

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

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

Lucas Vinicius Shigaki de Matos

Médico Veterinário

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

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

Lucas Vinicius Shigaki de Matos

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

Coorientador: Prof. Dr. Giovanni Widmer

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

2018

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

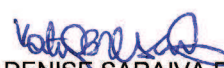
TÍTULO DA TESE: O TRANSCRIPTOMA DOS ESPOROZOÍTOS DE *Cryptosporidium parvum* E ESTÁGIOS INTRACELULARES

AUTOR: LUCAS VINICIUS SHIGAKI DE MATOS

ORIENTADORA: KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

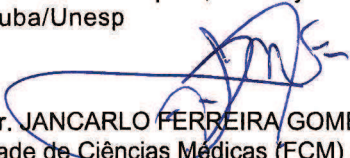
COORDINADOR: GIOVANNI WIDMER

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



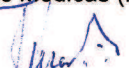
Prof. Adjunto KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



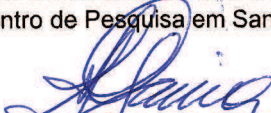
Prof. Dr. JANCARLO FERREIRA GOMES

Faculdade de Ciências Médicas (FCM) / Campinas/SP



Prof. Dr. GILSON PEREIRA DE OLIVEIRA

Centro de Pesquisa em Sanidade Animal - CPPAR / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. JOÃO LUIS GARCIA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva-UEL / Londrina/PR



Prof. Dr. GILSON HELIO TONIOLLO

Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 02 de outubro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

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

Dedico e Ofereço

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

durante minha vida acadêmica.

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

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

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

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

Ao Bruno por me auxiliar nas análises de bioinformática.

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

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

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

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

CERTIFICADO DO COMITÉ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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

April 13, 2016

Dr. Giovanni Widmer
Tufts University
Cummings School of Veterinary Medicine

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

Dear Dr. Widmer,

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

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

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

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

Best regards,



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

LISTA DE ABREVIATURAS

2E5: anticorpo específico para esporozoítos

5F10: anticorpo específico para oocistos

SFB : soro fetal bovino

FDA: Food and Drug Administration

FPKM: Fragments Per Kilobase Million

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

GO: Gene Ontology

HCT-8: Human ileocecal adenocarcinoma

LDA: Linear discriminant analysis

MDBK: Madin-Darby Bovine Kidney

mL - Mililitro

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

PBS: Phosphate buffered saline

RDA: Redundancy analysis

RQN: RNA Quality Number

LISTA DE TABELAS**Páginas**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Análise RNA-seq

A análise comparativa de RNA-Seq pode ser explorada para descobrir moléculas e pontos críticos no desenvolvimento do parasito entérico. Recentemente, foram usadas essas abordagens para destacar perfis de expressão no desenvolvimento de *Toxoplasma gondii* no intestino delgado do gato (WALKER et al., 2015) e de *Eimeria tenella* no ceco de galinhas (WALKER et al., 2015). Estratégias tem sido utilizadas para comparar estádios de *C. parvum* desenvolvidos a partir epitélio do intestino delgado de bezerros infectados experimentalmente e propagados *in vitro*. Estes últimos, proliferam eficientemente merozoítos, mas aparentemente não tem a capacidade de diferenciar-se em oocistos na cultura celular, e tem a interrupção do ciclo, sendo uma das dificuldades na execução de estudos *in vitro* para o protozoário *Cryptosporidium spp.* Assim, tem sido usada a análise comparativa da expressão gênica como meio de identificar fatores que possam ser relevantes para o desenvolvimento sexual e formação de oocistos (LIPPUNER et al., 2018).

O RNA-seq fornece uma maneira revolucionária de desvendar a transcrição usando tecnologias de sequenciamento de alto rendimento para gerar centenas de milhões de leituras curtas de moléculas de RNA (WANG et al., 2009, BYRON et al., 2016, CONESA et al., 2016). Como dados brutos de RNA-seq, as leituras curtas geralmente exigem centenas de Gigabytes de armazenamento. Quando são posteriormente montadas ou alinhadas a partir de um genoma de referência (genoma humano) para produzir um transcriptoma usando ferramentas de montagem ou alinhamento como Hisat2, Bowtie, SOAPdenovo-Trans, SOAP3 ou HTSeq (LUO et al., 2013; XIE et al., 2014). Como um mapa de transcrição ao nível do genoma, o transcriptoma consiste nos níveis de expressão de todos os genes transcritos e a expressão de cada gene é representada como o número de leituras curtas mapeadas no gene no alinhamento ou montagem (MARIONI et al., 2008). De

fato, o gene da terminologia se refere a características biológicas mais gerais na transcrição, como um gene, exon ou transcrito (ANDERS e HUBER, 2010; ROBINSON e OSHLACK, 2010; HAN, 2017).

2.2. Expressão Gênica

A molécula de RNA que serve de molde para a tradução é chamada de RNA mensageiro (mRNA) e a tradução é a produção de proteínas por meio do código presente nas moléculas de mRNAs. A expressão de um gene é justamente a formação de transcritos a partir de um determinado gene, podendo seu nível ser influenciado por algum fator, como por exemplo, o ambiente, que pode alterar o metabolismo de um indivíduo, e esse influenciar, inibindo ou estimulando, o nível de expressão de alguns genes relacionados a tal mudança (ZAHA et al, 2003; SOUZA, 2015).

No sentido de compreender a biologia do oocisto de coccídeo, avanços significativos tem sido realizados, incluindo o sequenciamento dos genomas de *C. parvum* (ABRAHAMSEN et al., 2004), *Cryptosporidium hominis* (XU et al., 2004), *Cryptosporidium muris* (CryptoDB, 2011), e *T. gondii* (KHAN et al., 2005). Essas bases de dados genômicas tem sido fundamentais na identificação de possíveis alvos de drogas contra esses patógenos e no aumento do conhecimento da relação parasito-hospedeiro (SEE et al., 2012). Essas interações entre protozoários e células hospedeiras envolvem trocas de moléculas distintas de ambos os lados (SIBLEY, 2004).

Várias proteínas de *C. parvum* são importantes para a sua relação nas células epiteliais do hospedeiro e estão envolvidas no desenvolvimento intracelular do parasito (SIBLEY, 2004; O'CONNOR et al., 2007).

Vale mencionar o conhecimento de que vários transcritos de RNA de *C. parvum* com baixo potencial de codificação de proteínas são seletivamente distribuídos em células epiteliais do intestino delgado durante as interações parasito-hospedeiro e podem modular a transcrição gênica em células hospedeiras infectadas (WANG et al., 2016; MING et al., 2018).

A biologia molecular desses estádios de vida sexual e assexuada é pouco compreendida, porque cada estágio existe apenas como uma fração da infecção total por *Cryptosporidium* spp., e estas são diminuídas em tamanho pela célula hospedeira. Para facilitar o estudo dos estádios do ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. que ocorrem após a infecção da célula hospedeira, um protocolo de enriquecimento foi desenvolvido para isolar os estádios pós-infecção das células hospedeiras infectadas. O enriquecimento é ainda mais complicado pela localização celular de parasitos *C. parvum* quase intracelular, intermembrana na célula hospedeira, o que sugere que esses parasitos, a menos que sejam liberados como merozoítos, podem sedimentar com as frações da membrana celular (KISSINGER et al., 2018).

A tecnologia RNA-Seq oferece a vantagem de estudar concomitantemente o transcriptoma de maneira quantitativa (expressão gênica) e qualitativamente (estrutura gênica). Esta tecnologia revolucionária tem proporcionado uma visão sem precedentes sobre a complexidade dos transcriptomas de eucariontes descobrindo uma variedade de novos RNAs não-codificadores com funções reguladoras. Qualquer experiência de RNA-Seq inicia-se com uma população de moléculas de RNA de uma célula ou tecido, que são fragmentadas e convertidas em DNA de cadeia dupla por uma enzima de transcriptase reversa. Bilhões de sequências de leitura curta são geradas a partir de um único processo realizado pela máquina de sequenciamento de alto rendimento (os sequenciadores de escala de produção mais amplamente usados são a série HiSeq da Illumina) (ESTEVE-CODINA, 2018).

A partir de um genoma de referência, algoritmos de mapeamento são alinhados as leituras do sequenciamento. Finalmente, uma ferramenta de quantificação conta o número de leituras mapeadas para cada gene. Embora, o processamento de dados é altamente automatizado por meio de técnicas de bioinformática padronizadas, uma certa variabilidade é observada, pois, são utilizados diferentes parâmetros de mapeamento dependendo se as espécies estudadas é um procarionte (isento de íntron) ou de um eucarionte (vários íntrons). Existe uma variedade de configurações de mapeamento e quantificação, métodos estatísticos para processamento das sequências e análise de dados de RNA-Seq,

entretanto, não existe uma padronização estabelecida para essas análises (ESTEVE-CODINA, 2018).

2.3. Ontologia de Genes

Na área de Bioinformática, as ontologias e outros esquemas terminológicos vem sendo usados, por exemplo, como mecanismo para representação de conhecimento do domínio e como importante referência para anotação de dados genômicos (BELLOZE et al., 2007). Uma iniciativa importante foi a criação de termos específicos de Ontologia Gênica. Os termos GO (pronuncia-se como o verbo “ir” em inglês) tem relações hierárquicas no formato de uma árvore, na qual as folhas especificam as funções ou processos gerais. Paralelamente ao progresso da construção de ontologias, outro consórcio, GOA (Gene Ontology Annotation), atribui os termos a sequências. Assim, surgiram então abordagens como o BLAST2GO (CONESA et al., 2005), que classifica populações de sequências, como as de diferentes transcriptomas, segundo as ocorrências de termos GO, e pode-se perceber o enriquecimento de transcritos relacionados a determinadas funções ou processos, em resposta a um desafio.

2.4. Criptosporidiose

Em 1907, Ernest Edward Tyzzer fez sua primeira observação de que as glândulas gástricas de uma variedade de camundongos frequentemente continham um parasito distinto e em 1910 identificou como *Cryptosporidium muris* (TYZZER, 1910). Depois identificou esse novo gênero como nova espécie isolada do intestino de camundongos e a denominou *C. parvum* (TYZZER, 1912). O segundo parasito foi considerado uma nova espécie, porque produzia oocistos de tamanho menor, cuja localização da infecção era apenas no intestino delgado. Durante parte da década de 1970 e década de 1990, acreditava-se que *Cryptosporidium* spp. consistia em apenas duas espécies; um, *C. muris*, que infecta a mucosa gástrica de mamíferos e

produz grandes oocistos, e o outro *C. parvum*, que infecta todos os mamíferos e produz oocistos menores (TZIPORI et al., 1980).

O gênero *Cryptosporidium* pertence ao filo Apicomplexa (possui complexo apical), classe Sporozoa (apresenta estádios de reprodução sexuada e assexuada com formação de oocistos), subclasse Coccidia (ciclo de vida envolvendo merogonia, gametogonia e esporogonia), ordem Eucoccidiida (ocorre esquizogonia), sub-ordem Eimeriina (com formação de macrogametas e microgametas). Pertence a família Cryptosporidiidae, caracterizada pela presença de oocistos contendo quatro esporozoítos e por ausência de esporocistos (PLUTZER e KARANIS, 2009). Por possuir algumas características peculiares, diferencia-se de outros coccídios pela sua localização extracitoplasmática, pela estrutura de sua parede, possui uma barreira protetora complexa, constituída por uma camada dupla de lipoproteínas e uma matriz de hidrato de carbono, por sua capacidade de autoinfecção e resistência a muitos antiparasitários (THOMPSON e PALMER; O'HANDLEY, 2008; PLUTZER e KARANIS, 2009).

Em pessoas saudáveis, o parasito provoca enterocolite aguda e autolimitada, ou seja, de auto cura, espontânea. Em imunocomprometidos, como portadores da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), são observadas evacuações frequentes e volumosas, com considerável perda de peso. O período de incubação pode variar de poucos dias até duas semanas em imunocompetentes e pode se tornar crônica em estados de imunossupressão (OLSON et al., 2004).

Em relação aos métodos parasitológicos, são utilizados a coloração negativa com verde malaquita, Kinyoun, coloração por Ziehl Neelsen modificado ou safranina azul de metileno, valendo ressaltar que oocistos do gênero em questão, são muito pequenos e às vezes muito semelhantes. Em casos em que existem poucos oocistos em amostras fecais, ou na vigência de dúvidas quanto ao diagnóstico, preconiza-se a confirmação por meio da combinação dessas técnicas, ou de preferência a utilização de técnicas mais específicas, como a reação em cadeia de polimerase (MEIRELES, 2010).

Métodos moleculares são necessários para identificar espécies, genótipos e subtipos de *Cryptosporidium* spp., sendo fundamentais para determinar o agente responsável pela infecção e a via de transmissão (XIAO e RYAN, 2008; DEL COCO

et al., 2013). No entanto, o custo relativamente elevado dos métodos moleculares tem limitado a sua aplicação em países desenvolvidos e em desenvolvimento (HAQUE et al., 2007).

O sequenciamento dos genes que codificam o rRNA 18S, actina, HSP70 e o GP60 (glicoproteína de superfície do esporozoíto) são utilizados também para identificar espécies e ocasionalmente os genótipos constituintes das espécies *C. parvum*, *C. hominis* e *Cryptosporidium meleagridis*. Devido ao seu potencial zoonótico e diversidade intraespecífica, ferramentas para subtipagem foram desenvolvidas para *C. parvum*. O método de subtipagem mais utilizado é a análise de DNA da glicoproteína de 60 k-Da (GP60) (XIAO, 2010).

A principal limitação que impede o progresso na descoberta de novas drogas terapêuticas antiparasitárias contra *Cryptosporidium* spp. é em grande parte o resultado de seu distinto metabolismo de outros parasitos apicomplexos, a escassez de ferramentas de modificação genética disponíveis, e até recentemente, a falta de um sistema de modelo animal para validar a eficácia do fármaco in vivo. Atualmente, apenas a droga aprovada pela Food and Drug Administration (FDA), a nitazoxanida, tem sido amplamente utilizada contra *Cryptosporidium* spp. em crianças e pacientes imunocompetentes, no entanto, é considerada ineficaz em indivíduos imunocomprometidos (IMBODEN et al., 2010).

Algumas medidas preventivas auxiliam na diminuição da transmissão dessa doença, como programas de educação e cuidados com a higiene pessoal, a lavagem das mãos após o contato com animais diarreicos, destino adequado das fezes, evitar o consumo de leite cru, filtragem ou fervura da água para consumo, possuir o conhecimento sobre a ineficácia dos desinfetantes químicos comumente utilizados contra os oocistos são medidas profiláticas que reduzem a possibilidade de transmissão desse protozoário para os seres humanos (KIANG et al., 2006; YANG et al., 2013).

Ainda não existem vacinas para prevenir a infecção com *Cryptosporidium* spp. e poucas opções quimioterapêuticas para o seu tratamento (CHECKLEY et al., 2015). Novas oportunidades para descobrir drogas são inerentes à disponibilidade de genoma de bancos de dados de sequências para *C. parvum* (ABRAHAMSEN et al., 2004) e *C. hominis* (ABRAHAMSEN et al., 2004) e o desenvolvimento de

tecnologias para a manipulação genética do parasito (VINAYAK et al., 2015; LIPPUNER et al., 2018).

OBJETIVO GERAL

Investigar a resposta das células hospedeiras a partir de uma infecção por esporozoítos de *Cryptosporidium parvum*, analisando as diferenças entre as expressões gênicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar por meio da imunofluorescência a evolução da infecção no interior das células depois da inoculação de esporozoítos de *Cryptosporidium parvum* e incubados por 2, 24 e 48 horas a 37°C e 5% CO₂

Avaliar o mapeamento do genoma de amostras de *Cryptosporidium parvum* em células de *Bos taurus* ao longo do tempo de 2, 24 e 48 horas, esporozoítos e oocistos.

Comparar as funções significativamente enriquecidas no transcriptoma das amostras com apenas esporozoítos e das amostras da célula hospedeira incubadas por 48 horas e infectadas com *C. parvum* com base na análise dos valores de FPKM significativos nas análises de LDA e RDA.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSEN, M.S.; TEMPLETON, T.J.; ENOMOTO, S.; ABRAHANTE, J.E.; ZHU, G. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, v. 304, p. 441- 445, 2004.

ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, v. 11, p. 106, 2010.

BELLOZE, K.T.; DÁVILA, A.; ARAUJO, R.M.; CAVALCANTI, M. C. Ampliando o Uso Colaborativo de Ontologias em Processos de Anotação Genômica. In: E-Science Workshop- SBBD/SBES, p. 71-80. João Pessoa, Paraíba, Brazil, 2007.

BYRON, S.A.; VAN KEUREN-JENSEN, K.R.; ENGELTHALER, D.M.; CARPTEN, J.D.; CRAIG, D.W. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, p. 257–271, 2016.

CERTAD, G.; VISCOGLIOSI, E.; CHABÉ, M.; CACCIÒ, S. M. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 561-576, 2017.

CHECKLEY, W.; WHITE JR., A.C.; 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.; WARD, H.D.; VAN VOORHIS, W.A.; 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**, v. 15, p. 85–94, 2015.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2go: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3674–3676, 2005.

CONESA, A.; MADRIGAL, P.; TARAZONA, S.; GOMEZ-CABRERO, D.; A.C.A. MCPHERSON; SZCZEŚNIAK, M. W.; GAFFNEY, D. J.; ELO, L. L.; ZHANG, X.; MORTAZAVI, A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biology**, v. 17, p. 13, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>.

CryptoDB, 2011. *C. muris* scaffold sequence and annotation from JCVI. <http://www.cryptodb.org>, Accessed October 11 2011.

CURRENT, W.L.; T.B. HAYNES. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. **Science**, v. 224, p. 603-605, 1984.

DEL COCO, V. F.; CORDOBA, M. A.; BILBAO, G.; CASTRO, A. P. A.; BASUALDO, J. A.; FAYER, R.; SANTÍN, M. *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. **Research in Veterinary Science**, 2013.

ESTEVE-CODINA, A. RNA-Seq Data Analysis, Applications and Challenges. **Comprehensive Analytical Chemistry**, p. 1-35, 2018.

FAYER, R.; UNGAR, B. L. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 458-483, 1986.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v.30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000.

HAN, H. A novel feature selection for RNA-seq analysis. **Computational Biology and Chemistry**. v. 71, p. 245-257, 2017. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2017.10.010.

HAQUE, R.; ROY, S.; SIDDIQUE, A.; MONDAL, U.; RAHMAN, S.M.; MONDAL, D.; HOUP, E.; PETRI, W.A. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, p. 713-717, 2007.

HEO, I.; DUTTA, D.; SCHAEFER, D.A.; IAKOBACHVILI, N.; ARTEGIANI, B.; SACHS, N.; BOONEKAMP, K.E.; BOWDEN, G.; HENDRICKX, A.P.A.; WILLEMS, R.J.L.; PETERS, P.J.; RIGGS, M.W.; O'CONNOR, R.; CLEVERS, H. Modelling *Cryptosporidium* infection in human small intestinal and lung organoids. **Nature Microbiology**, v. 3, p. 814-823, 2018.

IMBODEN, M.; RIGGS, M. W.; SCHAEFER, D. A.; HOMAN, E. J.; BREMEL, R. D. Antibodies Fused to Innate Immune Molecules Reduce Initiation of *Cryptosporidium parvum* Infection in Mice . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 1385–1392. 2010. <http://doi.org/10.1128/AAC.00754-09>

KEUSCH, G.T.; ROSENBERG, I.H.; DENNO, D.M.; DUGGAN, C.; GUERRANT, R.L.; LAVERY, J.V.; TARR, P.I.; WARD, H.D.; BLACK, R.E.; NATARO, J.P.; RYAN, E.T.; BHUTTA, Z.A.; COOVADIA, H.; LIMA, A.; RAMAKRISHNA, B.; ZAIDI, A.K.; BURGESS, D.C.; BREWER, T. Implications of acquired environmental enteric

dysfunction for growth and stunting in infants and children living in low- and middle-income countries. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 34, p. 357-364, 2013.

KIANG, K.M.; SCHEFTEL, J.M.; LEANO, F.T.; TAYLOR, C.M.; BELLE-ISLE, P.A.; CEBELINSKI, E.A.; DANILA, R.; SMITH, K.E. Recurrent outbreaks of cryptosporidiosis associated with calves among students at an educational farm programme, Minnesota, 2003. **Epidemiology and Infection**, v. 134, p. 878–886, 2006.

KISSINGER, J.C.; HERMETZ, K. E.; WOODS, K.M.; UPTON, S.J. Enrichment of *Cryptosporidium parvum* from *in vitro* culture as measured by total RNA and subsequent sequence analysis **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 220, p.5–9, 2018.

LIPPUNER, C., C. RAMAKRISHNAN, W.U. BASSO, M.W. SCHMID, M. OKONIEWSKI, N.C. SMITH, M. HASSIG, P. DEPLAZES & A.B. HEHL, (2018) RNA-Seq analysis during the life cycle of *Cryptosporidium parvum* reveals significant differential gene expression between proliferating stages in the intestine and infectious sporozoites. **International Journal for Parasitology**, v. 48, p. 413-422.

LUO, R.; WONG, T.; ZHU, J.; LIU, C.M.; ZHU, X.; WU, E.; LEE, L.K.; LIN, H.; ZHU, W.; CHEUNG, D.W.; TING, H.F.; YIU, S.M.; PENG, S.; YU, C.; LI, Y.; LI, R.; LAM, T.W. Correction: SOAP3-dp: Fast, Accurate and Sensitive GPU-Based Short Read Aligner. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

MARIONI JC, MASON CE, MANE SM, STEPHENS M, GILAD Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Research**, v. 18, n. 9, p.1509–1517, 2008.

SEE, M.J.; STAGGS, S.E.; DUBEY, J.P.; VILLEGAS, E.N. Evaluation of four RNA extraction methods for gene expression analyses of *Cryptosporidium parvum* and *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, p. 185–192, 2012.

MAUZY, M.J.; ENOMOTO, S.; LANCTO, C.A.; ABRAHAMSEN, M.S.; RUTHERFORD, M.S. The *Cryptosporidium parvum* transcriptome during *in vitro* development. **PLoS One**, v. 7, n. 3, 2012, e31715.

MEIRELES, M.V. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v. 19, n. 4, p. 197-204, 2010.

O'CONNOR, R.M.; WANYIRI, J.W., WOJCZYK, B.S., KIM, K., WARD, H. Stable expression of *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40/15 in *Toxoplasma gondii*. **Mol. Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, p. 149-158, 2007.

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

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 187-199, 2009.

ROBINSON, M.D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome Biology**, v. 11, p. 25, 2010.

SIBLEY, L.D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**, v. 304, p. 248-253, 2004.

SLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? **International journal for parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 957–970. doi:10.1016/j.ijpara.2013.07.005, 2013.

SOUZA, VLADIMIR BARBOSA CARLOS DE, 1982- Análise de dados de RNA-Seq com diferentes números de fatores e repetições / Vladimir Barbosa Carlos de Souza. – Viçosa, MG, 2015. xi, 74f

THOMPSON, R.C.A.; PALMER, C.S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 18-25, 2008.

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

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

TYZZER, E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archives fur Protistenkunde**, v. 26, p. 394– 412, 1912.

TZIPORI, S.; ANGUS, K.W.; CAMPBELL I.; GRAY E.W. *Cryptosporidium*: evidence for a single species genus. **Infection and Immunity**, v. 30, p. 884-886, 1980.

UPTON, S.J.; TILLEY, M.; BRILLHART, D.B. Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines. **FEMS Microbiology Letters**, v. 118, n. 3, p. 233-236, 1994.

VINAYAK, S.; PAWLOWIC, M.C.; SATERIALE, A.; BROOKS, C.F.; STUDSTILL, C.J.; BAR-PELED, Y.; CIPRIANO, M.J.; STRIEPEN, B. Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium parvum*. **Nature**, v. 523, p. 477–480, 2015.

WALKER, R.A., SHARMAN, P.A., MILLER, C.M., LIPPUNER, C., OKONIEWSKI, M., EICHENBERGER, R.M., RAMAKRISHNAN, C., BROSSIER, F.; DEPLAZES, P., HEHL ,A.B., SMITH, N.C.. RNA Seq analysis of the *Eimeria tenella* gametocyte transcriptome reveals clues about the molecular basis for sexual reproduction and oocyst biogenesis. **BMC Genomics**, v. 16, p. 94, 2015.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA- Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 57-63, 2009.

WANG, Y.; GONG, A.Y.; MA, S.; CHEN, X.; LI, Y.; SU, C.J. NORALL, D.; CHEN, J.; STRAUSS-SOUKUP, J.K.; CHEN, X.M. Delivery of parasite RNA transcripts into infected epithelial cells during *Cryptosporidium* infection and its potential impact on host gene transcription. **Journal of the Infectious Diseases**, v. 215, p. 636-643, 2016.

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

XIAO L., RYAN, U.M. Molecular epidemiology. In: ***Cryptosporidium and Cryptosporidiosis***, Second Edition, Fayer, R. ; Xiao, L. eds. CRC Press and IWA Publishing, 1075 Boca Raton, FL, USA, p. 387-410, 2008.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 80-89, 2010.

XIE, Y.; WU, G.; TANG, J.; LUO, R.; PATTERSON, J.; LIU, S.; HUANG, W.; HE, G.; GU, S.; LI, S.; ZHOU, X.; LAM, T. W.; LI, Y.; XU, X.; WONG, G.S.; WANG, J. SOAPdenovo-Trans: de novo transcriptome assembly with short RNA-seq reads. **Bioinformatics**, v. 30, n. 12, p. 1660-1666, 2014.

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**, v. 431, p. 1107–1112, 2004.

YANG, R.; MURPHY, C.; SONG, Y.; NG-HUBLIN, J.; ESTCOURT, A.; HIJJAWI, N.; CHALMERS, R.; HADFIELD, S.; BATH, A.; GORDON, C.; RYAN, U. Specific and quantitative detection and identification of *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* in clinical and environmental samples. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 142–147, 2013.

ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. (2003). **Biologia Molecular Básica**. 3a Edição. Porto Alegre: Mercado Aberto.

ZHENGPING, M.; AI-YU, G.; WANG, Y.; ZHANG, X.; LI, M.; LI, Y.; PANG, J.; DONG, S.; STRAUSS-SOUKUP, J. K.; CHEN, X. M. Trans-suppression of host CDH3 and LOXL4 genes during *Cryptosporidium parvum* infection involves nuclear delivery of parasite Cdg7_FLc_1000 RNA. **International Journal for Parasitology**, v. 48, n. 6, p. 423-431, 2018.

CAPÍTULO 2 - O TRANSCRIPTOMA DOS ESPOROZOÍTOS DE *Cryptosporidium parvum* E ESTÁGIOS INTRACELULARES.

Artigo elaborado segundo as normas da revista Veterinary Parasitology - ISSN: 0304-4017

Lucas Vinicius Shigaki de Matos^a, John McEvoy^b, Katia Denise Saraiva Bresciani^c, Giovanni Widmer^d

^aDepartamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV-UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n. 14884-900 - Jaboticabal, SP, Brasil. Endereço eletrônico: lucasvsm@hotmail.com.

^bVeterinary and Microbiological Sciences Department, North Dakota State University, Fargo, USA. Endereço eletrônico: john.mcevoy@ndsu.edu.

^cUniversidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Rua Clóvis Pestana, 793, Jardim Dona Amélia, CEP 16050-680, Araçatuba, São Paulo, Brasil. Endereço eletrônico: bresciani@fmva.unesp.br.

^dDepartment of Infectious Disease & Global Health, Cummings School of Veterinary Medicine at Tufts University, 200 Westboro Rd, North Grafton, MA 01536, USA. Endereço eletrônico: giovanni.widmer@tufts.edu.

Resumo

Há uma lacuna fundamental em relação ao entendimento de como esporozoítos de *Cryptosporidium* spp. interagem com as células para iniciar a invasão e replicação. Desta forma foi realizado um estudo para explicar a distinção entre os aspectos de sua biologia e a infectividade do hospedeiro. Por meio de um ensaio de imunofluorescência, foram detectados separadamente esporozoítos/trofozoítos ligados e que invadiram às células e qual foi sua evolução ao longo de 2, 24 e 48

horas do parasito nas células hospedeiras. Identificou-se a resposta da célula hospedeira a uma infecção por *Cryptosporidium* spp. no período de 2, 24 e 48 horas examinando o transcriptoma e expressão gênica do esporozoítro/trofozoítro com às células. Com base nos genes mais significativos nas análises LDA (Linear discriminant analysis) e RDA (Redundancy analysis) e com maior valor FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads), pode-se perceber uma diferença significativa na expressão das formas evolutivas do *Cryptosporidium parvum* extracelular e intracelular. Os genes que mais expressaram em células incubadas por 48 horas após a infecção foram analisados quanto as espécies biológicas de Gene Ontology (GO) que mostram significativamente os processos enriquecidos e funções do parasito intracelular. O conhecimento dos genes que são mais expressados por *Cryptosporidium parvum* é muito importante pelo fato de se conhecer o comportamento dos esporozoítros/trofozoítros de *Cryptosporidium parvum* nas células, e futuramente impedir sua replicação celular e desenvolver uma droga eficaz capaz de combater este parasito. Deste modo foram detectadas diferenças significativas na expressão gênica, tanto em termos de diversidade quanto de perfil transcricional, por meio da análise de RNA-Seq de transcriptomas replicados intracelulares e esporozoítros. Considerando que as funções do transcriptoma intracelular relacionadas aos ribossomos e síntese proteica são altamente enriquecidas, ficou demonstrado neste estudo que o transcriptoma dos esporozoítros não possui uma assinatura funcional clara.

Palavras-chave: excistação, RNA, bioinformática, criptosporidiose.

Introdução

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* spp. são parasitos intracelulares obrigatórios, pertencentes ao filo Apicomplexa. Estes parasitos são capazes de se desenvolver nas microvilosidades das células epiteliais do intestino delgado de hospedeiros vertebrados, sendo potencialmente letais em adultos e crianças imunodeficientes (Xiao et al., 2004; Ryan & Hijjawi, 2015; Certad et al., 2017).

Com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) na década de 1980, relatos de infecções oportunistas foram associados ao *Cryptosporidium* spp. e esse passou a ser considerado um importante patógeno em seres humanos (Fayer, 2010; Cieloszyk et al., 2012). Esse coccídeo foi incluído na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS) por sua estreita relação com a população de baixo poder aquisitivo, precárias condições de saneamento básico e péssima qualidade da água consumida. Geralmente, a população com essas características apresenta um sistema imune comprometido (Savioli et al. 2006; Assis et al., 2013).

As principais espécies causadoras da criptosporidiose em humanos são *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis* (Ryan et al., 2014; Moore et al., 2016). As formas de transmissão documentadas são de animais para os humanos, de pessoa para pessoa e de animal para animal, por meio de ingestão de alimentos ou do uso de água destinada a lazer que são contaminados direta ou indiretamente com resíduos fecais com oocistos esporulados (Smith et al., 2006; Widmer et al., 2012; Maikai et al., 2013).

Os tratamentos com medicamentos são ineficazes e não há vacina. O único fármaco atualmente aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da criptosporidiose é a Nitazoxanida. No entanto, essa droga tem uma grande desvantagem de não ser eficaz em indivíduos imunocomprometidos e crianças desnutridas (Shoultz et al., 2016).

Os métodos comumente usados para cultivar *Cryptosporidium* spp. (Current & Haynes, 1984) não propiciam a conclusão do ciclo de vida, possivelmente devido à diferenciação ineficiente de gametas e fertilização. Os esporozoítos adicionados às células epiteliais cultivadas tornam-se intracelulares, se transformam em trofozoítos e se dividem assexuadamente para gerar merontes de primeira geração. Na fase sexuada do ciclo de vida do protozoário, este não é capaz de se diferenciar em monocamadas de células convencionais, mas tem sido observado sistema bifásico mais sofisticado (Morada et al., 2015). Nesse estudo propusemos identificar e explicar as funções metabólicas e diferentes estruturas envolvidas na infecção por *C. parvum*. Para tanto, analisou-se o transcriptoma de células MDBK (Madin-Darby

Bovine Kidney - células renais bovinas) e do parasito identificando respostas celulares que afetam a fixação, invasão e replicação do referido protozoário.

Na área de Bioinformática, as ontologias e outros esquemas terminológicos vem sendo usados, por exemplo, como mecanismo para representação de conhecimento do domínio e como importante referência para anotação de dados genômicos (Belloze et al., 2007). Uma iniciativa importante foi a criação de termos específicos de Ontologia Gênica. Os termos GO (pronuncia-se como o verbo “ir” em inglês) têm relações hierárquicas no formato de uma árvore, na qual as folhas especificam as funções ou processos gerais que classifica populações de sequências, como as de diferentes transcriptomas, segundo as ocorrências de termos GO, e pode-se perceber o enriquecimento de transcritos relacionados a determinadas funções ou processos, em resposta a um desafio (Conesa et al., 2005).

O objetivo deste estudo foi investigar a resposta das células hospedeiras a partir de uma infecção por esporozoítos de *C. parvum*, analisando as diferenças entre as expressões gênicas.

Material e Métodos

Obtenção dos oocistos

Oocistos e esporozoítos de *Cryptosporidium* spp. não podem ser produzidos em cultura. Dessa forma, as células em monocamadas foram infectadas com oocistos de *C. parvum* obtidos de camundongos infectados como descrito a seguir.

Os oocistos foram obtidos a partir de fezes de camundongos CD1 ou Knockouts criados no laboratório Charles River. Os animais foram mantidos na Tufts Cummings University em gaiolas especiais para colheitas de fezes. A dimensão da gaiola era de 10 cm de largura, 20 cm de comprimento e 15 cm de altura, ela apresentava uma grade metálica na qual os camundongos permaneciam

suspensos e suas fezes isoladas na parte inferior da mesma, facilitando o recolhimento. Pela técnica da coloração Ziehl Neelsen modificada foi investigada a eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Os oocistos foram extraídos de um gradiente de densidade de 10% a 25% de Nycodenz (Alere Technologies, Oslo, Noruega) (Widmer & Tanriverdi, 2004). Tanto os oocistos quanto os esporozoítos utilizados no experimento foram de *Cryptosporidium parvum* e o nome do isolado foi MD (Okhuysen et al., 2002).

Preparo dos esporozoítos

Os esporozoítos de *Cryptosporidium parvum* foram isolados utilizando esferas imunomagnéticas (Dynabeads G. Invitrogen. Ref. 10003D). Uma pequena alíquota dos mesmos foi adicionada em PBS (phosphate buffered saline), em uma diluição de 1:10, no hemocítmetro para determinar a concentração das amostras. Cada amostra do experimento continha $1,5 \times 10^7$ oocistos de *C. parvum*.

Primeiramente, para esterilizar a amostra, foi adicionado 10% de cloro aos oocistos purificados e estes incubados por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foi adicionado 10% de soro fetal bovino (SFB) por cinco minutos. Então, a solução foi lavada com PBS a 5000 g por cinco minutos para remover o alvejante. Em um outro tubo de 1.5 mL, as esferas imunomagnéticas foram preparadas, (Dynabeads G. Invitrogen. Ref. 10003D), de acordo com o protocolo do fabricante. Posteriormente, foi feita a reação das esferas magnéticas com 350 µL de anticorpo monoclonal (1: 5 ~ 100 µL de stock em 400 µL de PBS), que foi mantida por 10 minutos com movimentos de rotação à temperatura ambiente. O tubo do ímã foi retirado, lavado duas vezes com suaves pipetagens com 300 µL de PBS 0,1% de Tween-20, e o complexo esferas magnéticas-anticorpo (5F10) foi ressuspenso em 200 µL de PBS. Na sequência, o produto obtido da etapa 3 (esferas imunomagnéticas marcadas com o anticorpo monoclonal) foi misturado com os oocistos de *C. parvum*, e mantidos em rotação por 15 minutos em temperatura ambiente. A seguir, o produto foi lavado três vezes com PBS e o sobrenadante descartado. Após este procedimento, foram mantidos no tubo apenas as esferas, anticorpo nomeado (5F10) e oocistos. As bactérias, detritos e impurezas foram

descartadas junto com o sobrenadante. Na sequência, foi adicionado sal de ácido taurocólico (T9034-5G, Sigma) a uma concentração final de 0,75% para induzir a excitação. Esta solução foi incubada por 1 hora a 37 ° C e 5% de CO₂. A seguir, foram removidas as esferas imunomagnéticas com oocistos e preservados apenas os esporozoítos excitados no tubo.

Preparo do RPMI-1640 Medium com 10% SFB (RPMI- SFB) e condicionamento em células HCT-8

Para o preparo do RPMI-SFB 10%, o meio para cultivo celular RPMI-1640 foi suplementado com 10% SFB, 10% penicilina e estreptomicina, 1% L-glutamina e Bicarbonato de sódio. RPMI- SFB foi incubado com células HCT-8 por 1 dia à 37°C e 5% CO₂. Os meios condicionados a partir de células HCT-8 com RPMI- SFB foram estocados a 37°C e 5% CO₂ até serem utilizados. O grupo controle continha esporozoítos em PBS e o grupo tratado era composto por esporozoítos em Meio RPMI- 1640, 10% SFB condicionado em células HCT-8 com GalNAc (Benzyl 2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside (10uM)). As amostras foram divididas em dois grupos: o primeiro não submetido à incubação e no segundo, as amostras foram incubadas por 2 horas a 37 ° C e 5% de CO₂.

Preparo das células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney)

As células MDBK, derivadas dos rins de *Bos taurus*, se desenvolveram em frascos de 25 cm² durante uma semana a 37 ° C com 5% de CO₂ em Media Dmem (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium), 4,5 g/L glucose, Piruvato de sódio suplementado com 10% SFB, 10% Penicilina e Estreptomicina, 1% L-glutamina e Bicarbonato de sódio, até atingirem aproximadamente 95% de confluência. Quando essas células MDBK apresentavam esse grau desejado, era realizado o procedimento do item (preparo dos esporozoítos) e os esporozoítos inoculados nas células. Uma concentração de quatro esporozoítos por célula hospedeira foi utilizada no experimento de 2 horas e a de um oocisto excitado por célula hospedeira nas

incubações de 24 e 48 horas. Duas placas de 25 cm² por amostra foram utilizadas, totalizando aproximadamente $6,2 \times 10^6$ de células por amostra de RNA extraído. Depois da infecção com os oocistos e esporozoítos, as células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 2, 24 ou 48 horas.

Posteriormente, as incubações, foram realizadas duas lavagens com 5mL de PBS para a retirada dos oocistos e esporozoítos não infectantes. As células infectadas foram colhidas às 2, 24 e 48 horas após a infecção.

Na próxima etapa, foi adicionado 2 mL de Accutase em cada frasco de 25 cm² contendo células infectadas por *C. parvum*. Estes recipientes foram mantidos a 37 °C durante 15 a 25 minutos para propiciar o destacamento das células do fundo.

Após esse procedimento, dois frascos do mesmo tratamento e mesmo tempo de incubação foram selecionados aleatoriamente para compor um tubo Falcon de 15 mL, o qual foi centrifugado a 10000 g, removendo-se o sobrenadante e o pellet transferido para um tubo de 2 mL. O mesmo processo de extração de RNA (ácido ribonucleico) das amostras do experimento que continham apenas esporozoítos foi realizado.

Experimento com células MDBK para avaliar a penetração de esporozoítos

Células MDBK com 95% de confluência desenvolvidas por 7 dias em Meio Dmem (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) com adição de 4,5 g/L (gramas/Litro) glucose, Piruvato de sódio suplementado com 10% SFB, 10% Penicilina e Estreptomicina, 1% L-glutamina e Bicarbonato de sódio, foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂. A separação dos esporozoítos foi realizada por meio de esferas imunomagnéticas, (Dynabeads G. Ref. 10003D), como descrito no item (preparo dos esporozoítos), e foi feita a infecção com $1,3 \times 10^5$ esporozoítos por poço em uma placa contendo 48 poços.

Duas reações de fluorescência foram feitas para analisar a quantidade de esporozoítos presentes e os ausentes no interior das células. Após 2 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂, os poços com células infectadas com os esporozoítos de *C. parvum* foram lavados duas vezes com PBS para retirada do excesso de

esporozoítos. Posteriormente, as células infectadas foram fixadas com paraformaldeído por 15 minutos e incubadas por mais 15 minutos em PBS com SFB 10% para se evitar a fluorescência de materiais inespecíficos. Então, realizou-se a marcação com o anticorpo primário monoclonal (2E5) específico para esporozoítos, e as amostras marcadas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após essa etapa, o produto foi lavado com PBS duas vezes, adicionado o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (goat anti-mouse IgG, FITC, Ref. A11029) e então incubado por mais 30 minutos em temperatura ambiente. O mesmo processo foi realizado com células MDBK incubadas por 24 horas e 48 horas, com uma diferença, a fixação foi feita com metanol.

Subsequentemente, foi realizada uma permeabilização com Triton X 100 1% por 15 minutos em temperatura ambiente. Para distinguir os esporozoítos de *C. parvum* que penetraram nas células, foi feita marcação com anticorpo primário monoclonal (2E5) e as amostras foram incubadas com PBS/ SFB 10% em temperatura ambiente por 30 minutos para. Após esse período, foram executadas duas lavagens com PBS, sendo adicionado o anticorpo secundário Alexa Fluor 555 (goat anti-mouse IgG, TRITC, Ref. A21424). A leitura da placa foi realizada em microscópio Nikon Eclipse TI e a análise das imagens com a sobreposição dessas foi feita por meio do o software NIS Elements.

Métodos de biologia molecular e análise dos dados

O RNA total foi extraído de esporozoítos, oocistos e células infectadas por *C. parvum* utilizando RNeasy Mini Kit, Ref:74104 (Qiagen). A extração de RNA foi realizada no Qiacube SN50953 seguindo o protocolo do fabricante denominado: Purification of total RNA from animal tissues and cells incluindo digestão de DNA, Dnase Set (Ref: 79254). Disponível no Qiacube Web Portal.

Duas etapas foram realizadas antes da extração no Qiacube. A primeira foi a ruptura e homogeneização dos esporozoítos usando o Sistema Minibeatbeater (Biospec Products) com esferas de zircônia / sílica de 0,5 mm Ref: 11079105 em cinco minutos de agitação. Os esporozoítos foram rompidos por agitação rápida na

presença de esferas e 500µL de tampão de lise RLT (tampão de lise com tiocianato de guanidina, com adição de 10 mL de 2-mercaptoetanol/mL, RNeasy Minikit, QIAGEN). Em seguida, foi efetuada a centrifugação a 15400 g ou velocidade máxima por três minutos. Na segunda etapa, a quantidade de 360 µL de sobrenadante foi removida cuidadosamente e o lisado foi transferido para uma coluna de rotação QIAshredder (Ref: 79654) colocada em um tubo de 2 mL. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 15400 g por três minutos e foram transferidos 350 uL do produto para outro tubo de 2 mL, específico para o Qiacube. Então, esse tubo foi colocado no Qiacube para fazer a extração de RNA automaticamente.

Qualidade do RNA

Este parâmetro foi avaliado pelo indicador métrico RNA Quality Number (RQN). Este baseia-se numa escala de um a 10, em que um representa o RNA completamente degradado e 10 totalmente intacto. Acima de cinco, as amostras foram consideradas aptas a serem incluídas no estudo. As leituras foram realizadas pelo PROZize 3.0 Data Analysis Software.

O sistema HiSeq2500 é adequado para projetos que tenham necessidade de uma produção de grandes volumes de dados de sequenciamento em um curto período de tempo, a um custo reduzido. Ele apresenta dois modos de corrida (“Rapid Run” e “High Output Run”), além da capacidade de sequenciar uma ou duas lâminas (flow cells) simultaneamente. O kit Illumina (TruSeq Stranded RNA library) faz parte do poderoso sistema de sequenciamento de alto rendimento HiSeq 2500.

Dados de alta qualidade usando a comprovada química Illumina SBS tornam o instrumento de escolha para os principais centros de genoma e instituições de pesquisa em todo o mundo. Este foi usado para produzir as bibliotecas de cDNA extraídos de uma amostra de oocistos *C. parvum* isolado MD apenas com PBS, sem incubação. Além dessa amostra, sete amostras de esporozoítos com PBS, cinco foram incubadas por 2 horas e duas não foram incubadas.

Outras sete amostras de esporozoítos com Meio RPMI- 1640, 10% SFB condicionado em células HCT-8 com GalNAc Benzyl 2-acetamido-2-deoxy-α-D-

galactopyranoside (10uM) foram utilizadas para fazer essas bibliotecas, sendo que dessas, cinco foram incubadas por 2 horas e duas não foram incubadas. Também, 13 amostras de células infectadas com *C. parvum*, sendo quatro incubadas a 37°C a 5% CO₂ por 2 horas, quatro por 24 horas e cinco por 48 horas foram adicionadas a biblioteca de cDNA. As 28 bibliotecas de cDNA foram submetidas a geração de clusters e sequenciamento de 100 nucleotídeos de extremidade única em uma Illumina Hi-Seq 2500 na instalação central da Tufts Genomics (tucf.org). Os dados da sequência foram depositados no European Nucleotide Archive sob os números de acesso ao projeto PRJEB25665 e PRJEB28268. Estes dados do transcriptoma arquivados sob o acesso PRJEB25665 e PRJEB28268 também foram depositados no CryptoDB, (www.cryptodb.org).

Para fazer uma comparação da expressão gênica das amostras do atual estudo com o experimento de Mirhashemi et al., 2018, foram incluídas cinco amostras desse estudo, sendo uma amostra de oocistos *C. parvum* TU114 e quatro amostras de células epiteliais de jejuno de suíno (IPEC-J2) (Brosnahan et al., 2012), incubadas por 24 horas e realizado o mesmo procedimento do estudo em questão. O dado do sequenciamento foi obtido no European Nucleotide Archive sob o número de acesso do projeto PRJEB17685.

Análise de expressão gênica

As análises do RNA-seq foram realizadas conforme descrito no trabalho de Mirhashemi et al., 2018. As sequências foram convertidas do formato FASTQ para FASTA e subamostradas em mothur, o qual é um pacote de software de código aberto para processamento de dados de bioinformática (Schloss et al., 2009). Para quantificar a expressão de um gene ou um transcrito, as sequências de RNA-Seq foram primeiramente analisadas pela qualidade e remoção de artefatos de sequenciamento.

As amostras dos experimentos com apenas esporozoítos foram mapeadas diretamente com o genoma de referência *C. parvum* IOWA (versão 36) (Abrahamse et al., 2004) que foram fornecidas do banco de dados site Galaxy (usegalaxy.org)

(Heiges et al. 2006). Nos experimentos que utilizaram esporozoítos e células MDBK, primeiramente, as leituras foram mapeadas a partir do genoma de *Bos taurus* referência (bosTauMd3) utilizado do site Galaxy (usegalaxy.org) (Afgan et al., 2016) para estimar a proporção de transcritos de parasitos em relação ao transcriptoma do parasito e o hospedeiro. Todos os mapeamentos foram utilizados o HiSat2 (Kim et al., 2015) conforme implementado no Galaxy (usegalaxy.org) (Afgan et al., 2016). As leituras que não se alinharam com o genoma bovino foram posteriormente mapeadas, também com HiSat2 (indexação hierárquica para alinhamento de transcrições), para o genoma de *C. parvum* IOWA.

Logo após o mapeamento, foi feita a quantificação relativa de cada gene/transcrito e então foi aplicado um teste estatístico sobre os dados com intuito de eliminar falsas diferenças entre as réplicas experimentais. Cada amostra de RNA-Seq tinha aproximadamente 12 milhões de leituras. As sequências foram convertidas do formato FASTQ para FASTA em mothur (Schloss et al. 2009). As leituras foram mapeadas para o genoma do *C. parvum* usando HiSat2 (Kim et al., 2015), conforme implementado no Galaxy (usegalaxy.org) (Afgan et al., 2016). Uma tabela de FPKM (fragmentos por quilobase de transcritos por milhão de leituras mapeadas) para os dados de RNA-Seq que foram mapeados para o genoma de *C. parvum* IOWA foi criada com Cufflinks (Trapnell et al., 2010). Cufflinks retornaram valores FPKM para 3886 genes *C. parvum* IOWA de 33 amostras (duas de oocistos, 14 de esporozoítos e 17 de células infectadas com estádios do parasito intracelularmente. Destas últimas, quatro incubadas por 2 horas, oito por 24 horas e cinco por 48 horas).

A correlação entre os valores FPKM dessas amostras replicadas foi visualizada conforme mostrado na Tabela 1. Análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada com GenAlEx (Peakall & Smouse, 2012). As distâncias entre pares foram calculadas usando a métrica SSR (Variação atribuída pela relação entre X e Y). Essa distância foi calculada adicionando o quadrado da diferença em FPKM entre duas amostras em todos os genes.

Análises LDA e RDA

O programa LefSe, conforme implementado no Galaxy em huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/, foi usado para a Análise Linear Discriminante (LDA) para identificar genes marcadores, ou seja, genes que melhor explicam a diferença entre amostras de transcriptomas infectados e controles. A RDA (Análise de redundância) é a análise canônica utilizada para discriminar quais as variáveis que mais contribuem para a variância das espécies.

A fim de identificar processos biológicos expressos diferencialmente em esporozoítos e nos estádios intracelulares (48 horas de incubação), dados de FPKM foram selecionados de 19 amostras (14 amostras de esporozoítos, cinco amostras de células infectadas por *C. parvum* e incubadas por 48 horas) e 3886 genes e analisaram-se usando RDA (Segata et al., 2011) e LDA (Schloss et al., 2009). A análise de similaridade (ANOSIM) (Schloss et al. 2009), foi usada para testar a significância dos aglomerados revelados pela PCoA entre essas amostras. A distância euclidiana foi usada e o ANOSIM foi executado no Galaxy (usegalaxy.org).

A função gênica e as análises de enriquecimento foram realizadas com DAVID (Jiao et al., 2012). O método da Taxa de Descoberta Falsa (Benjamini et al., 1995) e a correção de Bonferroni foram usados para identificar genes diferencialmente transcritos ou funções enriquecidas. Os genes que mais se expressaram em células incubadas por 48 horas após a infecção e nas amostras de esporozoítos foram analisados quanto às espécies biológicas de Ontologia de Genes (GO).

Resultados

Expressão gênica em estádios de esporozoítos e estádios intracelulares

O RQN das amostras de esporozoítos e células variaram de 8.9 a 10 e a amostra de oocistos foi de 7.

O número de sequências de 17 amostras de monocamadas de células infectadas mapeadas para o genoma de *C. parvum*, 14 sequências de esporozoítos e uma amostra de oocistos mapeados para *C. parvum*, estão apresentadas na Tabela 1. Das amostras infectadas com esporozoítos/oocistos de *C. parvum*, quatro permaneceram incubadas por 2 horas, quatro por 24 horas e cinco incubadas por 48 horas. Quatro amostras não infectadas com *C. parvum* foram incubadas por 48 horas. O número de sequências das leituras e estatísticas de mapeamento para o *Bos taurus* e *C. parvum* são representados na Tabela 1.

Os dados do RNA-seq para esporozoítos foram obtidos a partir de 14 amostras que diferiram por tempo de incubação (0 e 2 horas) e tratamento (PBS ou Meio com SFB 10% e GalNAc). As amostras de células variaram pelo tempo de incubação (2, 24 e 48 horas) infectadas ou não com esporozoítos de *C. parvum*. As monocamadas de células infectadas foram replicadas exatamente pelo mesmo processo, cultivadas e infectadas utilizando-se o mesmo lote de oocistos/esporozoítos de *C. parvum*.

Como controle de qualidade, as leituras de sequência de esporozoítos *C. parvum* e células não infectadas foram mapeadas para o genoma bovino e posteriormente para *C. parvum* IOWA. Como esperado, as proporções do mapeamento das leituras nesses controles foram baixas, com uma média de (9833,93 = 0,1%) de leituras de esporozoítos mapeados para o genoma do hospedeiro e uma proporção similarmente baixa de leituras (84= 0,00%) de uma célula em monocamadas não infectadas e mapeadas para o genoma de *C. parvum*.

Para avaliar o impacto de possíveis variáveis experimentais, dados pareados de FPKM para todos os genes presentes no genoma de *C. parvum* (n = 3886) foram plotados (Fig. 1a, 1b, 1c). Como esperado, a mais alta correlação foi observada entre amostras de esporozoítos (n = 3886, coeficiente de correlação de Pearson $r = 0,94$; Fig. 1b) e as monocamadas de células infectadas pelo mesmo tratamento e tempo de incubação (n = 3886, coeficiente de correlação de Pearson $p < 0,001$, $r = 0,82$, Fig. 1a), enquanto que a correlação de dados FPKM de esporozoítos comparado com células incubadas foi menor, como exemplificado pela comparação de esporozoítos de *C. parvum* vs. células incubadas por 48 horas com o *C. parvum*, representado na Fig. 1c ($r = 0,23$, $p < 0,001$ n = 3886).

As distâncias em pares entre 33 amostras (duas de oocistos, 14 de esporozoítos e 17 de células infectadas com estádios do parasito intracelularmente. Destas últimas, quatro incubadas por 2 horas, oito por 24 horas e cinco por 48 horas) estão visualizadas no gráfico de ordenação (Fig. 2). O agrupamento das 14 amostras de esporozoítos (extracelular) e as cinco amostras de células infectadas com *C. parvum* e incubadas por 48 horas (intracelular) exibiu valor significativo (ANOSIM $R = 0,703$, $p = 0,009$) (Schloss et al. 2009).

A baixa heterogeneidade que detectamos entre os transcriptomas de esporozoítos, oocistos e células infectadas e incubadas por 2, 24 e 48 horas estão representadas na Fig. 2, em que são observados clusters de amostras com o mesmo tratamento e mesmas características. Plotagens de abundância indicam que a expressão gênica em parasitos intracelulares foi maior (Fig. 3a, 3b), em que a uniformidade é uma medida da variabilidade do FPKM em todo o genoma.

Na Fig. 4 é possível visualizar o aumento da expressão gênica com o decorrer do tempo (2, 24 e 48 horas). Nas figuras de um a cinco, comprova-se a infecção das células por *C. parvum* com 2 horas de infecção e pode-se notar o aumento da imunofluorescência com o aumento do tempo de incubação (2 a 48 horas).

Expressão gênica diferencial

Embora a abundância de transcritos em esporozoítos, oocistos e parasitos intracelulares esteja significativamente correlacionada e consistente com a regulação gênica específica do estágio de vida do parasito, a correlação entre estes é menor do que entre amostras dos mesmo ciclo de vida (ver Fig. 2).

Tanto nos testes estatísticos de Lefse (LDA) e de Canoco (RDA $p=0,002$), 342 genes foram significativos. No que se refere, apenas os genes que apresentaram os valores mais significativos para ambos testes e pesquisando no CryptoDB.org, foi possível perceber que os genes que codificam as proteínas ribossômicas foram os que mais se expressaram em parasitos intracelulares. Essa

função biológica foi responsável pelos genes mais expressos na célula hospedeira (Tabela 2).

Na primeira análise, o estágio do ciclo de vida (esporozoíto ou intracelular) foi definido como variável independente (categórica), enquanto os dados FPKM representaram as 3886 dependentes variáveis desta análise. A associação entre expressão gênica e variáveis independentes foi significativa pelo teste de permutação (RDA), ($F = 71,9$, $p = 0,002$) (Schloss et al., 2009), consistente com regulação gênica diferencial entre esses estágios do ciclo de vida e os resultados apresentados anteriormente e na Tabela 2.

Apenas os genes que foram significativos em ambos os testes estatísticos foram analisados. No total, 134 genes foram significativos para esporozoítos e 342 significativos para os estágios intracelulares (48h) (Fig.5).

Esses genes com maior pontuação para ambos LDA e RDA foram analisados para GO enriquecido para processos biológicos exibindo resultados altamente significantes; os processos GO mais significativos identificados pelo LDA e RDA estão representados na Tabela 2. Consistente com os resultados da Tabela 2, o processo biossintético peptídico foi o mais enriquecido intracelularmente com os genes mais significativos nas duas análises, seguido de tradução, amida processo biossintético e processo metabólico peptídico (Tabela 2). Com base nos genes mais significativos nas análises LDA e RDA e que apresentaram maior valor de FPKM, percebe-se diferença significativa na expressão desse parasito em ambiente intracelular quando comparado ao ambiente extracelular.

Discussão

Nesse estudo foram demonstradas as diferenças de expressão gênica entre esporozoítos (fase extracelular) e células infectadas com *C. parvum* e incubadas por 48 horas (intracelular).

Na figura 4, pode-se observar o aumento da expressão gênica, e consequentemente maior infecção conforme há um aumento no tempo de incubação, e nas figuras 6a, 6b e 6c observa-se o aumento da fluorescência das

células infectadas com *C. parvum* com o decorrer do tempo (2, 24 e 48 horas). Essas informações confirmam a interação entre esporozoítos e células.

Os esporozoítos não têm um perfil consistente como as amostras intracelulares que mostram funções do transcriptoma intracelular relacionadas aos ribossomos e síntese proteica altamente enriquecida. A partir do conhecimento dos principais genes do transcriptoma celular, de como eles se comportam nas células, sua localização e função no metabolismo do *Cryptosporidium* spp., podemos focar os estudos na tentativa de evitar a expressão desses genes e evitar uma futura infecção por *Cryptosporidium* spp.

As primeiras observações microscópicas documentaram que a multiplicação assexuada em monocamada de células resulta na presença simultânea de trofozoítos, merontes e merozoítos, mesmo após períodos relativamente breves (Current & Haynes, 1984). Outro obstáculo é o fato de que muitas células hospedeiras em uma monocamada infectada por *C. parvum* permanecem não infectadas, tornando difícil estimar a proporção de transcritos na amostra total de RNA que originam do parasito e estudar a regulação do gene do hospedeiro em resposta à infecção.

Baseado na proporção de leituras de sequência que foram mapeadas para o genoma do parasito de 0.23%-11.85%, sendo a menor porcentagem representada por células infectadas e incubadas por 2 horas e a maior porcentagem por células infectadas e incubadas por 48 horas (Tabela 1).

Apenas um pequeno número de estudos publicados se concentrou no transcriptoma do *Cryptosporidium* spp. e, para conhecimento, apenas um estudo atualmente desenvolvido por Mirhashemi et al., 2018 utilizaram o RNA-Seq para caracterizar o transcriptoma do *Cryptosporidium* spp. em células de suínos incubadas por 24 horas. Comparando-se os dados do estudo de Mirhashemi et al., 2018 e o conjunto de dados do presente estudo, foi detectada uma alta e significativa correlação (correlação de Pearson $r = 0,78$). Dentre as possíveis razões para essa semelhança tem-se as mesmas técnicas realizadas, utilização de RNA-Seq para analisar os dados, mesma espécie de *Cryptosporidium* spp. A única diferença entre os trabalhos foi a utilização de diferentes tipos celulares e de hospedeiro, mas ainda assim, houve uma forte correlação entre os dados.

Quando comparados os genes mais significativos em análises de LDA e RDA de amostras do parasito em ambiente intracelular e extracelular foi observado uma expressão significativa em células incubadas por 48 horas após a infecção. A partir da análise das espécies biológicas de Ontologia de Genes (GO) foram evidenciadas significativamente os processos enriquecidos e funções do parasito intracelular. Esses processos foram relacionados a processos biossintéticos de peptídeos, de tradução e processos de amida biossintética de peptídeo.

No site da European Bioinformatic Institute (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO>) foram pesquisados a GO e os processos metabólicos celulares com números significativos foram relacionados a formação de proteínas. Esta é formada, usando a sequência de uma molécula de mRNA para especificar a sequência de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica. A tradução é mediada pelo ribossomo que se associa com um mRNA e termina com a liberação de uma cadeia polipeptídica do ribossomo. As reações químicas e as vias que resultam na formação de peptídeos, compostos de 2 ou mais aminoácidos em que o grupo alfa-carboxila de um está ligado ao grupo alfa-amino de outro pode incluir a tradução de uma proteína precursora e o seu processamento subsequente num peptídeo funcional (EBI, 2018).

A falta de métodos eficazes e simples para modelar o ciclo de vida do parasito *Cryptosporidium* spp. *in vitro* é um desafio para o estudo da biologia molecular desses patógenos. Esporozoítos e suas fases de desenvolvimento que pertencem à fase assexuada do ciclo de vida (trofozoítos, merontes) são, de certo modo, passíveis de estudo, mas as preparações padronizadas de esporozoítos são desconhecidas até o momento.

Parasitos utilizados em pesquisas frequentemente se originam de amostras diagnosticadas positivas. Apenas um pequeno número de isolados de *C. parvum* é mantido por propagação em animais e até mesmo esses isolados parecem ter a auto capacidade de evoluir ao longo do tempo (Widmer et al., 2015).

Esse estudo incorpora dados de RNA-Seq obtidos de isolados de *C. parvum* e os resultados atuais confirmam o efeito de variáveis biológicas em dados de RNA-Seq, mas, significativamente, mostram o efeito do estágio de desenvolvimento das células infectadas pelo *C. parvum* sobre a expressão gênica.

A regulação gênica em esporozoítos de *C. parvum* (extracelular) e células infectadas com *C. parvum* (intracelular) é de interesse biológico, pois pode revelar as diferenças fisiológicas, particularmente no que se refere a forma de propagação em hospedeiros e virulência.

Devido a limitação dos métodos de cultura existentes, no presente estudo não foi possível avançar para as análises de transcriptomas de outras células intracelulares e fases de desenvolvimento, como a merogonia de segunda geração, diferenciação de gametas e fertilização. Uma dificuldade do método de cultura de células no contexto desse estudo é a falta de sincronicidade no desenvolvimento intracelular.

O conhecimento dos genes que são mais expressados pelo *C. parvum* é muito importante pois auxilia no conhecimento do comportamento desse parasito nas células, podendo futuramente impedir sua replicação celular e tornar possível o desenvolvimento de uma droga eficaz e capaz de combater este parasito.

Conclusão

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

Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabela 1. Estatística do mapeamento do genoma de amostras de *Cryptosporidium parvum* em células de *Bos taurus* ao longo do tempo de 2 a 48h, esporozoítos e oocistos.

Amostra	<i>Bos taurus</i>		<i>C. parvum</i> *	
	Taxa de mapeamento total (%)	Mapeada uma vez	Taxa de mapeamento total (%)	Mapeada uma vez
18- apenas células	89.41	10021449 (83.51%)	0.00	25 (0.00%)
19- apenas células	90.27	10239480 (85.33%)	0.00	15 (0.00%)
20- apenas células	90.26	10029828 (83.58%)	0.00	21 (0.00%)
21- apenas células	90.24	9969958 (83.08%)	0.00	18 (0.00%)
23- Células_2h	90.89	10040408 (83.67%)	0.24	2542 (0.23%)
24- Células_2h	90.61	10324223 (86.04%)	0.23	2544 (0.23%)
25- Células_2h	90.68	9992000 (83.27%)	0.27	2958 (0.26%)
26- Células_2h	90.77	10275630 (85.63%)	0.26	2839 (0.26%)
28- Células_24h	87.04	9842812 (82.02%)	0.68	10534 (0.68%)
29- Células_24h	89.91	10122895 (84.36%)	1.30	15449 (1.28%)
30- Células_24h	88.17	9980078 (83.17%)	1.58	20190 (1.42%)
31- Células_24h	85.57	9573576 (79.78%)	0.75	12850 (0.74%)
38- Células_48h	89.34	9856725 (82.14%)	11.85	147104 (11.50%)
39- Células_48h	89.28	10014464 (83.45%)	9.61	121904 (9.48%)
40- Células_48h	89.04	9992290 (83.27%)	8.86	115030 (8.74%)
41- Células_48h	89.39	10011495 (83.43%)	7.88	98597 (7.75%)
42- Células_48h	81.93	9317627 (77.65%)	5.20	101396 (4.68%)
1. Esporozoítos	0.07	5309 (0.05%)	92.40	10544508 (91.49%)
2. Esporozoítos	0.18	5920 (0.06%)	92.93	8801458 (92.16%)
3. Esporozoítos	0.10	6090 (0.07%)	94.90	8242505 (93.87%)
4. Esporozoítos	0.12	6473 (0.07%)	92.74	8990677 (91.82%)

5. Esporozoítos	0.07	4328 (0.05%)	96.03	8487992 (95.10%)
6. Esporozoítos	0.13	6573 (0.07%)	91.68	8917129 (90.60%)
7. Esporozoítos	0.03	1373 (0.01%)	96.52	9949467 (96.16%)
8. Esporozoítos	0.08	2388 (0.03%)	94.67	6650904 (94.32%)
9. Esporozoítos	0.07	4245 (0.05%)	91.97	7904950 (91.22%)
10. Esporozoítos	0.15	5303 (0.06%)	92.10	8420654 (91.36%)
11. Esporozoítos	0.09	6682 (0.06%)	95.40	9935946 (94.32%)
12. Esporozoítos	0.10	4652 (0.05%)	95.32	9351728 (94.65%)
13. Esporozoítos	0.07	6242 (0.05%)	92.11	11019056 (91.31%)
14. Esporozoítos	0.19	6963 (0.08%)	95.90	7893672 (94.94%)
15 Oocistos <i>C. parvum</i> MD	0.13	7115 (0.10%)	84.02	6150413 (82.69%)
Oocistos <i>C. parvum</i> TU114	0.05	2010 (0.02%)	87.53	10390493 (86.59%)

*Sequências que não se alinharam com o genoma bovino foram alinhadas com *C. parvum*.

Tabela 2. Funções significativamente enriquecidas no transcriptoma da célula hospedeira incubadas por 48 horas e infectadas com *C. parvum* com base na análise dos valores de FPKM significativos nas análises de LDA e RDA.

Biological Process						
Categoria	Term	Result count	Fold enrichment	Odds Ratio	Benjamini	Bonferroni
<u>GO:0043043</u>	peptide biosynthetic process	<u>66</u>	5,72	19,94	7,24E-39	1,45E-38
<u>GO:0006412</u>	translation	<u>66</u>	5,72	19,94	7,24E-39	1,45E-38
<u>GO:0043604</u>	amide biosynthetic process	<u>66</u>	5,67	19,41	1,20E-38	3,59E-38
<u>GO:0006518</u>	peptide metabolic process	<u>66</u>	5,56	18,44	5,27E-38	2,11E-37
<u>GO:0043603</u>	cellular amide metabolic process	<u>66</u>	5,51	17,99	9,98E-38	4,99E-37
<u>GO:1901564</u>	organonitrogen compound metabolic process	<u>76</u>	4,63	12,76	8,50E-37	5,10E-36
<u>GO:1901566</u>	organonitrogen compound biosynthetic process	<u>68</u>	4,87	13,48	2,90E-34	2,03E-33
<u>GO:0044267</u>	cellular protein metabolic process	<u>91</u>	2,95	6,16	6,26E-26	5,01E-25
<u>GO:0019538</u>	protein metabolic process	<u>98</u>	2,76	5,8	7,67E-26	6,91E-25
<u>GO:0044271</u>	cellular nitrogen compound biosynthetic process	<u>69</u>	3,73	7,95	1,38E-25	1,38E-24
<u>GO:0034645</u>	cellular macromolecule biosynthetic process	<u>68</u>	3,33	6,5	9,57E-22	1,05E-20
<u>GO:0009059</u>	macromolecule biosynthetic process	<u>68</u>	3,32	6,44	1,27E-21	1,53E-20
<u>GO:1901576</u>	organic substance biosynthetic process	<u>71</u>	2,85	5,09	3,31E-18	4,31E-17

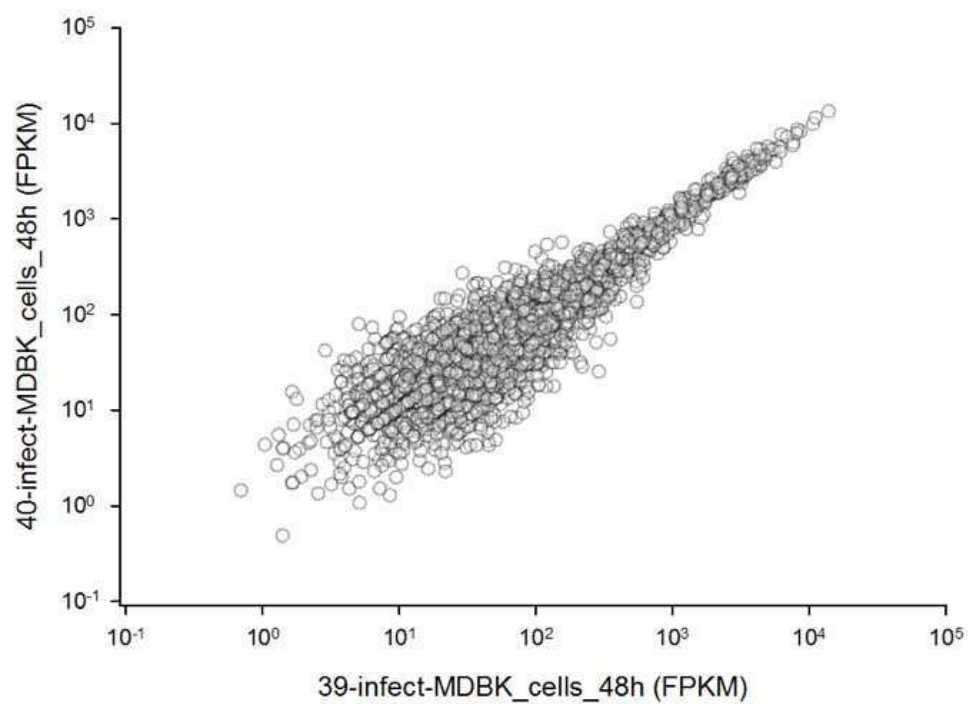


Fig. 1a. Valores de FPKM de *C. parvum* em duas culturas de células replicadas, infectadas com *C. parvum* e incubadas por 48 horas. (Pearson $r = 0,82$).

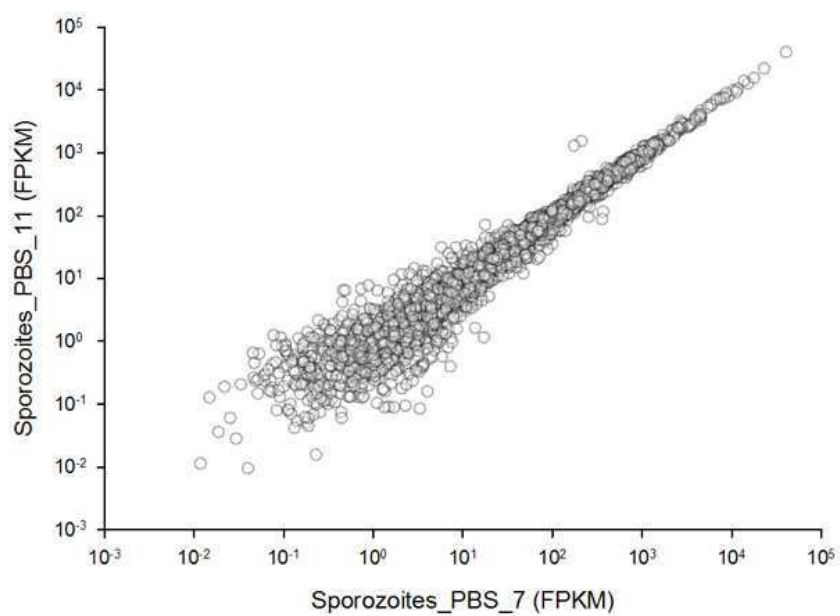


Fig. 1b. Valores de FPKM de duas réplicas de esporozoítos de *C. parvum*. (Pearson $r = 0,94$).

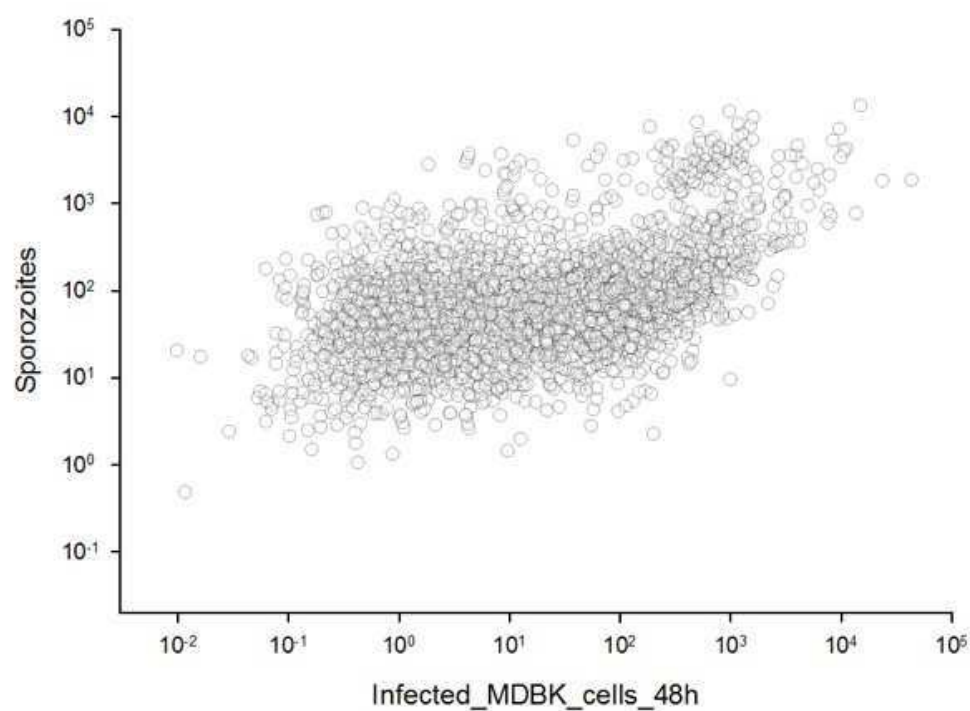


Fig. 1c. Expressão de 3886 genes de *Cryptosporidium spp.* 48 h pós-infecção de células bovinas MDBK e em esporozoítos (Pearson $r = 0,23$). Cada ponto representa um gene.

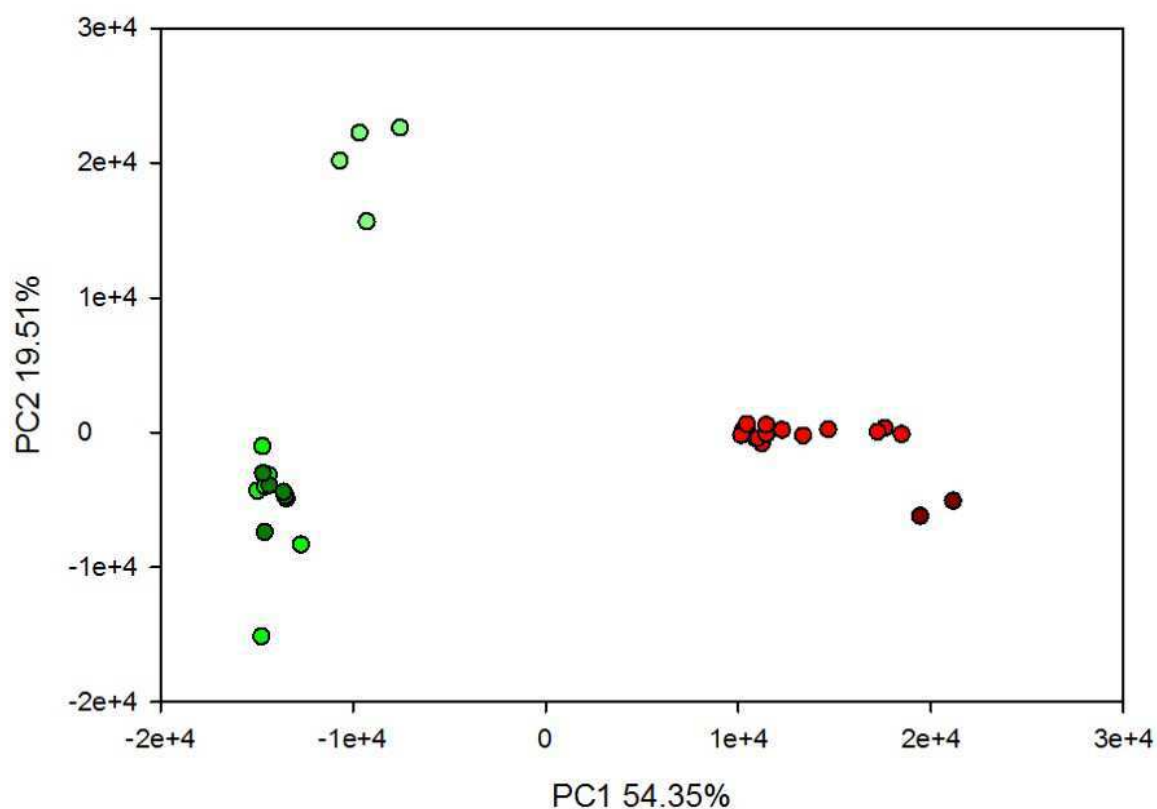


Fig. 2. Distribuição das amostras de acordo com o valor de FPKM (fragmentos por quilobase de transcritos por milhão de leituras mapeadas). Círculos vermelho escuro, oocistos; Círculos vermelho, esporozoítos; Círculos verde claro, células infectadas com *C. parvum* e incubadas por 2 horas; Círculos verde, células infectadas com *C. parvum* e incubadas por 24 horas. Círculos verde escuro, células infectadas com *C. parvum* e incubadas por 48 horas.

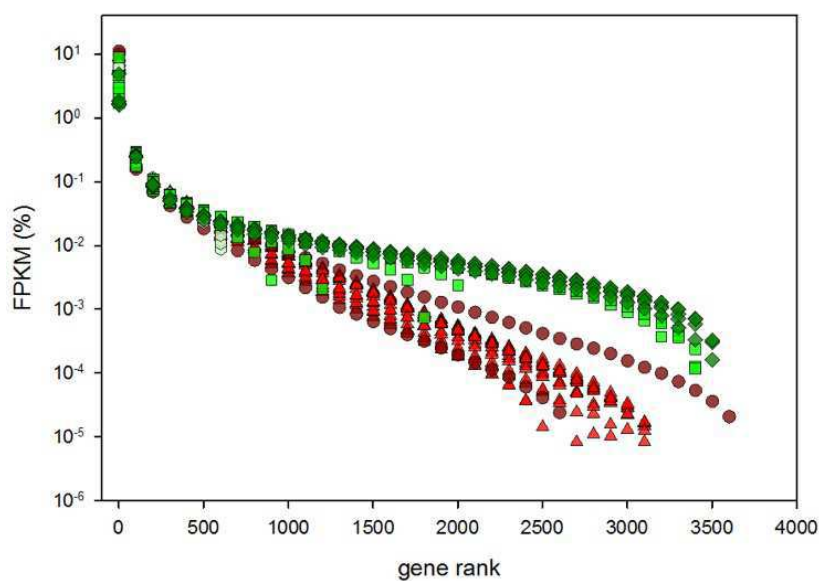


Fig.3a.

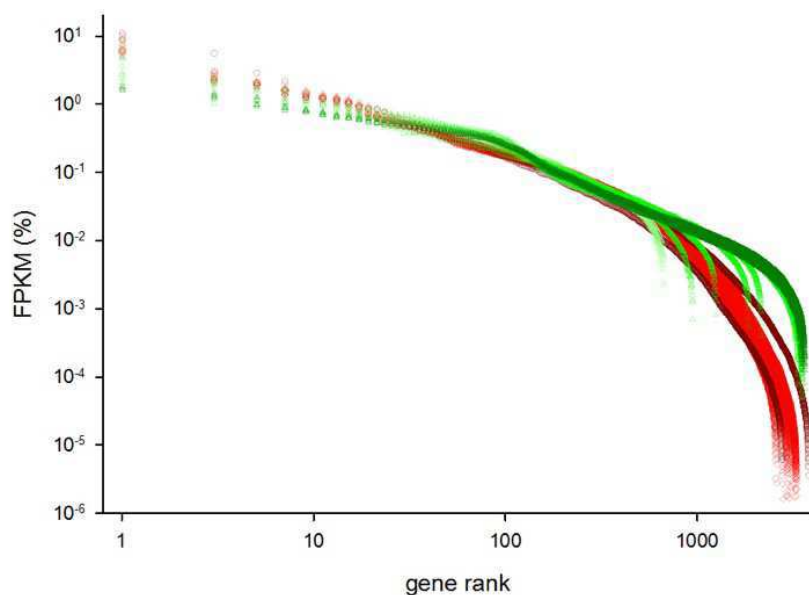


Fig. 3b.

Fig. 3a e 3b. Classificação da abundância relativa de expressão gênica em 14 amostras de esporozoítos, duas amostras de oocistos e 17 monocamadas de células infectadas. A abundância relativa é representada no eixo Y como porcentagem de FPKM, em que a abundância relativa em todos os genes é igual a 100%. Círculos, vermelho escuro, oocistos; triângulos, vermelho, esporozoítos; hexágono, verde claro, células infectadas com *C. parvum* e incubadas por 2 horas; quadrado, verde, células infectadas com *C. parvum* e incubadas por 24 horas. Diamantes, verde escuro, células infectadas com *C. parvum* e incubadas por 48 horas.

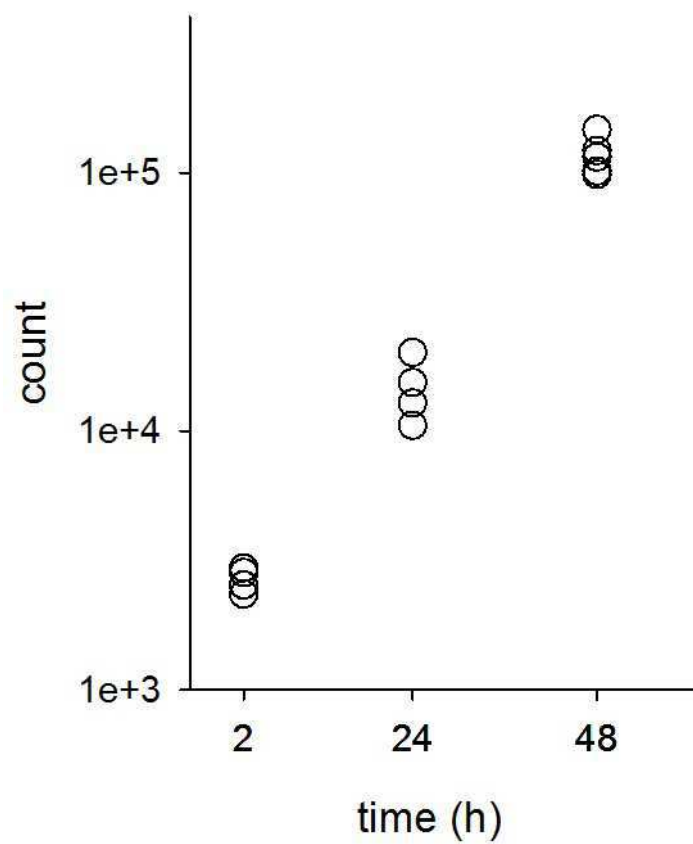


Fig.4. Número de genes expressados correlacionado ao tempo de incubação das células.

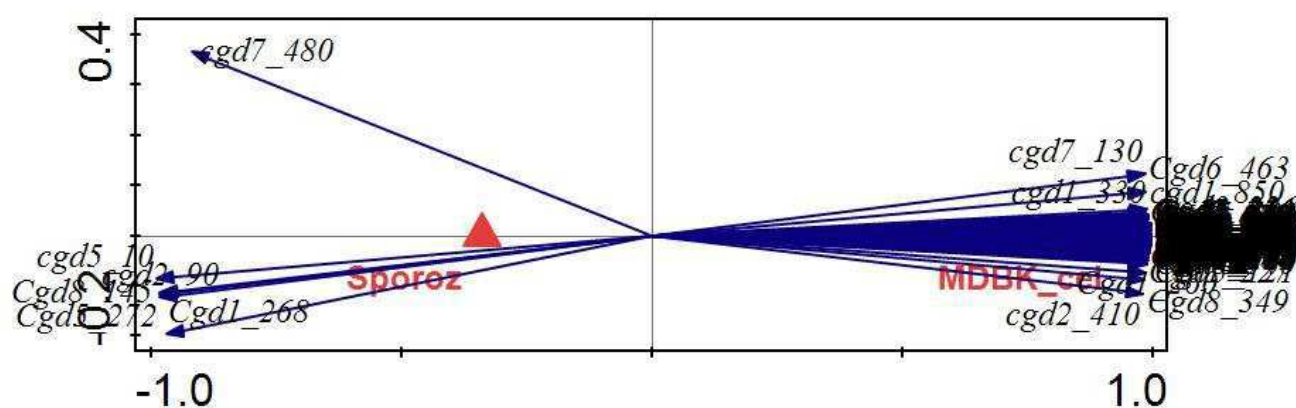


Figura 5. RDA biplot resumindo a variação do FPKM em relação aos estádios do ciclo de vida. As setas apontam na direção do maior aumento nos valores de FPKM de cada gene. O ângulo entre setas do gene indica correlação entre FPKMs de genes diferentes. Ângulos $> 90^\circ$ indicam uma correlação negativa, isto é, um gene muito expressado em esporozoítos e o outro na célula do hospedeiro. As setas de genes próximas ao eixo de ordenação 1 têm valores altos de ajuste (consulte a Figura 5). Por exemplo, o gene *cgd5_10* é super expressado em esporozoítos e tem o ajuste mais alto entre grupo de genes.

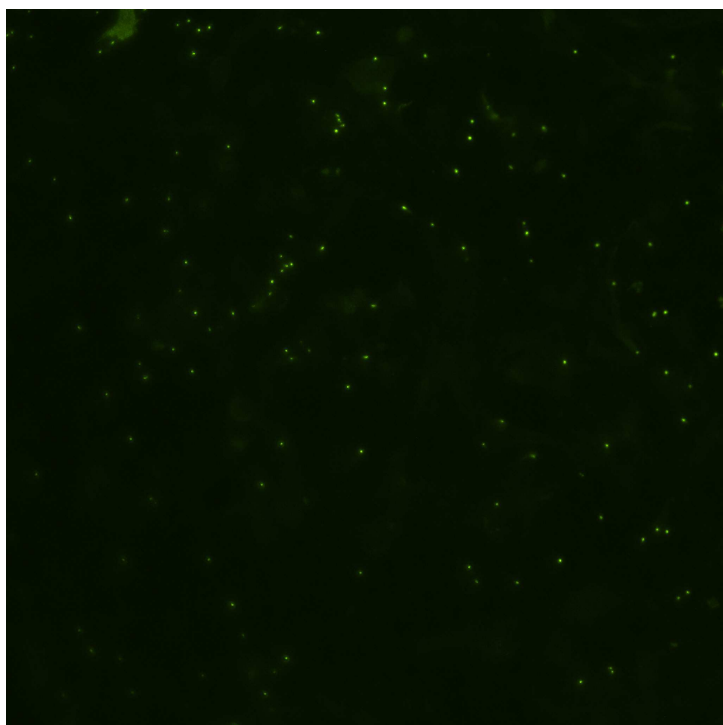


Figura 6a. Imunofluorescência com anticorpo monoclonal para esporozoítos e anticorpo secundário Alexa Fluor 488 incubados por 2 horas.

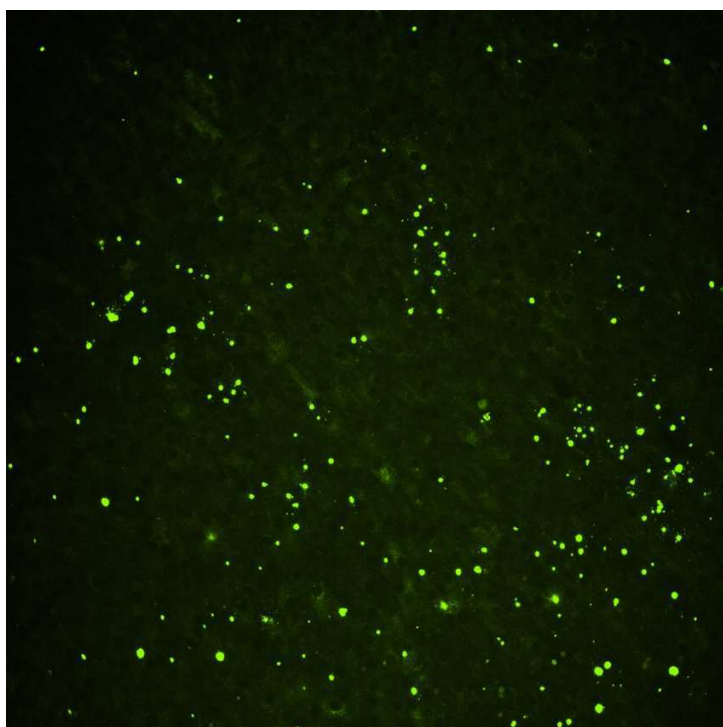


Figura 6b. Imunofluorescência com anticorpo monoclonal para esporozoítos e anticorpo secundário Alexa Fluor 488 incubados por 24 horas.

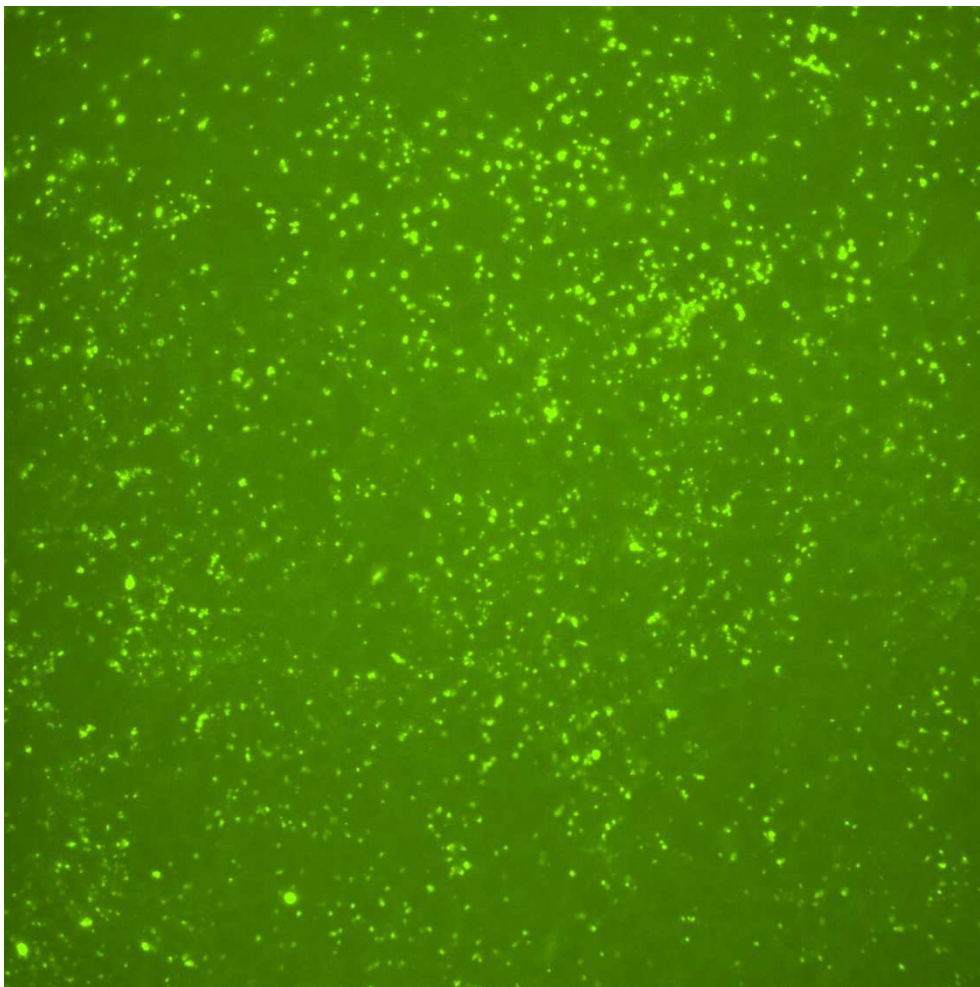


Figura 6c. Imunofluorescência com anticorpo monoclonal para esporozoítos e anticorpo secundário Alexa Fluor 488 incubados por 48 horas.