

EMBARGO

Por solicitação do Autor, o texto completo dessa
dissertação está embargado por

24 meses, com início após a data da defesa
(20/05/2025)

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Medicina Veterinária - Campus de Araçatuba

BRAYAN KURAHARA

**MONTAGEM, ANOTAÇÃO E COMPARAÇÃO DO GENOMA PARCIAL DE UM
ISOLADO BRASILEIRO DE *CRYPTOSPORIDIUM SERPENTIS***

Araçatuba
2025

BRAYAN KURAHARA

**MONTAGEM, ANOTAÇÃO E COMPARAÇÃO DO GENOMA PARCIAL DE UM
ISOLADO BRASILEIRO DE *CRYPTOSPORIDIUM SERPENTIS***

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos
Meireles

Araçatuba
2025

K96m

Kurahara, Brayan

Montagem, anotação e comparação do genoma parcial de um
isolado brasileiro de *Cryptosporidium serpentis* / Brayan Kurahara. --
Araçatuba, 2025

40 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientador: Marcelo Vasconcelos Meireles

1. Sequenciamento. 2. Genoma. 3. Criptosporidiose. 4. Répteis. I.
Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE BRAYAN KURAHARA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.

Aos 20 dias do mês de maio do ano de 2025, às 14h, no(a) Sala de videoconferência da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de BRAYAN KURAHARA, intitulada **Montagem, anotação e comparação do genoma parcial de um isolado brasileiro de *Cryptosporidium serpentis***. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Associado MARCELO VASCONCELOS MEIRELES (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Presencial) do(a) Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Prof. Dr. WESLEN FABRICIO PIRES TEIXEIRA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Parasitologia / Instituto de Ciências Biológicas/UFMG. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Associado MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Dedico este trabalho à minha esposa,
pelo apoio incondicional, e à minha mãe,
cuja força e amor me trouxeram até aqui.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo constante apoio e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Marcelo Vasconcelos Meireles, pela confiança e investimento no meu crescimento profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Flávia Lombardi Lopes, por me guiar nos primeiros passos no universo da bioinformática.

À Life Technologies, pelo sequenciamento das amostras, e ao Philipp Ricardo Scaciotte de Oliveira Paiva, pela disponibilização dos oocistos de *C. serpentis*.

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

修行は終わりのなき道なり。

"O treinamento é um caminho sem fim."

– Miyamoto Musashi

RESUMO

A infecção por *Cryptosporidium serpentis* em répteis causa gastrite hipertrófica crônica, regurgitação e mortalidade. Este estudo tem como objetivo a montagem, anotação e comparação do genoma parcial de um isolado brasileiro de *C. serpentis*, obtido do sequenciamento do DNA proveniente de oocistos de cobras-do-milho (*Pantherophis guttatus*) naturalmente infectadas. O sequenciamento foi feito na plataforma Ion Torrent. A pré-montagem de novo foi realizada com o uso do SPAdes, seguida de montagem híbrida com o RagTag, usando como referência o genoma de *Cryptosporidium muris*. A qualidade da montagem foi avaliada pelo QUAST, e a anotação de genes foi realizada pelo AUGUSTUS, após comparação com os genomas de *Plasmodium falciparum* e *Cryptosporidium hominis*. A montagem gerou 84 *scaffolds* guiados por referência, com ~9,46 Mb, N50 de 738.026 pb, L50 de 5 *scaffolds* e GC de 28,11%, métricas que são compatíveis com *Cryptosporidium* spp. A validação foi realizada por comparação das sequências genéticas de *C. serpentis* deste estudo com as sequências de publicadas de *Cryptosporidium* spp. Os resultados foram sólidos e compatíveis com o genoma de *C. serpentis*.

Palavras-chave: sequenciamento; genoma; Criptosporidiose; répteis.

ABSTRACT

Infection by *Cryptosporidium serpentis* in reptiles causes chronic hypertrophic gastritis, regurgitation, and mortality. This study aims to perform the assembly, annotation, and comparison of a partial genome of a Brazilian *C. serpentis* isolate, obtained from the sequencing of DNA extracted from oocysts isolated from corn snakes (*Pantherophis guttatus*). Sequencing was conducted on the Ion Torrent platform. De novo pre-assembly was performed using SPAdes, followed by hybrid assembly with RagTag, using the *Cryptosporidium muris* genome as a reference. Assembly quality was assessed with QUAST, and gene annotation was performed using AUGUSTUS, comparing with the genomes of *Plasmodium falciparum* and *Cryptosporidium hominis*. The assembly generated 84 reference-guided scaffolds, with ~9.46 Mb, N50 of 738,026 bp, L50 of 5 scaffolds, and GC content of 28.11%. The obtained metrics are consistent with those available for *Cryptosporidium* spp. Genome validation was conducted by comparing the gene sequences of *C. serpentis* from this study with the published sequences of *Cryptosporidium* spp. The results were consistent and compatible with the genome of *C. serpentis*.

Keywords: sequencing; genome; Cryptosporidiosis; reptiles.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A criptosporidiose é uma doença causada por *Cryptosporidium* spp., que infecta a superfície de células epiteliais dos tratos gastrointestinal e urinário de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (Ryan, 2010; Ryan; Fayer; Xiao, 2014; Santín, 2013).

O primeiro relato da infecção por *Cryptosporidium* em répteis foi feito em 1977 por Brownstein, em 14 serpentes de quatro espécies (*Elaphe guttata*, *Elaphe subocularis*, *Crotalus horridus* e *Sanzinia madagascariensis*) que apresentavam gastrite hipertrófica. Em 1980, Levine nomeou o parasito como *Cryptosporidium serpentis*, com base no hospedeiro e nos relatos de Brownstein *et al.* (1977). Nos répteis, a criptosporidiose possui caráter crônico; em serpentes, pode ser letal, ao contrário da criptosporidiose de aves e mamíferos que, na ausência de imunossupressão, é autolimitante (Fayer; Morgan; Upton, 2000).

Os sinais clínicos da doença consistem em infecção gástrica crônica subclínica ou gastrite hipertrófica clínica, com perda de peso progressiva, regurgitação após a alimentação, letargia, aumento de volume em região mediana do corpo e mortalidade (Brownstein *et al.*, 1977; Godshalk *et al.*, 1986; Carmel; Groves, 1993; O'Donoghue, 1995; Ramirez; Ward; Sreevatsan, 2004; Xiao *et al.*, 2004).

Cryptosporidium serpentis é transmitido via fecal-oral. Devido ao curso crônico da infecção, os oocistos são eliminados de forma intermitente pelas fezes (Graczyk; Cranfield, 1998). A parede do oocisto é formada por uma estrutura complexa, o que confere a essa estrutura alta resistência em condições ambientais (Harris; Petry, 1999). Em criadouros comerciais e conservacionistas de serpentes, o controle da criptosporidiose é essencial, por sua característica crônica e debilitante e pela indisponibilidade de um tratamento efetivo dessa enfermidade (Kimbell *et al.*, 1999); ainda que, exista um relato de tratamento com o uso de paromomicina, em fases iniciais da criptosporidiose em serpentes (Rivas *et al.*, 2018).

1.1 TAXONOMIA

O gênero *Cryptosporidium*, até recentemente, estava classificado como pertencente à classe *Coccidiomorphea*; no entanto, esse gênero apresenta diferenças em seu ciclo biológico, quando comparado a outros integrantes da classe

Coccidiomorphea, como a localização epicelular, a formação de vacúolo parasitóforo na superfície da célula, e ausência de esporocistos (Barta; Thompson, 2006; Ryan; Hijjawi, 2015; Valigurová *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2002).

Atualmente, o gênero *Cryptosporidium* é classificado como um gregarino, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Gregarinomorphea e subclasse Cryptogregaria (Ryan *et al.*, 2016). Há quatro espécies reconhecidas de *Cryptosporidium* em répteis. *Cryptosporidium serpentis* e *Cryptosporidium testudines* são parasitos gástricos e *Cryptosporidium varanii* (*Cryptosporidium saurophilum*) e *Cryptosporidium ducismarci* são espécies intestinais (Bogan, 2019; Bones *et al.*, 2019; Šlapeta, 2018).

1.2 CICLO DE VIDA

O ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. pode ser dividido em duas fases: a fase assexuada inicial, seguida por uma fase sexuada (Figura 1). A transmissão, em mamíferos e répteis, ocorre de forma direta, por via fecal-oral, ou indireta, por ambientes contaminados com fezes ou conteúdo gástrico regurgitado (Bogan, 2019).

O ciclo inicia-se quando um oocisto infectante de *Cryptosporidium* spp. é ingerido pelo hospedeiro. Após a ingestão, ocorre a excistação, com liberação de quatro esporozoítos. Os esporozoítos aderem na superfície da célula (localização epicelular) e são envolvidos pelas microvilosidades, quando há formação de um vacúolo parasitóforo. Posteriormente, se diferenciam em trofozoíto, que inicia a primeira divisão mitótica (merogonia), tornando-se um meronte, com a formação e liberação de oito merozoítos de primeira geração, morfologicamente semelhantes aos esporozoítos. Os merozoítos de primeira geração podem realizar outra merogonia, liberando oito merozoítos de segunda geração, ou formar novos merozoítos de primeira geração (Pumipuntu; Piratae, 2018; Thompson *et al.*, 2005).

O início da fase sexuada ocorre quando os merozoítos de segunda geração, após parasitarem uma nova célula, se tornam microgamontes que, após divisão celular, originam 16 gametas masculinos (microgametas); alternativamente, os merozoítos de 2ª geração originam os macrogamontes que, após maturação, originam o gameta feminino (macrogameta). Os microgametas são liberados na luz intestinal e fertilizam os macrogametas, originando o zigoto (Bogan, 2019).

O zigoto maduro origina um oocisto diploide, no qual ocorrerá o processo

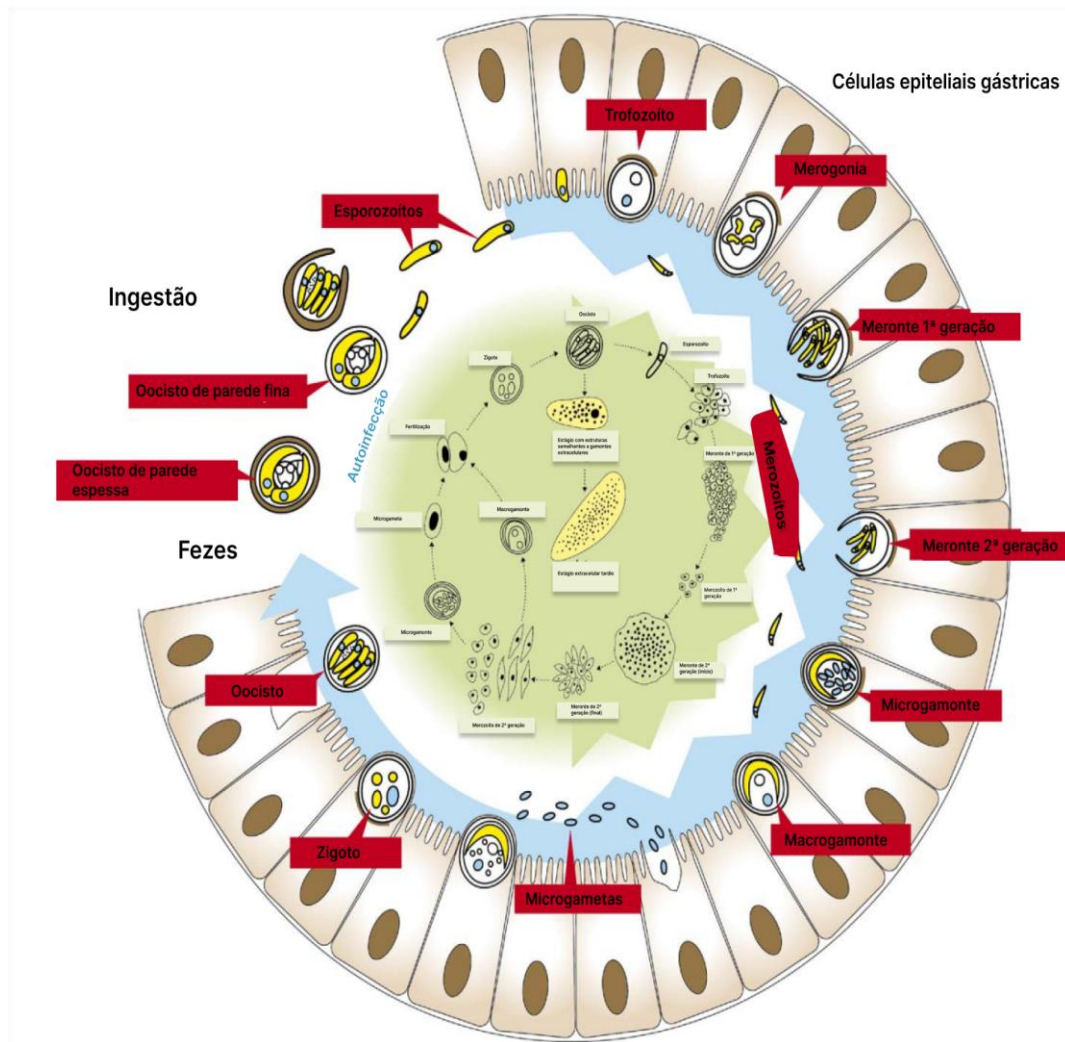
de esporulação (esporogonia), que consiste em uma divisão meiótica e duas divisões mitóticas, com formação de 4 esporozoítos haploides. Há dois tipos de oocistos: oocistos de parede fina, que possuem uma parede de apenas uma camada, e oocistos de parede espessa, com duas camadas. Os oocistos de parede fina existem ainda dentro do hospedeiros e promovem reinfecção, enquanto os oocistos de parede grossa são eliminados no ambiente (Thompson *et al.*, 2005). Em infecções por *C. serpentis*, todas as fases do ciclo ocorrem na superfície das células epiteliais gástricas (Cranfield; Graczyk, 2006).

1.3 GENÔMICA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.

O crescente número de dados genômicos disponíveis em bancos de dados sobre *Cryptosporidium* spp. tem contribuído para os estudos de diversidade genética e evolutiva de *Cryptosporidium* spp. Os genes que são frequentemente utilizados para a análise molecular de *Cryptosporidium* spp. são o gene 18S rRNA, actina, HSP70 e GP60 (Morgan *et al.*, 1998; 2000; Xiao *et al.*, 1999).

Os primeiros genomas do gênero *Cryptosporidium* sequenciados foram os de *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum* (Abrahamsen *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004). Desde então, o genoma de 17 espécies de *Cryptosporidium* já foram sequenciados e estão disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e no banco de dados CryptoDB (Warrenfeltz; Kissinger; Eupathdb, 2020). No entanto, não há dados genômicos disponíveis da maioria das espécies, incluindo *C. serpentis* (Agyabeng-Dadzie; Xiao; Kissinger, 2024).

Figura 1 - Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp.



Fonte: Adaptado de Barta e Thompson, 2006.

Pesquisas que visam a análise de diversidade genética de microrganismos patogênicos, por comparação da sequência de *loci* gênicos ou por comparação entre genomas completos, podem fornecer informações relevantes sobre as características biológicas, resistências medicamentosas, criação de vacinas, ou mesmo sobre novas espécies, genótipos ou unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Da mesma forma, a disponibilização de sequências completas do genoma permite a definição de novos *primers* que podem ser usados para uso em diagnóstico por PCR e por tecnologias mais recentes, como o sequenciamento de nova geração (Blake; Worthing; Jenkins, 2020; Boulton *et al.*, 2018).

Apesar da importância de *C. serpentis* em répteis, não há disponibilidade de dados relacionados ao sequenciamento do genoma completo dessa espécie.

1.4 OBJETIVO

Este estudo tem como objetivos a obtenção da sequência do genoma completo de um isolado brasileiro de *C. serpentis* e realizar a montagem e anotação parcial do genoma, além de comparar os dados obtidos com os dados disponíveis de outras espécies de *Cryptosporidium*.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABRAHAMSEN, M. S.; TEMPLETON, T. J.; ENOMOTO, S.; ABRAHANTE, J. E.; ZHU, G.; LANCTO, C. A.; DENG, M.; LIU, C.; WIDMER, G.; TZIPORI, S.; BUCK, G. A.; XU, P.; BANKIER, A. T.; DEAR, P. H.; KONFORTOV, B. A.; SPRIGGS, H. F.; IYER, L.; ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L.; KAPUR, V. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, Washington-DC, v. 304, n. 5669, p. 441-445, 2004. DOI: 10.1126/science.1094786.
- AGYABENG-DADZIE, F.; XIAO, R.; KISSINGER, J. C. *Cryptosporidium* genomics - current understanding, advances, and applications. **Current Tropical Medicine Reports**, Cham, v. 11, n. 2, p. 92-103, 2024. DOI: 10.1007/s40475-024-00318-y.
- BARTA, J. R.; THOMPSON, R. C. A. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in Parasitology**, Amsterdam, v. 22, n. 10, p. 463-468, 2006. DOI: 10.1016/j.pt.2006.08.001.
- BLAKE, D. P.; WORTHING, K.; JENKINS, M. C. Exploring *Eimeria* genomes to understand population biology: recent progress and future opportunities. **Genes**, Basel, v. 11, n. 9, art. 1103, p. 1-14, 2020. DOI: 10.3390/genes11091103.
- BOGAN, J. E. Gastric cryptosporidiosis in snakes, a review. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, Lawrence, v. 29, n. 3-4, p. 71-86, 2019. DOI: 10.5818/19-05-201.1.
- BONES, A. J.; JOSSÉ, L.; MORE, C.; MILLER, C. N.; MICHAELIS, M.; TSAOUSIS, A. D. Past and future trends of *Cryptosporidium* in vitro research. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 196, p. 28-37, 2019. DOI: 10.1016/j.exppara.2018.12.001.
- BOULTON, K.; NOLAN, M. J.; WU, Z.; RIGGIO, V.; MATIKA, O.; HARMAN, K.; HOCKING, P. M.; BUMSTEAD, N.; HESKETH, P.; ARCHER, A.; BISHOP, S. C.; KAISER, P.; TOMLEY, F. M.; HUME, D. A.; SMITH, A. L.; BLAKE, D. P.; PSIFIDI, A. Dissecting the genomic architecture of resistance to *Eimeria maxima* parasitism in the chicken. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 9, art. 528, p. 1-13, 2018. DOI: 10.3389/fgene.2018.00528.
- BROWNSTEIN, D. G.; STRANDBERG, J. D.; MONTALI, R. J.; BUSH, M.; FORTNER, J. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 14, n. 6, p. 606-617, 1977. DOI: 10.1177/030098587701400607.
- CARMEL, B. P.; GROVES, V. Chronic cryptosporidiosis in Australian elapid snakes: control of an outbreak in a captive colony. **Australian Veterinary Journal**, Oxford, v. 70, n. 8, p. 293-295, 1993. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1993.tb07977.x.
- CRANFIELD, M. R.; GRACZYK, T. K. Cryptosporidiosis. In: MADER, D. R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery**. 2. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 756-762.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000. DOI: 10.1016/s0020-7519(00)00135-1.

GODSHALK, C. P.; MACCOY, D. M.; PATTERSON, J. S.; MCKIERNAN, B. C. Gastric hypertrophy associated with cryptosporidiosis in a snake. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 189, n. 9, p. 1126-1128, 1986.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; MANN, J.; STRANDBERG, J. D. Intestinal *Cryptosporidium* sp. infection in the Egyptian tortoise, *Testudo kleinmanni*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1885-1888, 1998. DOI: 10.1016/s0020-7519(98)00143-x.

HARRIS, J. R.; PETRY, F. *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 85, n. 5, p. 839-849, 1999. DOI: 10.2307/3285820.

KIMBELL, L. M.; MILLER, D. L.; CHAVEZ, W.; ALTMAN, N. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium serpentis* in a wild-caught corn snake (*Elaphe guttata guttata*) and a five-species restriction fragment length polymorphism-based assay that can additionally discern *C. parvum* from *C. wrairi*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington-DC, v. 65, n. 12, p. 5345-5349, 1999. DOI: 10.1128/AEM.65.12.5345-5349.1999.

MORGAN, U. M.; SARGENT, K.; DEPLAZES, P.; FORBES, D. A.; SPANO, F.; HERTZBERG, H.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. **Parasitology**, Cambridge, v. 117, n. 1, p. 31-37, 1998. DOI: 10.1017/S0031182098002765.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; MONIS, P.; SULAIMAN, I.; PAVLASEK, I.; BLAGBURN, B.; OLSON, M.; UPTON, S. J.; KHRAMTSOV, N. V.; LAL, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. A. Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. **Parasitology**, Cambridge, v. 120, n. 5, p. 457-464, 2000. DOI: 10.1017/S0031182099005703.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995. DOI: 10.1016/0020-7519(94)e0059-v.

PUMIPUNTU, N.; PIRATAE, S. Cryptosporidiosis: a zoonotic disease concern. **Veterinary World**, Rajkot, v. 11, n. 5, p. 681-686, 2018. DOI: 10.14202/vetworld.2018.681-686.

RAMIREZ, N. E.; WARD, L. A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes and Infection**, Paris, v. 6, n. 8, p. 773-785, 2004. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.02.021.

RIVAS, A. E.; BOYER, D. M.; TORREGROSA, K.; ORRICO, W. J.; PARÉ, J. A. Treatment of *Cryptosporidium serpentis* infection in a king cobra (*Ophiophagus hannah*) with paromomycin. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 49, n. 4, p. 1061-1063, 2018. DOI: 10.1638/2018-0080.1.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 124, n. 1, p. 113-120, 2010. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.02.002.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, Cambridge, v. 141, n. 13, p. 1667-1685, 2014. DOI: 10.1017/S0031182014001085.

RYAN, U.; HIJJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 367-373, 2015. DOI: 10.1016/j.ijpara.2015.01.009.

RYAN, U.; PAPARINI, A.; MONIS, P.; HIJJAWI, N. It's oficial: *Cryptosporidium* is a gregarine: what are the implications for the water industry? **Water Research**, Oxford, v. 105, p. 305-313, 2016. DOI: 10.1016/j.watres.2016.09.013.

SANTÍN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. **New Zealand Veterinary Journal**, Abingdon, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2013. DOI: 10.1080/00480169.2012.731681.

ŠLAPETA, J. DNA barcoding of *Cryptosporidium*. **Parasitology**, London, v. 145, n. 5, p. 574-584, 2018. DOI: 10.1017/S0031182017001809.

THOMPSON, R. C.; OLSON, M. E.; ZHU, G.; ENOMOTO, S.; ABRAHAMSEN, M. S.; HIJJAWI, N. S. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. **Advances in Parasitology**, London, v. 59, p. 77-158, 2005. DOI: 10.1016/S0065-308X(05)59002-X.

VALIGUROVÁ, A.; PASKEROVA, G. G.; DIAKIN, A.; KOVÁČIKOVÁ, M.; SIMDYANOV, T. G. Protococcidian *Eleutheroschizon duboscqi*, an unusual apicomplexan interconnecting gregarines and *Cryptosporidia*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 4, e0125063, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0125063.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A. A.; MONTALI, R. J.; FAYER, R.; LAL, A. A. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington-DC, v. 65, n. 4, p. 1578-1583, 1999. DOI: 10.1128/AEM.65.4.1578-1583.1999.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington-DC, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004. DOI: 10.1128/CMR.17.1.72-97.2004.

XIAO, L.; SULAIMAN, I.M.; RYAN, U.M.; ZHOU, L.; ATWILL, E.R.; TISCHLER, M.L.; ZHANG, X.; FAYER, R.; LAL, A.A. Host adaptation and host–parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1773-1785, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00197-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00197-2).

XU, P.; WIDMER, G.; WANG, Y.; OZAKI, L. S.; ALVES, J. M.; SERRANO, M. G.; PUIU, D.; MANQUE, P.; AKIYOSHI, D.; MACKEY, A. J.; PEARSON, W. R.; DEAR, P. H.; BANKIER, A. T.; PETERSON, D. L.; ABRAHAMSEN, M. S.; KAPUR, V.; TZIPORI, S.; BUCK, G. A. The genome of *Cryptosporidium hominis*. **Nature**, London, v. 431, n. 7012, p. 1107-1112, 2004. DOI: 10.1038/nature02977.

WARRENFELTZ, S.; KISSINGER, J. C.; EUPATHDB TEAM. Accessing *Cryptosporidium* omic and isolate data via CryptoDB.org. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 2052, p. 139-192, 2020. DOI: 10.1007/978-1-4939-9748-0_10.