files.

Tables require a label (e.g., "Table 1") and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.

 [Read the guidelines for tables](#).

Data reporting

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article.

 [Read our policy on data availability](#).

Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (e.g., GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CC BY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

 [See our list of recommended repositories](#).

09/02/2025, 22:02

Submission Guidelines | PLOS Pathogens

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include [Dryad](#) and [FlowRepository](#). Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

- › Deposit data in the integrated repository of choice.
- › Once deposition is final and complete, the repository will provide you with a dataset DOI (provisional). Authors submitting to FlowRepository will also receive a private URL for reviewers to gain access to the data.
- › Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS submission form. Authors using FlowRepository will need to provide the URL passcode in the Attach Files section for reviewers.

If you have any questions, please [email us](#).

Accession numbers

All appropriate data sets, images, and information should be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories](#).

Accession numbers (and version numbers, if appropriate) should be provided in the Data Availability Statement. Accession numbers or a citation to the DOI should also be provided when the data set is mentioned within the manuscript.

In some cases authors may not be able to obtain accession numbers of DOIs until the manuscript is accepted; in these cases, the authors must provide these numbers at acceptance. In all other cases, these numbers must be provided at full submission.

Identifiers

As much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- › [Ensembl](#)
- › [Entrez Gene](#)
- › [FlyBase](#)
- › [InterPro](#)
- › [Mouse Genome Database \(MGD\)](#)
- › [Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM\)](#)
- › [PubChem](#)

Identifiers should be provided in parentheses after the entity on first use.

Small and macromolecule crystal data

Manuscripts reporting new and unpublished three-dimensional structures must include sufficient supporting data and detailed descriptions of the methodologies used to allow the reproduction and validation of the structures. All novel structures must have been deposited in a community endorsed database prior to submission (please see our list of [recommended repositories](#)).

Small molecule single crystal data

Authors reporting X-Ray crystallographic structures of small organic, metal-organic, and inorganic molecules must deposit their data with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), or similar community databases providing a recognized validation functionality. Authors are also required to include the relevant structure reference numbers within the main text (e.g. the CCDC ID number), as well as the crystallographic information files (.cif format) as Supplementary Information, along with the checkCIF validation reports that can be obtained via the International Union of Crystallography (IUCr).

Macromolecular structures

Authors reporting novel macromolecular structures must have deposited their data prior to submission with the Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB), the Electron Microscopy Data Bank (EMDB), or other community databases providing a recognized validation functionality. Authors must include the structure reference numbers within the main text and submit as Supplementary Information the official validation reports from these databases.

Striking image

You can upload a visually striking image alongside your submission, which we may use to showcase your article through PLOS' online channels. The Editors-in-Chief choose the monthly issue image from the striking images submitted with articles scheduled for publication.

Submission Criteria

- › Choose an image that represents the article in a striking and eye-catching way.

09/02/2025, 22:02

Submission Guidelines | PLOS Pathogens

- It can be derived from a figure or supporting information file from the paper, and it may be a cropped portion of an image or the entire image.
- Alternatively, you can create or source an image, as long as it adheres to our CC BY license.
- High resolution: between 300-600 dpi
- Single panel
- Ideally avoid added details like text, scale bars, and arrows.

How to Submit

1. Submit your striking image to the submission system using the file type "Striking Image".
2. Upload a separate file with corresponding caption.

If no striking image is uploaded, a member of the journal team will choose an appropriate image, which may be a figure from the submission or a separately sourced CC BY image.

i Striking images should not contain potentially identifying images of people. [Read our policy on identifying information.](#)

[The PLOS licenses and copyright policy](#) also applies to striking images.

Additional Information Requested at Submission

Financial Disclosure Statement

This information should describe sources of funding that have supported the work. If your manuscript is published, your statement will appear in the Funding section of the article.

Include your statement in the Financial Disclosure section of the initial submission form.

The statement should include:

- Specific grant numbers
- Initials of authors who received each award
- URLs to sponsors' websites

Also state whether any sponsors or funders (other than the named authors) played any role in:

- Study design
- Data collection and analysis
- Decision to publish
- Preparation of the manuscript

If they had no role in the research, include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript."

If the study was unfunded, include this sentence as the Financial Disclosure statement: "The author(s) received no specific funding for this work."

i [Read our policy on disclosure of funding sources.](#)

Competing interests

The corresponding author is asked at submission to declare, on behalf of all authors, whether there are any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced the work.

Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles.

i [Read our policy on competing interests.](#)

Related manuscripts

When submitting a manuscript, all authors are asked to indicate that they do not have a related or duplicate manuscript under consideration (or accepted) for publication elsewhere. If related work has been or will be submitted elsewhere or is in press elsewhere, then a copy must be uploaded with the article submitted to PLOS. Reviewers will be asked to comment on the overlap between related submissions.

i [Read our policies on related manuscripts.](#)

09/02/2025, 22:02

Submission Guidelines | PLOS Pathogens

Preprints

PLOS encourages authors to post preprints to accelerate the dissemination of research and support authors who wish to share their work early and receive feedback before formal peer review. Deposition of manuscripts with preprint servers does not impact consideration of the manuscript at any PLOS journal.

Authors posting on bioRxiv may submit directly to PLOS journals through bioRxiv's [direct transfer to journal service](#).

Authors submitting manuscripts in the life science to *PLOS Pathogens* may opt-in to post their work on bioRxiv during the *PLOS Pathogens* initial submission process.

 [Read more about preprints.](#)

[Learn how to post a preprint to bioRxiv during PLOS Pathogens initial submission.](#)

Reviewer and editor suggestions

We ask authors to suggest suitable editors and at least four potential reviewers when submitting their manuscript. Bear in mind any potential competing interests when making these suggestions. It is not appropriate to suggest recent collaborators or other researchers at your institution. See our [policy on competing interests](#) for more information.

Opposed reviewers

Authors may choose to request that an individual is excluded from the review process and not involved in their manuscript. When making these suggestions, please provide specific reasons why each person should not review your submission in each "Reason" box. The editorial team will respect these requests so long as this does not interfere with the objective and thorough assessment of the submission.

Other Article Types

If you are submitting content other than a research article, [read the guidelines for other article types](#).

You may be eligible for APC support

Many institutional partners globally have publishing agreements with PLOS to allow their corresponding authors to publish with reduced or no APCs. To determine if your corresponding author is eligible, please [visit our institutional partners page](#) to determine what kind of agreement your institution has with PLOS.

If your corresponding author is affiliated with a participating institution, they must follow the instructions below to demonstrate eligibility.

 Read the full instructions for [submitting to a journal with the Flat Fee Agreement](#).

If your corresponding author is not from a participating institution and requires assistance paying publishing fees, please consider [applying for a fee waiver](#) at submission.