

ALESSANDRA POPOV DOS SANTOS MANHA

**Análise da expressão diferencial em  
três fases da esporulação de  
oocistos de *Eimeria maxima***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador:  
Prof. Dr. Alda Maria Backx Noronha Madeira

**São Paulo  
2011**

## RESUMO

Manha APS. Análise da expressão diferencial em três fases da esporulação de oocistos de *Eimeria maxima*. [tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A coccidiose aviária é causada por protozoários do gênero *Eimeria*, sendo a *E. maxima* uma das espécies mais patogênicas e de larga distribuição mundial. Visando uma maior compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na esporulação em *E. maxima*, o perfil da expressão gênica foi avaliado em oocistos não esporulados, parcialmente esporulados e esporulados empregando a técnica ORESTES (*Open Reading Frame Expressed Sequence Tags*). Esta metodologia possibilita obter sequências transcritas parciais derivadas majoritariamente da porção central dos RNAs mensageiros, favorecendo a descoberta de novos genes. Foram geradas 20.149 leituras totais e após o pré-processamento, 75% das sequências foram aceitas. Posteriormente ao agrupamento das sequências, foram obtidos 1.207 *contigs* e 2.091 *singlets*. As sequências dos transcritos foram anotadas automaticamente utilizando a plataforma Egene (versão 2), onde 72% dos *contigs* foram anotados como proteínas hipotéticas, 20% como proteínas de função conhecida e 8% como proteínas hipotéticas conservadas. Dos *contigs* que apresentaram similaridade com proteínas de função conhecida ou proteínas hipotéticas conservadas, 74,2% eram similares a proteínas descritas para o Filo Apicomplexa. Após o mapeamento no genoma de *Eimeria maxima*, foi observado que cerca de 77% dos *contigs* ORESTES mapearam. Para avaliar o perfil de expressão gênica entre os diferentes estágios estudados, os transcritos obtidos foram submetidos à análise digital da expressão empregando o *Northern Digital*, sendo observado que 73,5% dos *contigs* estavam presentes em um único estágio, 20,5% em dois estágios e 6% em três estágios, indicando um perfil de expressão gênica diferencial entre as três fases da esporulação. Os perfis digitais obtidos foram submetidos a um agrupamento hierárquico juntamente com os transcritos de merozoítos de *E. maxima*, gerados pelo grupo. Foi observado que os oocistos agrupavam num clado, enquanto que merozoítos agruparam num clado externo. Estes resultados são compatíveis com a biologia do parasita. Para classificar os

*contigs* em diferencial ou não diferencialmente expressos foi realizada análise estatística empregando o programa Kemp. Cerca de 69% dos *contigs* foram classificados como não diferencialmente expressos e 31% como diferencialmente expressos, dos quais a maioria foi observada em somente um estágio da esporulação. Dos *contigs* diferencialmente expressos, 34% das proteínas de função conhecida estavam relacionadas ao metabolismo, 5% ao complexo apical e o restante a proteínas de diversas funções. Para validação dos dados obtidos por ORESTES, a transcrição de um pequeno conjunto de genes foi avaliada por RT-qPCR. Os perfis de expresssão obtidos pelas duas técnicas foram bastante condizentes entre si.

**Palavras-chave:** *Eimeria maxima*. Coccidiose. Oocistos. Esporulação. Expressão gênica. ORESTES.

## ABSTRACT

Manha APS. Differential expression analysis of *Eimeria maxima* oocysts in three phases of sporulation. [Ph. D. thesis (Biology of Host Pathogen Relationship)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Coccidiosis of the domestic fowl is caused by protozoan parasites of the genus *Eimeria*. *E. maxima* is one of the most pathogenic species and widely distributed worldwide. In order to obtain a better understanding of the molecular mechanisms involved in oocyst sporulation of *E. maxima*, the gene expression profiles of unsporulated, sporulating (sporoblast phase) and sporulated oocyst were studied using the ORESTES methodology. This method allows obtaining partial transcript sequences derived mainly from the central portion of the mRNA, facilitating the discovery of new genes. We generated 20,149 total readings and after pre-processing, 75% of the sequences were accepted. Subsequent clustering of sequences, 1207 *contigs* and 2,091 singlets were obtained. The sequences of the transcripts were annotated automatically using the platform Egene (version 2) where 72% of the *contigs* were annotated as hypothetical proteins, 20% as proteins of known function and 8% as conserved hypothetical proteins. Amongst *contigs* showing similarity to proteins of known function or conserved hypothetical proteins, 74.2% protein were similar to those described for the phylum Apicomplexa. After mapping the genome of *Eimeria maxima*, it was observed that about 77% of the *contigs* ORESTES were mapped. For the evaluation of the profile of gene expression among different stages, the transcripts were submitted to digital analysis of expression using Northern Digital, and we observed that 73.5% of the *contigs* were present in a single stage, 20.5% in two internships and 6% in three stages, indicating a differential gene expression profiles among the three stages of sporulation. The digital profiles were submitted to a hierarchical clustering together with the transcripts of merozoites from *E. maxima*. It was observed that all oocysts phases clustered in a clade, whereas merozoites clustered in a separated clade. These results are consistent with the biology of the parasite. For sorting the *contigs* into differential or non-differentially expressed, a statistical analysis was performed using the program Kemp. About 69% of the *contigs* were classified as not differentially expressed and 31% as differentially expressed, most of which was observed in only one stage of

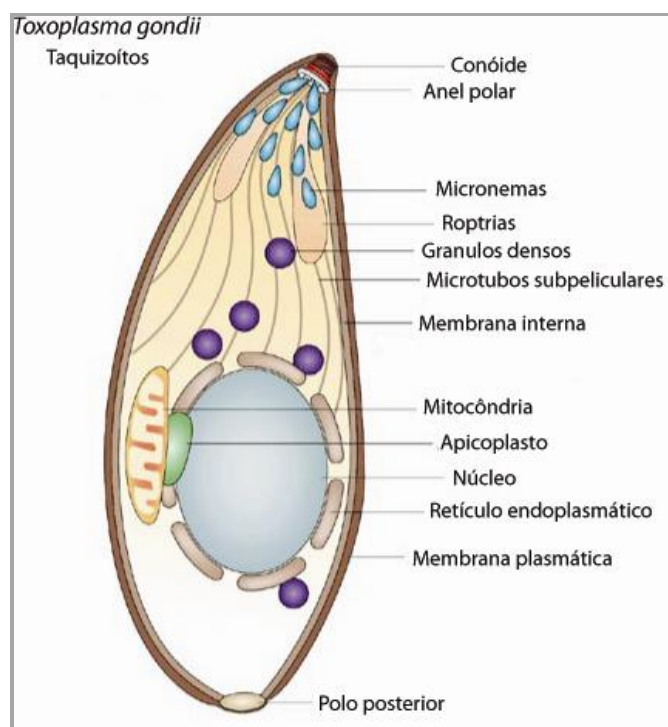
sporulation. Of the differentially expressed *contigs*, 34% of proteins of known function were related to metabolism, 5% apical complex proteins and the remaining proteins have various functions. To validate the data obtained by ORESTES, transcription of a small set of genes were assessed by RT-qPCR. The profiles obtained by two expression technique were quite consistent among themselves.

**Keywords:** *Eimeria maxima*. Coccidiosis. Oocysts. Sporulation. Gene Expression. ORESTES.

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 O filo Apicomplexa

Os organismos do Filo Apicomplexa são protozoários que apresentam complexo apical na extremidade anterior das fases invasivas (Levine, 1973; Current et al., 1990; Tomley et al., 2001; Tomley e Soldati, 2001). As estruturas deste complexo estão associadas à motilidade, adesão e penetração dos parasitas nas células hospedeiras e formação do vacúolo parasitóforo (Current et al., 1990; Bumstead e Tomley, 2000; Morrissette e Sibley, 2002). Como se pode observar na Figura 1, o complexo apical é composto por um conóide, anéis polares, microtúbulos subpeliculares, roptrias, micronemas e grânulos densos (Dubremetz et al., 1998; Santos et al., 2009).



**Figura 1-** Esquema de forma invasiva de um organismo do Filo Apicomplexa (*Toxoplasma gondii*).

FONTE: Baum et al. (2006)

O Filo Apicomplexa é bastante diverso, sendo composto por mais de 5.000 espécies dentre os quais, patógenos de grande importância médica e veterinária,

tais como: *Toxoplasma gondii*, os gêneros *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Babesia*, *Neospora*, *Theileria* e *Eimeria* (Belli et al., 2005; Hu et al., 2006).

A maior parte das espécies de Coccídias conhecidas pertence à família Eimeriidae, compreendendo mais de 1700 espécies de protozoários (Levine, 1988) que podem infectar diversos hospedeiros vertebrados e invertebrados (Current et al., 1990).

## 1.2 O gênero *Eimeria*

O primeiro relato de protozoários do gênero *Eimeria* foi em 1674 por Antony van Leeuwenhoek após a visualização de oocistos de *Eimeria stiedai* na bile de um coelho. Entretanto, a primeira descrição destes parasitas só foi realizada cerca de 150 anos depois, quando Hake, em 1839, observou oocistos associados a um carcinoma no fígado de coelhos. Em 1875, Schineider classificou estes protozoários como pertencentes ao gênero *Eimeria* (Levine, 1973).

Parasitas do gênero *Eimeria* são os mais bem sucedidos da classe Coccidia, pois além de ter distribuição mundial e serem comumente observados (Levine, 1973), tem a capacidade de infectar grande variedade de hospedeiros vertebrados e invertebrados (Current et al., 1990). Estes protozoários possuem um ciclo de vida monoxênico com fases de reprodução assexuada e sexuada (Hammond e Long, 1973; Current et al., 1990). A merogonia e a gametogonia ocorrem dentro das células do hospedeiro e a esporogonia no meio ambiente (Levine, 1973).

## 1.3 Coccidiose aviária

Existem sete espécies de *Eimeria* que causam a coccidiose em galinha doméstica, são elas: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella* (Fernando, 1990).



Cada espécie se multiplica em uma região específica do trato intestinal, ou seja, a infecção é sítio-específica. Por exemplo, *E. acervulina* (Tyzzer, 1929; Levine, 1961) e *E. praecox* infectam a porção superior do intestino delgado (Levine, 1961). *E. maxima* acomete a parte média do intestino, principalmente jejuno e íleo (Tyzzer, 1929; Levine, 1961). *E. necatrix* inicialmente infecta a porção média do intestino delgado durante as duas primeiras esquizogonias, já a terceira esquizogonia e a formação dos gametas ocorrem nos cecos (Levine, 1961). *E. tenella* infecta os cecos (Tyzzer, 1929). *E. mitis* acomete a porção inferior do intestino delgado (Tyzzer, 1929; Levine, 1961) e em *E. brunetti* a infecção inicial e a primeira esquizogonia ocorrem ao longo do intestino delgado, porém a segunda esquizogonia e formação gametas são observadas na porção posterior do intestino delgado e no intestino grosso até o reto (Levine, 1942; Levine, 1961).

Além de serem sítio-específicas, a patogenicidade deste protozoário também varia quanto à espécie, por exemplo, *E. tenella* e *E. necatrix* são as mais patogênicas, enquanto *E. mitis* provoca poucas lesões intestinais (Long e Joyner, 1984; Shirley, 1995). No campo, *E. tenella*, *E. maxima* e *E. acervulina* são as espécies mais relevantes e frequentes.

Estes parasitas acometem principalmente frangos de corte e matrizes reprodutoras (Williams, 1998), induzindo aumento da conversão alimentar, menor capacidade de absorção de nutrientes, menor ganho de peso e em alguns casos, aumento da mortalidade (Min et al., 2004).

As infecções comumente observadas no campo são mistas (Levine, 1961), entretanto, a resposta imune é espécie-específica, ou seja, uma ave imune a uma espécie de *Eimeria* é suscetível às demais (Dalloul e Lillehoj, 2005).

### 1.3.1 Diagnóstico

Classicamente, a identificação das espécies de *Eimeria* é realizada pela análise de diversos parâmetros, como: espécie do hospedeiro, sítios de infecção e desenvolvimento do parasita, aspecto das lesões macro e microscópicas, período de pré-patência, período mínimo de esporulação, morfologia do oocisto, entre outros (Long et al., 1976; Long e Joyner, 1984; Eckert et al., 1995). Entretanto, estas

características biológicas podem estar sobrepostas dificultando a diferenciação das espécies de *Eimeria* que acometem a galinha doméstica, além de necessitar de profissionais altamente capacitados.

Visando a discriminação destas espécies de *Eimeria*, vários ensaios moleculares foram desenvolvidos, dentre estes, os baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) que além de outras vantagens, podem ser realizados a partir de pequenas quantidades de DNA sendo mais sensíveis que as técnicas que até então eram empregadas como, análise eletroforética de isoenzimas (Shirley, 1975; Shirley, 1978; Shirley, 1997), separação eletroforética de proteína 2D (bidimensional) (Sutton et al., 1989) e diagnóstico baseado em hibridização com sondas de rRNA (Ellis e Bumstead, 1990).

A partir destes avanços, testes de alta sensibilidade e especificidade foram desenvolvidos, entretanto, nem todos os ensaios permitiam a detecção das sete espécies de *Eimeria*, como por exemplo, o direcionado para a região intergênica do gene da subunidade ribossômica 5S que era eficiente apenas para *E. tenella* (Stucki et al., 1993).

Outra técnica que foi empregada para o diagnóstico molecular de *Eimeria* de galinha doméstica é o RAPD (polimorfismo de DNA amplificado randomicamente). Este método é baseado em PCR e utiliza *primers* arbitrários que, em condições de baixa estringência, resultam em um perfil específico para cada espécie. Inicialmente, permitia somente o diagnóstico de seis espécies (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix* e *E. tenella*) (Procunier et al., 1993). Anos mais tarde, o nosso grupo desenvolveu um teste de RAPD que é capaz de diferenciar as sete espécies de *Eimeria* de galinha doméstica (Fernandez et al., 2003a).

O primeiro ensaio molecular baseado em PCR que permitia a diferenciação das sete espécies de *Eimeria* foi direcionado para o ITS1 (espaçador interno transcrito 1) do *cistron* de RNA ribossômico (Schnitzler et al., 1998; Schnitzler et al., 1999), entretanto este teste não é capaz de identificar simultaneamente as diferentes espécies, sendo necessária a realização de sete reações.

Nosso grupo também desenvolveu um conjunto de marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) específicos para as sete espécies de *Eimeria* (Fernandez et al., 2004). A partir destes marcadores, foi desenvolvido um ensaio de PCR multiplex que em uma única reação é capaz de detectar e identificar as sete espécies de *Eimeria* de galinha doméstica (Fernandez et al., 2003b).

Para a quantificação da carga parasitária foram desenvolvidos ensaios de PCR em tempo real, que além de detectar e discriminar as espécies, permitem a quantificação do nível de infecção. O primeiro teste, direcionado para o gene codificador da proteína de micronema 1 e sequências espécie-específicas de SCARs, era capaz de discriminar e quantificar somente quatro espécies de *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* e *E. tenella*) (Blake et al., 2008). Logo em seguida, foram desenvolvidos testes baseados em marcadores SCAR que eram capazes de identificar cinco espécies de *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* e *E. tenella*) (Kawahara et al., 2008). Estudos mais recentes têm permitido a identificação, discriminação e quantificação das sete espécies de *Eimeria* que acometem a galinha doméstica (Vrba et al., 2010).

### 1.3.2 Controle da doença

Devido à alta produção de oocistos e a fácil disseminação destes parasitas entre as aves suscetíveis, o controle da coccidiose aviária é extremamente necessário, sendo realizado pelo uso de anticoccidianos e vacinas vivas.

Desde a década de 40, a quimioterapia profilática utilizando drogas anticoccidianas tem sido a principal forma de controle da coccidiose aviária (McDonald e Shirley, 2009). Devido a vários fatores, dentre os quais, resistência parasitária causada pelo uso indiscriminado dos quimioterápicos (Chapman, 2003) e preocupação do mercado consumidor com a possibilidade de contaminação da carne de frango com fármacos, o uso destas drogas tem decaído bastante nos últimos anos (Shirley et al., 2007).

Restrições legislativas à utilização destes fármacos têm crescido principalmente na Europa e Estados Unidos, inclusive, algumas drogas foram totalmente banidas. No Reino Unido, por exemplo, o número de anticoccidianos disponíveis comercialmente caiu de 17 em 2002, para apenas 10 em 2004 (Shirley et al., 2007).

Por outro lado, o emprego de vacinas vivas vem aumentando, em 2002 estavam disponíveis no mercado ou em fase de registro 13 vacinas de *Eimeria* de galinha (Chapman et al., 2002). Em áreas geográficas onde há resistência às

drogas, as vacinas vivas têm sido bastante utilizadas para o controle da coccidiose aviária (Williams, 1998; Allen e Fetterer, 2002).

A primeira vacina lançada no mercado foi a Coccivac® (Schering-Plough) em meados de 1950, sendo ainda empregada no campo (Chapman et al., 2002; McDonald e Shirley, 2009). A partir desta data, várias vacinas de *Eimeria* foram desenvolvidas, as quais podem ser classificadas em quatro tipos: vacinas vivas contendo cepas virulentas, vacinas vivas de cepas precoces, vacinas vivas de cepas atenuadas e as vacinas de DNA recombinante (Allen e Fetterer, 2002; McDonald e Shirley, 2009). Somente as vacinas vivas contendo cepas virulentas e precoces estão disponíveis para comercialização.

As vacinas compostas por cepas virulentas são formuladas com suspensões de oocistos viáveis oriundos de espécies patogênicas. É utilizada em baixas doses, o suficiente para gerar resposta imune sem causar lesões intestinais significativas (Shirley et al., 2005). Porém, erros na administração podem induzir a doença propriamente dita (Shirley et al., 2007).

Por apresentarem um menor número de ciclos de reprodução assexuada e conseqüentemente, redução do período de pré-patência, as vacinas de cepas precoces oferecem menos riscos de indução da doença (McDonald e Shirley, 2009). A desvantagem desta vacina está no seu custo de produção, já que o potencial reprodutivo destes parasitas é 90% menor que o das cepas originais.

Para obtenção de vacinas com cepas atenuadas, as cepas virulentas são submetidas a tratamento térmico ou irradiação ( $x$  ou  $\gamma$ ) o que diminui a infectividade e a produção dos oocistos. Entretanto, estas cepas conferem somente resistência parcial às infecções (Allen e Fetterer, 2002; McDonald e Shirley, 2009).

Estudos para o desenvolvimento de vacinas recombinantes têm aumentado nos últimos 10 anos, entretanto, até o momento, nenhuma destas vacinas está disponível para comercialização. Um dos grandes obstáculos para utilização destas vacinas é a falta de proteção cruzada entre as espécies de *Eimeria* (Allen e Fetterer, 2002).

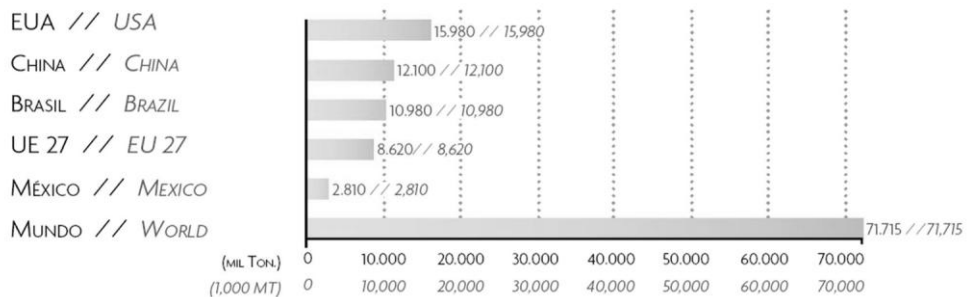
### 1.3.3 Importância econômica

Apesar de grandes avanços na pesquisa de quimioterápicos, vacinas e nutrição, a coccidiose aviária é umas das parasitoses mais importantes do ponto de vista econômico, causando grande prejuízo à indústria avícola (McDougald e Reid, 1995), seja, por custos diretos como menor ganho de peso, aumento de mortalidade, susceptibilidade a infecções secundárias e tratamento com quimioterápicos, ou por custos indiretos como uso de drogas e/ou vacinas para a prevenção da infecção (Shirley et al., 2005).

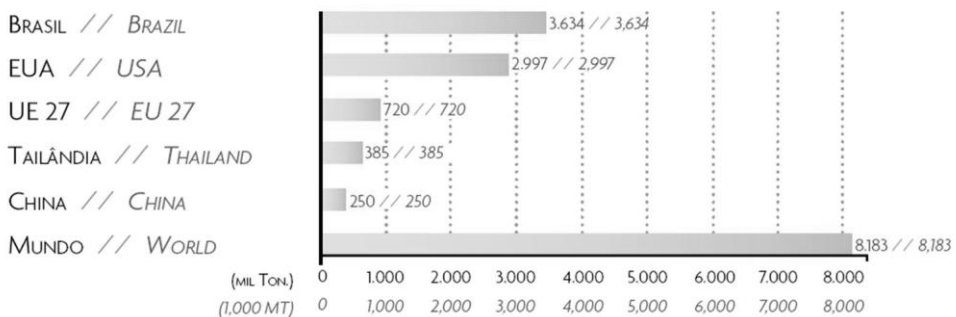
Calcula-se que os gastos mundiais relacionados ao controle desta doença variem de 800 milhões (Allen e Fetterer, 2002) a três bilhões de dólares por ano (Shirley et al., 2004b).

A indústria avícola tem um papel fundamental na economia brasileira. O Brasil é o primeiro maior exportador e o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo (Figura 2). Em 2009 foram produzidas mais de 11 milhões de toneladas de carne de frango, das quais, 67% foram consumidas pelo mercado interno e a exportação deste produto resultou em uma receita cambial de quase 5,86 bilhões de dólares (Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos, Relatório Anual 2009-10 [http://www.abef.com.br/Relatorios\\_Anuais.php](http://www.abef.com.br/Relatorios_Anuais.php)).

## PRODUÇÃO MUNDIAL DE CARNE DE FRANGO



## EXPORTAÇÃO MUNDIAL DE CARNE DE FRANGO

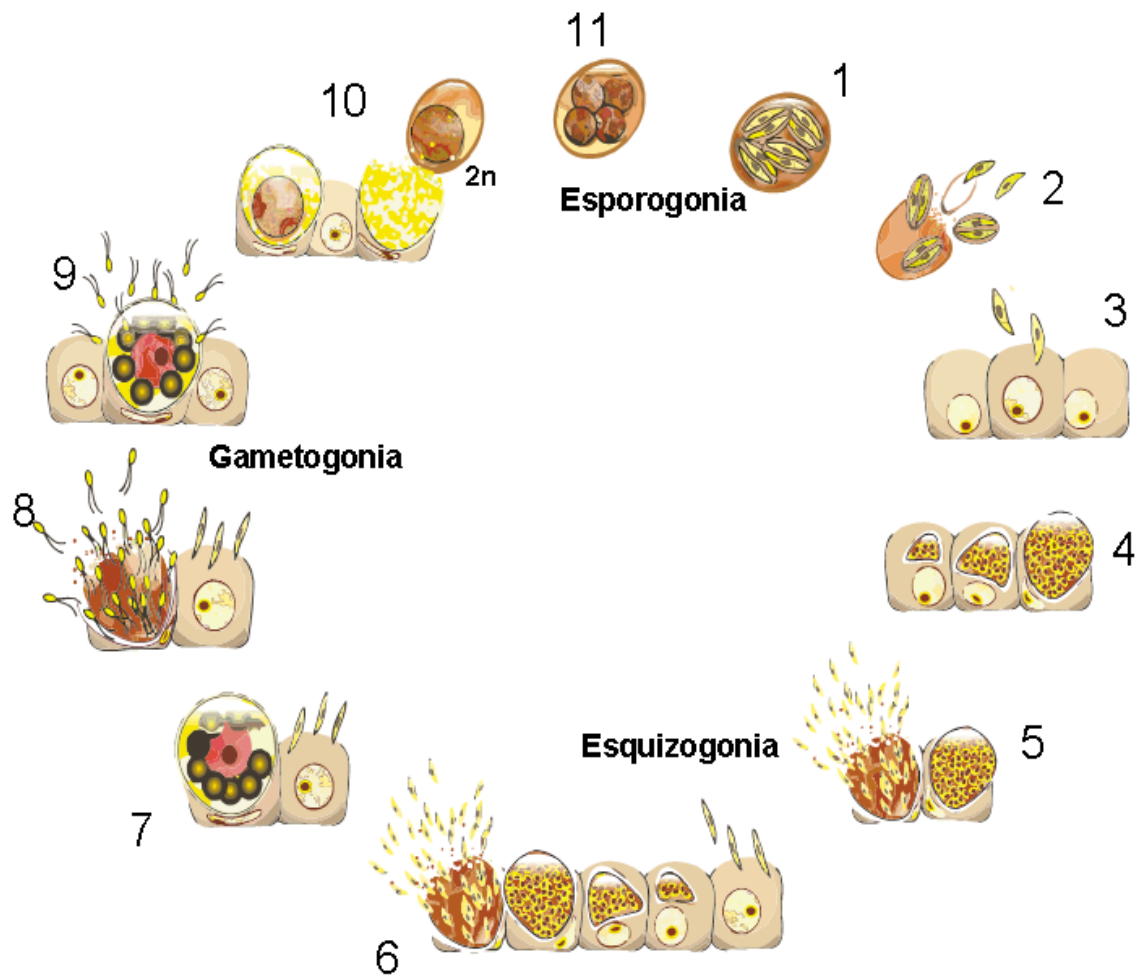


**Figura 2-** Produção e exportação mundial de carne de frango. Número (em milhões de toneladas) referente ao ano de 2009.  
FONTE: ABEF (2009).

### 1.3.4 Ciclo de vida

O ciclo de vida de parasitas do gênero *Eimeria* está representado na Figura 3. A infecção das aves se inicia pela ingestão de um oocisto esporulado (Etapa 1). Em aves como a galinha doméstica (*Gallus gallus*), a parede do oocisto é rompida mecanicamente na moela por ação da musculatura e abrasão provocada por detritos ingeridos. Uma vez no intestino delgado, na presença de tripsina e sais biliares, ocorre a excistação, na qual os esporozoítos saem ativamente dos esporocistos (Etapa 2). Assim que liberados, os esporozoítos invadem as células epiteliais do intestino (Etapa 3), onde se multiplicam por fissão múltipla (reprodução assexuada) formando os esquizontes ou merontes (Etapa 4). Após o amadurecimento e ruptura dos esquizontes há liberação dos merozoítos (Etapa 5), os quais podem infectar

novas células intestinais por uma ou mais gerações, na dependência da espécie de *Eimeria* (Etapa 6). Após a esquizogonia, os parasitas se diferenciam em macrogametócito (Etapa 7) ou microgametócito (Etapa 8). Os microgametócitos se rompem e liberam os microgametas (Etapa 8), que por possuir dois flagelos são capazes de se locomover até os macrogametas (Etapa 9) fecundando-os e produzindo o zigoto (Etapa 10). O zigoto pode ser produto da fertilização de gametas da mesma cepa (autofertilização) ou de cepas diferentes (fertilização cruzada) (Shirley e Harvey, 1996). O zigoto maduro origina o oocisto (Etapa 10), único estágio diplóide, o qual é liberado no ambiente juntamente com as fezes sob a forma de oocisto não esporulado. Em condições adequadas de temperatura, umidade e oxigenação, o oocisto sofre uma meiose seguida de uma mitose formando os esporoblastos (Etapa 11). Cada esporoblasto sofre uma segunda mitose originando os esporocistos os quais contém dois esporozoítos (Etapa 1). O ciclo de vida é completado quando o oocisto esporulado é ingerido por um hospedeiro susceptível (Hammond e Long, 1973; McDougald e Reid, 1995; Min et al., 2004).



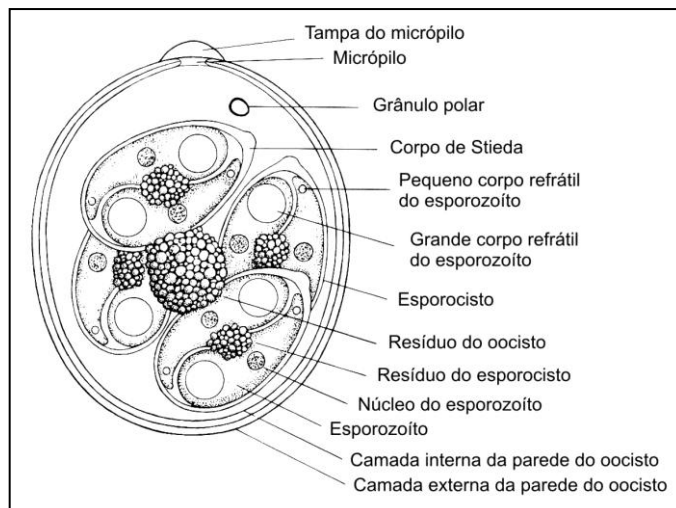
**Figura 3-** Ciclo de vida de *Eimeria*.

FONTE: Pôster de divulgação: "Entendendo e Controlando a Coccidiose aviária", Arte gráfica: Helton Barreiro, Patrocínio Biovet, Edição geral Oswaldo Gessulli Neto (Gessulli Agribusiness), com permissão.

### 1.3.5 Oocistos e esporulação

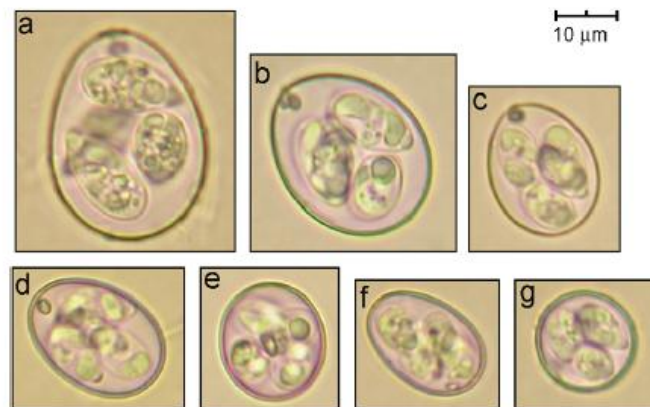
Por ser uma fase exógena do ciclo de vida dos Coccídios (Current et al., 1990), o oocisto é o estágio mais acessível para a realização de estudos biológicos. A morfologia típica de oocisto de *Eimeria* spp. é mostrada na Figura 4.





**Figura 4-** Estrutura típica de oocistos esporulados de *Eimeria* spp.  
 FONTE: adaptado de Levine (1961).

A cor, o tamanho (área e diâmetro), o formato (elíptico, ovóide ou circular), a textura da superfície, a estrutura interna (presença ou ausência de grânulo polar, corpos residuais, corpúsculo de *Stieda* e micrópilo visível) e diversidade no formato dos esporocistos são características que podem variar de espécie para espécie (Joyner, 1982; Castañón et al., 2007). A Figura 5 apresenta fotomicrografias de oocistos das sete espécies de *Eimeria* que infectam a galinha doméstica. Como podemos observar os oocistos apresentam características morfológicas comuns e particulares de cada espécie. Por exemplo, os oocistos de *E. acervulina* têm tamanho similar ao de *E. mitis*, já oocistos de *E. maxima* são maiores que os demais. Em relação à forma, oocistos de *E. praecox* e *E. mitis* são circulares, os de *E. maxima* e *E. brunetti* tem forma ovóide e os de *E. acervulina* e *E. necatrix* são elípticos (Castañón, 2006).



**Figura 5-** Fotomicrografias de oocistos esporulados das sete espécies de *Eimeria* de galinha doméstica. (a) *E. maxima*, (b) *E. brunetti*, (c) *E. tenella*, (d) *E. necatrix*, (e) *E. praecox*, (f) *E. acervulina* e (g) *E. mitis*.  
 FONTE: Castañón (2006).

A parede do oocisto é extremamente robusta (Mai et al., 2009) sendo resistente a proteólise, além de ser impermeável a várias soluções como por exemplo, detergentes e desinfetantes. Entretanto, é permeável à amônia, ao bromometano, a determinadas moléculas e substâncias lipossolúveis (Monné e Hönig, 1954; Ryley, 1973; Mai et al., 2009).

A parede dos oocistos contém camadas multilamelares sendo composta por lipídeos, carboidratos e proteínas. Dentre os lipídeos, são descritos esteróides, ácidos graxos (docosanol, tetracosanol, hexacosanol, miristato, palmitato, estearato, oleato, linolato e fosfolipídios) e alcoóis graxos (Stotish et al., 1978). Em relação aos carboidratos, são observados manose, galactose, glicose e hexosamina (Stotish et al., 1978).

Há diversas proteínas envolvidas na formação da parede do oocisto, GAM56 e GAM82 são as mais estudadas e foram identificadas em oocistos de *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*. Estas proteínas têm importante papel na maturação da parede do oocisto (Belli et al., 2009).

A parede dos oocistos é formada a partir do conteúdo de organelas encontradas exclusivamente em macrogametas, corpos específicos do tipo 1 (WFB1) e do tipo 2 (WFB2) (Pittilo e Ball, 1980), cujos tamanhos variam de acordo com a espécie de *Eimeria* (Mai et al., 2009).

Uma vez no ambiente, os oocistos passam por um processo denominado de esporulação ou esporogonia, tornando-se infectantes. Para tanto, são necessárias

condições ideais de temperatura, umidade e oxigenação (Fayer, 1980; Graat et al., 1994; Waldenstedt et al., 2001), sendo esta última, indispensável para o desencadeamento da esporulação (Wilson e Fairbairn, 1961).

O período de esporulação pode variar de espécie para espécie (Norton e Chard, 1983). Sob condições ideais (oxigenação, umidade relativa entre 40 e 80% e temperatura entre 28 °C a 30 °C) a esporulação é completada de um modo geral, entre 24 a 48 horas (Edgar, 1955; Fernando, 1990; Graat et al., 1994). Em *Eimeria maxima*, após 48h do início da esporulação já é possível observar oocistos totalmente esporulados (Edgar, 1955; Waldenstedt et al., 2001).

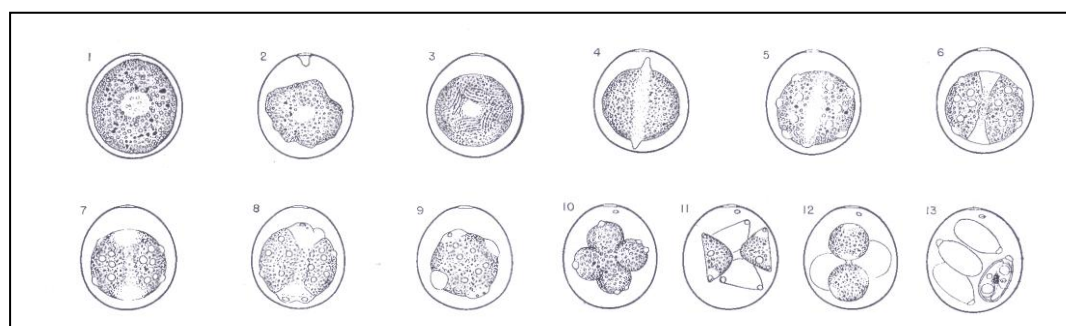
A esporulação é um processo aeróbico e o consumo de oxigênio varia ao longo da esporulação, principalmente durante a divisão nuclear (Wagenbach e Burns, 1969).

Uma grande quantidade de energia é consumida durante a esporulação e como o oocisto está em meio extracelular, esta é gerada à custa de carboidratos armazenados durante o ciclo intracelular (Edgar et al., 1944; Ryley, 1973; Wang et al., 1975). O acúmulo dos grânulos de polissacarídeos nos coccídeos ocorre durante a formação do zigoto e maturação do oocisto. Estima-se que em cada oocisto não esporulado são estocados aproximadamente  $5 \times 10^{-13}$  mol de resíduos de glicose (Wang, 1982). Durante a esporulação, inicialmente há utilização dos grânulos de polissacarídeos, seguida pelo metabolismo de lipídeos (Wilson e Fairbairn, 1961; Joyner, 1982). Em *E. acervulina*, estima-se que durante as primeiras 10 horas de esporulação o nível de polissacarídeo estocado decresce de 83 para 46  $\mu\text{g}/10^6$  oocistos (Wilson e Fairbairn, 1961).

O processo de esporulação inclui três divisões nucleares (uma meiose e duas mitoses) (Vetterling e Doran, 1969; Hammond, 1973; Ryley, 1973) e está exemplificado na Figura 6. O oocisto não esporulado apresenta um citoplasma que preenche totalmente o zigoto, o núcleo é arredondado e ocupa a região central do citoplasma (etapa 1). No primeiro dia da esporogonia o citoplasma dos oocistos condensa adquirindo o formato de uma massa esférica irregular, a qual é separada da parede do oocisto por um espaço preenchido por líquido (etapa 2). Logo em seguida, os grânulos citoplasmáticos agregam-se conferindo ao citoplasma uma aparência reticular (etapa 3). À medida que o citoplasma vai se contraíndo, o núcleo adquire um formato fusiforme e projeções nucleares podem ser visualizadas nas extremidades do eixo nuclear (etapa 4). O núcleo move-se para a região periférica

do oocisto (etapa 5) e ocorre a meiose (etapas 6 e 7). No início desta divisão os grânulos centriolares são visualizados no sentido oposto à membrana do núcleo, a membrana nuclear é rompida e o nucléolo desaparece (Canning e Anwar, 1968; Hammond, 1973). A seguir ocorre a primeira divisão mitótica (etapa 8), há citocinese formando quatro esporoblastos (etapas 9 a 10), geralmente esferoidais. Em seguida os esporoblastos se agrupam assumindo uma forma piramidal (etapa 11). Cada esporoblasto (etapa 12) irá sofrer uma segunda divisão mitótica, originando esporocisto com dois esporozoítos (etapa 13). Após esta etapa, o oocisto está totalmente esporulado.

A esporulação não é sincronizada (Vetterling e Doran, 1969; Hammond, 1973; Ryley, 1973) e nem todos os oocistos esporulam completamente. Em alguns oocistos não há a condensação do citoplasma (Levine, 1973), em outros, a esporulação cessa na fase de esporoblastos.



**Figura 6-** Eventos presentes na esporulação de oocistos de *E. tenella*. (1) oocisto não esporulado; (2) contração completa do citoplasma, forma irregular do citoplasma; (3) citoplasma reticulado; (4) projeção do eixo nuclear; (5) vesículas presentes na superfície citoplasmática e núcleo próximo à região periférica; (6) início da meiose; (7) divisão meiótica completada; (8) início da mitose; (9) início da citocinese; (10) e (11) citocinese completada; (11) aspecto piramidal dos esporoblastos; (12) esporoblastos maduros e (13) oocisto esporulado.  
 FONTE: adaptado de Wagenbach e Burns (1969).

Em *E. maxima*, após 3 horas do início da esporulação o citoplasma começa a contrair. Às 12 horas inicia-se a formação dos esporoblastos e entre 21 e 30 horas de esporulação há maturação do esporocisto e formação do esporozoíto (Pittilo e Ball, 1985).

As variações fenotípicas das amostras estão intimamente relacionadas à variabilidade genética decorrente da divisão meiótica que ocorre durante a esporulação. Esta divisão permite a recombinação dos cromossomos homólogos e a divisão reducional para formar os esporozoítos haplóides (Del Cacho et al., 2010).

Em *Eimeria* spp, os estudos relacionados a este processo são extremamente limitados, uma vez que a meiose ocorre exclusivamente nos oocistos (Canning e Anwar, 1968; Del Cacho et al., 2005). Inicialmente, acreditava-se que não ocorria a recombinação gênica, de forma que a meiose em *Eimeria* spp. poderia ser o resultado do pareamento dos cromossomos homólogos não duplicados e a variação individual era devido à combinação aleatória dos cromossomos (Canning e Anwar, 1968). Porém mais tarde, após o mapeamento de ligação gênica em *E. tenella* foi demonstrado que há recombinação durante a meiose (Shirley e Harvey, 2000; Shirley et al., 2004a).

Recentemente, descrições da dinâmica e comportamento dos cromossomos durante a prófase I da meiose de *E. tenella* têm sido realizadas, contribuindo para o entendimento da biologia do parasita (Del Cacho et al., 2008; Del Cacho et al., 2010).

Apesar dos oocistos serem fundamentais para a ocorrência da coccidiose aviária, os mecanismos moleculares envolvidos no processo de esporulação, bem como o perfil da expressão gênica durante este processo são pouco estudados e conhecidos. A esporogonia é uma interessante fase do ciclo de vida para o estudo da expressão gênica, pois além de ocorrer *in vitro*, sem a interferência do hospedeiro, pode ser realizada sob condições controladas, diferentes amostras podem ser retiradas e analisadas a qualquer momento da esporulação e além disso, RNAm e proteínas podem ser extraídos sem contaminação com debris ou material proveniente das células hospedeiras.

Estudos moleculares em *E. maxima* e *E. tenella* têm demonstrado variações na transcrição gênica ao longo da esporulação (Wang e Stotish, 1975; Ellis e Thurlby, 1991).

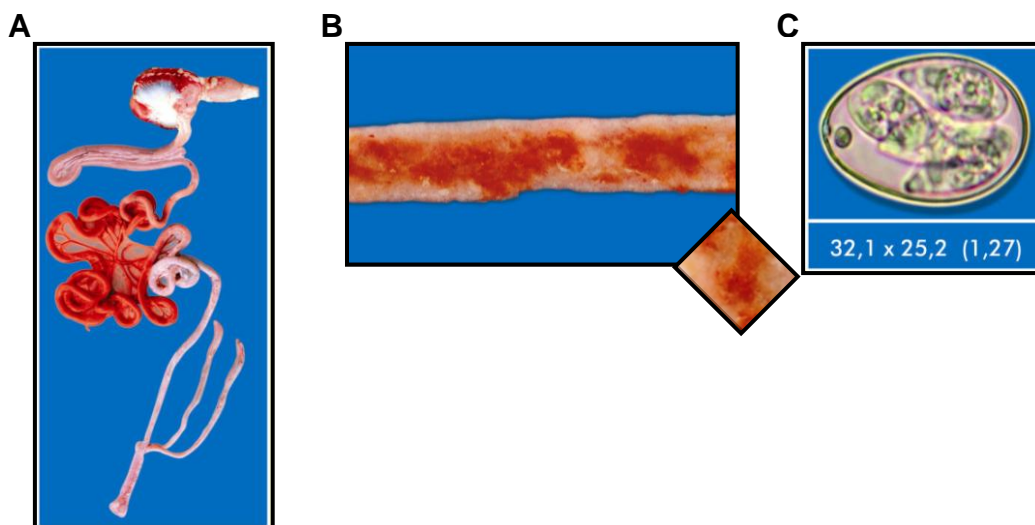
Até o momento, vários genes foram descritos em oocistos de *Eimeria* spp. nas diferentes fases da esporulação: MOP, proteína de oocisto (Fetterer e Barfield, 2003); eimepsina (Laurent et al., 1993; Jean et al., 2001a; Miska et al., 2004); profilina (Fetterer et al., 2004); proteína quinase dependente de ciclina de *E. tenella*, EtCRK2 (Kinnaird et al., 2004); aminopeptidase N (Miska et al., 2004; Fetterer et al.,

2005); serino proteases (Fetterer et al., 2007b); serpina (Miska et al., 2004; Fetterer et al., 2008); antígeno SO7 (Fetterer et al., 2007a); proteína associada ao corpo refrátil (Abrahamsen et al., 1994); proteína de choque térmico 70, HSP70 (Del Cacho et al., 2001); proteína de choque térmico 90, HSP90 (Clark et al., 1996; Miska et al., 2005; Péroval et al., 2006); proteínas de micronema (Ryan et al., 2000; Miska et al., 2004); proteínas rombóides; prolil endopeptidase; transhidrogenase; proteína quinase, (Miska et al., 2004); manitol-1-fosfato-desidrogenase (Schmatz, 1997; Allocco et al., 1999); manitol-fosfatase (Liberator et al., 1998), fator depolimerizante de actina; actina (Xu et al., 2008) e lactato desidrogenase (Schaap et al., 2004).

#### **1.4 *Eimeria maxima***

*Eimeria maxima* é uma das espécies de *Eimeria* de galinha doméstica mais patogênicas que, além de ser comumente observada, apresenta ampla distribuição mundial (Schwarz et al., 2010). Foi descrita pela primeira vez por Tyzzer em 1929, quando estudava isolados do intestino delgado de galinhas domésticas com enterite.

Os parasitas da espécie *E. maxima* infectam a porção média do intestino delgado, principalmente jejuno e íleo. As infecções podem causar distensão das alças intestinais, má absorção de carotenóides e lesões do tipo petéquias na mucosa intestinal (Gregory, 1990; Shirley, 1995), Figura 7 A e B.



**Figura 7- *Eimeria maxima*:** sítio da lesão intestinal, lesão macroscópica e oocisto. (A) O intestino delgado, destacado em vermelho representa o sítio de colonização desta espécie, (B) lesões petequiais podem ser visualizadas na mucosa, (C) oocisto de *E. maxima*, com as medidas de tamanho referentes ao diâmetro maior e menor e a razão entre eles que está entre parênteses.  
 FONTE: Pôster de divulgação: “Entendendo e Controlando a Coccidiose aviária”, Fotografia: Arthur Gruber. Patrocínio Biovet. Edição geral Oswaldo Gessulli Neto (Gessulli Agribusiness), com permissão.

A *E. maxima* apresenta grande variabilidade imunogênica entre cepas o que muitas vezes não confere proteção cruzada (Long e Millard, 1979; Fitz-Coy, 1992; Martin et al., 1997; Barta et al., 1998; Allen et al., 2005; Blake et al., 2005). Desta forma, para conferir uma boa proteção, algumas vacinas produzidas contra *Eimeria* contém mais de uma cepa de *E. maxima* (Long e Millard, 1979; Barta et al., 1998).

O ciclo de vida desta espécie foi primeiramente estudado por Tyzzer (1929). O período de pré-patência é de 5 a 6 dias. Após a infecção, os esporozoítos infectam as células epiteliais das vilosidades do duodeno e do íleo e após 4 a 5 dias, os esquizontes podem ser visualizados na mucosa intestinal. Os esquizontes localizam-se ao redor do núcleo da célula hospedeira, são pequenos (10 µm de comprimento por 8 µm de largura) e contém de 8 a 16 merozoítos. Após o rompimento dos esquizontes e lise celular há liberação dos merozoítos de primeira geração que infectam novas células intestinais. Em *E. maxima* há duas gerações de esquizontes. Os merozoítos de segunda geração invadem células intestinais da zona subepitelial e diferenciam-se em macro ou microgametócitos, os quais, são encontrados abaixo do núcleo da célula hospedeira. Os microgametócitos medem entre 30 e 39 µm por 22 e 33 µm e contém um grande número de microgametas

biflagelados. Os macrogametas são menores medindo em média 19 por 15  $\mu\text{m}$  (Long, 1959). Após a fertilização dos macrogametas há a produção do zigoto e formação dos oocistos.

Muitos dos danos causados por *E. maxima* estão relacionados à uma localização mais profunda dos estágios sexuais (macrogametas e microgametas) na mucosa intestinal (Tyzzer, 1929; Brackett e Bliznick, 1950; Long, 1959; Levine, 1961).

Inicialmente, acreditava-se que o número máximo de oocistos produzidos para cada oocisto ingerido era de aproximadamente 12.000 (Brackett e Bliznick, 1950), porém mais tarde foi observado que a taxa de produção de oocistos varia em função da idade da ave, da quantidade e tempo de estocagem do inóculo (Long, 1959).

Os oocistos de *E. maxima* tem forma ovóide, parede lisa ou ligeiramente rugosa de coloração amarelada (Levine, 1961) e tamanho médio variando entre 30,86 a 32,1  $\mu\text{m}$  de comprimento por 23,29 a 25,2  $\mu\text{m}$  de largura (Tyzzer, 1929; Long, 1959; Castañón, 2006), Figura 7C. Os oocistos apresentam grânulos polares e os resíduos são ausentes. Os esporocistos são alongados, com tamanho médio entre 15 e 19  $\mu\text{m}$  de comprimento por 8 a 9  $\mu\text{m}$  de largura, apresentam corpúsculo de Stieda e não apresentam resíduos (Levine, 1961). Os esporozoítos têm tamanho médio de 19  $\mu\text{m}$  de comprimento por 4  $\mu\text{m}$  de largura (Long, 1959; Levine, 1961).

O processo de esporulação de oocistos ocorre em aproximadamente 72 horas quando incubados a 28 °C sob oxigenação constante. Interessante notar que alguns oocistos já são infectivos após 30 horas de incubação (Edgar, 1955; Long, 1959).

Os estudos relacionados à *Eimeria maxima* são importantes por quatro razões: ampla distribuição mundial, alta imunogenicidade (Rose e Long, 1962; Blake et al., 2005; Schwarz et al., 2010); altos níveis de variação imunogênica quando comparada a outras espécies de *Eimeria* spp. (Barta et al., 1998; Lew et al., 2003; Schwarz et al., 2009; Schwarz et al., 2010) e pouco se sabe sobre a expressão gênica em *E. maxima* (Smith et al., 1994; Witcombe et al., 2003; Schwarz et al., 2010).



## 1.5 Caracterização do genoma de *Eimeria* spp

O genoma nuclear de *Eimeria* spp. é haplóide durante a maior parte do ciclo de vida deste parasita, com exceção do oocisto não esporulado que é diplóide.

O cariótipo do genoma nuclear de *E. tenella* (Shirley e Harvey, 2000) e *E. maxima* (Blake et al., 2011), foram determinados por PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*, eletroforese de campo pulsado). O genoma de ambas as espécies apresenta uma complexidade entre 55 e 60 Mpb e está organizado em 14 cromossomos com tamanho variando entre 1 e 7 Mpb em *E. tenella* (Shirley e Harvey, 2000) e 1,9 Mpb a >6 Mpb em *E. maxima* (Blake et al., 2011). Em *E. tenella* o conteúdo GC é de 53% (Shirley, 2000).

O genoma da cepa H de *E. tenella* foi sequenciado empregando a abordagem *shotgun* com uma cobertura de 8,4 vezes (Ling et al., 2007). Os dados estão publicamente disponíveis no sítio do Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/eimeria-tenella.html>). O genoma de *E. maxima* foi sequenciado com cobertura de 12 vezes e aproximadamente 75% do genoma está predito. Os dados estão disponíveis no sítio do Instituto GENOMalaysia (<http://www.genomemalaysia.gov.my/emaxdb/>)

O genoma de *E. tenella* contém repetições de trinucleotídeos GCA/TGC que podem estar presentes em sequências codificadoras e não codificadoras. A importância destes trinucleotídeos ainda não é conhecida (Shirley, 1994; Shirley, 2000; Shirley et al., 2004b). Outra repetição comum é o heptâmero TTTAGGG encontrado frequentemente em repetições seriadas de regiões não codificantes. Apesar de ser semelhante a uma sequência telomérica, não há evidências de que estas sequências estejam nos telômeros dos cromossomos de *Eimeria* spp. (Shirley, 2000; Shirley et al., 2004b).

Em paralelo, os cromossomos 1 e 2 de *E. tenella* foram totalmente sequenciados e apresentam uma complexidade de 1Mpb e 1,2Mpb respectivamente (Ling et al., 2007). O cromossomo 1 possui uma organização genômica incomum segmentada em regiões R (*feature-rich*), ricas em repetições, apresentando elementos similares a transposons e repetições teloméricas, confirmando estudos preliminares que apontavam para uma distribuição frequente de regiões repetitivas no genoma de *Eimeria tenella* (Shirley, 2000; Shirley et al., 2004a). Também

apresenta segmentos livre de repetições P (*feature-poor*) (Ling et al., 2007). Ambos os segmentos P e R podem ser identificados no genoma de *E. maxima*, embora sejam menos distintos do que os encontrados no cromossomo 1 de *E. tenella* (Blake et al., 2011).

A análise do mapa de ligação gênica em *E. maxima* mostrou que a distribuição das repetições dos trinucleotídeos CAG e seus isômeros associados é altamente relacionada aos segmentos R. Nestes segmentos o conteúdo AT é maior e há um maior nível de variação das repetições (Blake et al., 2011).

Além do genoma nuclear, estão presentes nestes parasitas dois genomas extracromossômicos: o mitocondrial e o do apicoplasto ou plastídeo.

O genoma mitocondrial tem alta composição de bases A/T, cerca de 65%, é constituído de concatêmeros lineares contendo unidades repetitivas de 6kb, sendo composto apenas de três genes estruturais: citocromo b, citocromo oxidase 1 e citocromo oxidase 3 e oito fragmentos de RNA ribossômico, os quais apresentam-se truncados e espalhados ao longo do genoma (Chapman e Shirley, 2003; Romano, 2004).

O apicoplasto, organela exclusiva dos organismos do Filo Apicomplexa, possui um genoma circular de aproximadamente 35 kb (Cai et al., 2003) e tem alta composição de bases A/T, cerca de 79,4% (Cai et al., 2003). O genoma contém entre 30 e 50 genes constitutivamente expressos que são geralmente relacionados à transcrição e tradução (Wilson et al., 1996; Fleige et al., 2010).

## **1.6 Transcriptoma**

Há muitas décadas, o estudo da correlação entre a função gênica e seus padrões de expressão têm sido de grande interesse para diferentes ramos da biologia (Morozova et al., 2009).

Um dos pontos mais intrigantes da biologia molecular está relacionado ao fato de que células com mesmo mapa genético conseguem desempenhar funções distintas. Esta diversidade fenotípica tem sido associada à expressão de conjuntos de genes de diferentes funções (Morozova et al., 2009).

Os primeiros estudos de expressão gênica eram realizados em várias etapas, as quais compreendiam identificação das unidades transcricionais, mensuração dos níveis de expressão, estudo da diversidade transcricional (isoformas, transcrição alternativa, códon de iniciação e sítios de poliadenilação) e os fatores envolvidos na transcrição (Liu, 2005).

O advento de novas técnicas de estudo da expressão gênica iniciou uma nova era na biologia, pois ao invés de avaliar os genes individualmente, estas técnicas analisam o transcriptoma como um todo, o que tem permitido conhecer as alterações gênicas que ocorrem em diferentes condições biológicas ou mesmo patológicas, como os mecanismos moleculares envolvidos na relação entre o patógeno e o hospedeiro (Brady et al., 2006).

#### 1.6.1 Metodologias utilizadas para a análise do transcriptoma

Os métodos para análise da expressão gênica evoluíram rapidamente em poucos anos (Morozova et al., 2009), Tabela 1.

**Tabela 1-** Registro dos principais marcos para o estudo do transcriptoma

Ano	Registro
1965	Primeiro sequenciamento da molécula de RNA
1977	Desenvolvimento da técnica de <i>Northern blot</i> e do método de sequenciamento de Sanger.
1989	Relatos da técnica RT-PCR para análise do transcriptoma
1991	Sequenciamento de EST em larga escala
1992	Introdução da técnica de <i>Differential Display</i> (DD) para a descoberta de genes diferencialmente expressos.
1995	Relatos das técnicas de <i>microarray</i> e de SAGE ( <i>Serial Analysis of Gene Expression</i> )
2005	Primeira técnica de sequenciamento de nova geração (454/Roche) disponível no mercado
2006	Primeiro estudo de sequenciamento do transcriptoma utilizando sequenciadores de nova geração (454/Roche)

Fonte: Adaptada de Morozova et al. (2009).

O primeiro estudo do transcriptoma em larga escala foi publicado em 1991. Este trabalho avaliou um subconjunto de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) provenientes de genes expressos de cérebro humano (Adams et al., 1991). Desde então, milhares de sequências de ESTs têm sido geradas para diferentes células, tecidos ou estágios de diversos organismos (Nagaraj et al., 2007). Estes estudos têm contribuído significativamente para a identificação de novos genes, determinação de regiões codificadoras de sequências genômicas, mapeamento físico, bem como análise do perfil de expressão gênica (Sterky e Lundeberg, 2000).

Para a construção das bibliotecas de ESTs, os cDNA são selecionados aleatoriamente e submetidos a um sequenciamento de uma única fita, gerando sequências curtas de aproximadamente 100-700 pb que podem ser obtidas a partir de um tecido ou estágio específico de desenvolvimento de um organismo. Para a construção de bibliotecas convencionais, as ESTs são obtidas a partir da região 5' ou 3' dos transcritos, utilizando-se adaptadores que permitem a clonagem unidirecional. Em bibliotecas direcionais 5', o sequenciamento apresenta maior cobertura de regiões codificadoras dos transcritos. Entretanto, as construções das bibliotecas direcionais 3' geralmente resultam na identificação das porções não traduzidas que apresentam maior variabilidade do que as regiões codificadoras, permitindo a identificação inequívoca destes transcritos, facilitando a obtenção de um perfil de transcrição quantitativo (Gruber, 2007).

Outra técnica também utilizada é a construção de bibliotecas de hibridização subtrativa. Esta metodologia permite reduzir a representatividade de transcritos já estudados, enriquecendo o conhecimento de padrões de expressão gênica de diferentes células, tecidos ou estágios (Gruber, 2007). Foi primeiramente utilizada na década de 80, para estudar a expressão gênica em gástrula de *Xenopus laevis* (Sargent e Dawid, 1983; Moody, 2001). Alguns anos mais tarde, esta técnica foi aprimorada sendo denominada de *Supression Subtractive Hybridization* (SSH). Além da subtração, esta técnica também permite a normalização da biblioteca (Diatchenko et al., 1996). Para a construção desta biblioteca os genes diferencialmente expressos são isolados após a hibridização de duas bibliotecas de cDNAs: uma amostra em excesso, ou seja amostra alvo da subtração (teste) e uma segunda amostra, que é a amostra controle. Os fragmentos semelhantes anelam-se, enquanto os diferencialmente expressos permanecem em fita única (*single-stranded*), podendo ser identificados (Gruber, 2007).

A geração de *fingerprinting* de RNA também foi uma das primeiras abordagens de estudo de genes diferencialmente expressos, incluindo o *Differential Display* (DD) (Liang e Pardee, 1992) e o RNA *fingerprinting by arbitrary primed* PCR (RAP\_PCR) (Welsh et al., 1992). Ambos os métodos são baseadas na amplificação aleatória de subconjuntos de genes a partir de duas ou mais amostras de RNA (Moody, 2001).

O DD (*Differential Display*) é um método baseado na transcrição do RNAm utilizando oligo dT *primers*, *primers* ancorados ou *primers* arbitrários. Os cDNAs das diferentes amostras são separados em gel de poliacrilamida, clonados e sequenciados. A intensidade das bandas indica o nível de transcrição gênica. Além de identificar os genes diferencialmente expressos nos tecidos, células ou estágios, esta metodologia permite a comparação simultânea de várias amostras. Entretanto, este método não é quantitativo e falsos positivos podem ocorrer (Moody, 2001).

A avaliação da expressão gênica utilizando dados de *microarray* foi originalmente descrita da década de 90 em um estudo de transcriptoma de *Arabidopsis thaliana* (Schena et al., 1995). Um *microarray* é tipicamente definido como um arranjo pré-definido de moléculas ou fragmentos de DNA, cDNAs ou oligonucleotídeos quimicamente ligadas por ligações covalentes a uma superfície sólida ou à uma membrana (carregada positivamente). Este método baseia-se na hibridização entre as sondas que compõem estes microarranjos com o gene ou molécula de interesse. A ligação dos alvos marcados com fluoróforos permite a detecção e quantificação relativa das moléculas hibridizadas (Dufva, 2009). A expressão relativa de cada gene representado no *microarray* é avaliada pela comparação da intensidade de sinais de hibridização entre as amostras controle e experimental. Um dos aspectos mais interessantes é possibilidade de estudo de um grande conjunto de genes (3000 a 10000 genes) (Moody, 2001), no entanto, é necessário um conhecimento prévio das sequências a serem estudadas (Green et al., 2001). Por se tratar de um método de hibridização são necessárias replicatas experimentais, hibridizações cruzadas podem ocorrer e os dados de fluorescência somente detectam a presença ou ausência das moléculas hibridizadas (Dufva, 2009). Desta forma, a escolha correta das sondas é de fundamental importância para o sucesso do experimento, bem como, a realização de complexa análise estatística para a correta interpretação dos dados (Dufva, 2009). Os *microarrays* mais conhecidos são os de cDNA (Schena et al., 1995), de oligonucleotídeos (Pease

et al., 1994) e os *Affymetrix chips*, que são lâminas para hibridização comercialmente disponíveis ([www.affymetrix.com/index.affx](http://www.affymetrix.com/index.affx)).

Outros métodos de análise de expressão gênica construídos a partir de pequenas sequências (*tags*) foram também desenvolvidos incluindo, SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), MPSS (*Massive Parallel Signature Sequencing*), PETs (*Paired-end diTagging*), CAGE (*Cap Analysis Gene Expression*), RNA-seq e ORESTES (*Open Reading Frame Expressed Sequence Tags*).

SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) e suas variações são considerados métodos de perfil de expressão digital, pois os dados de expressão gênica obtidos são analisados utilizando-se a contagem dos transcritos. A expressão dos transcritos é medida em termos absolutos, permitindo uma análise global da expressão gênica. Esta técnica foi criada na década de 90 (Velculescu et al., 1995) com a finalidade de obter perfis de expressão gênica e baseia-se no conceito de que pequenas *tags* são suficientes para identificar a transcrição de diferentes genes. Cada *tag* é gerada a partir da transcrição de RNAm, por uma digestão enzimática em um local pré-definido (Moody, 2001), logo após, as *tags* são concatenadas, sequenciadas e quantificadas (Tuteja e Tuteja, 2004). Cada *tag* representa uma sequência expressa e a contagem da mesma é diretamente proporcional à sua frequência em uma dada população de RNAm (Dinel et al., 2005). Uma das vantagens desta técnica é a possibilidade de gerar dados quantitativos (Moody, 2001), além de permitir a descoberta de novos transcritos (Rivals et al., 2007) e transcritos de baixa abundância (Chen et al., 2002; Kim et al., 2006). Entretanto, por gerar sequências curtas (entre 14 e 21pb), a identificação das *tags* e montagem dos transcritos pode ser prejudicada (Morozova et al., 2009). Além disso, devido à utilização de enzimas específicas para gerar as bibliotecas, alguns transcritos podem não estar representados (Moody, 2001).

Similar à técnica de SAGE, a metodologia MPSS (*Massive Parallel Signature Sequencing*) (Brenner et al., 2000) é baseada na produção de sequências curtas (16-20 bases) adjacentes ao sítio de restrição da enzima *DpnII* mais próximo à extremidade 3' do RNAm (Liu, 2005). Este método combina clonagem e amplificação de cDNA na superfície de milhares *microbeads* à uma alta capacidade de sequenciamento de DNA não baseado em gel. Cada corrida pode gerar cerca de 250.000 – 400.000 sequências. Como esta tecnologia é baseada em instrumentos sofisticados e protegida por direitos autorais, seu custo é elevado, sendo disponível

apenas comercialmente, inicialmente pela *Lynxgengen Therapeutica, Inc.* e, posteriormente pela *Solexa Inc.* que encerrou esta prestação de serviço em 2006.

Outra abordagem similar as descritas anteriormente é o CAGE (*Cap Analysis Gene Expression*), sendo descrita pela primeira vez em 2003 (Shiraki et al., 2003). Esta técnica é capaz de mensurar o nível de expressão gênica em larga escala pelo isolamento e sequenciamento de *tags* geradas a partir da extremidade 5' dos transcritos de RNAm (Hoon e Hayashizaki, 2008). Além disso, este método também possibilita a identificação dos promotores responsáveis pela transcrição do RNAm (Shiraki et al., 2003).

Na metodologia PET (*Paired-End diTagging*), *tags* pareadas são extraídas das extremidades dos fragmentos do cDNA, clonadas e sequenciadas em larga escala (Fullwood et al., 2009). A avaliação da expressão gênica é feita de forma digital, onde cada *tag* representa uma sequência expressa. Como as *tags* são pareadas, os transcritos obtidos podem ser mais facilmente mapeados (Ng et al., 2007).

A técnica de RNAseq é baseada no sequenciamento massivo de bibliotecas de pequenos ESTs, sendo possível gerar milhões de sequências de 30 a 400 nucleotídeos, dependendo da tecnologia de sequenciamento utilizada (Wang et al., 2009). Para tanto, uma população de RNA (total ou poliA+) é convertida numa biblioteca de fragmentos de cDNA empregando adaptadores que se ligam à uma ou ambas as extremidades. Cada molécula com ou sem etapa de amplificação é sequenciada em sequenciadores de última geração de forma a se obter pequenas sequências de uma extremidade (*single-end sequencing*) ou das duas extremidades (*pair-end sequencing*). As leituras são mapeadas contra o genoma ou transcriptoma e o nível de transcrição pode ser deduzido a partir do número de leituras encontradas para cada gene (Wang et al., 2009). Porém, nesta metodologia, as informações sobre o direcionamento das fitas podem se perdidas prejudicando o mapeamento das sequências geradas, principalmente quando os transcritos *sense* e *antisense* estão sobrepostos. Além disso, para o correto mapeamento das leituras é necessário um conhecimento prévio do genoma ou do transcriptoma (Cloonan e Grimmond, 2008).

Outra metodologia, também, aplicável para obtenção de um transcriptoma é o ORESTES (*Open Reading Frame ESTs*) a qual foi utilizada neste trabalho.

A técnica de ORESTES (*Open Reading Frame ESTs*) baseia-se na construção de mini bibliotecas utilizando *primers* arbitrários e PCR de baixa estringência para amplificação dos cDNA, gerando perfis de expressão gênica (Dias Neto et al., 2000). Como cada *primer* atua tanto como *primer forward* e *reverse*, há uma maior cobertura da região central da sequência dos RNAs mensageiros, a qual contém a maior parte da porção codificadora dos genes. Como estas bibliotecas são normalizadas, aumenta-se a probabilidade de detecção de transcritos raros (Gruber, 2007).

O primeiro trabalho utilizando esta metodologia foi realizado em 2000. Foram geradas 10.000 sequências do tipo ORESTES provenientes de tumor de mama humano. Além de contribuir com a descoberta de novas sequências, os resultados mostraram que a maior parte (71%) dos transcritos era de baixa abundância sendo encontrados preferencialmente na região codificante do gene (Dias Neto et al., 2000).

Após este estudo, diversos trabalhos visando a detecção de novos genes ou o estudo da expressão gênica diferencial em diversos tecidos (normais ou tumorais) ou em células de humanos foram realizados. Dentre estes podemos citar a identificação de genes presentes no cromossomo 22 de células provenientes de vários tumores humanos (de Souza et al., 2000); estudos comparativos da expressão gênica em células normais e tumorais da próstata (Sarkis, 2000; Fonseca et al., 2006), de mama (Leerkes et al., 2002; Nagai et al., 2004; Fonseca et al., 2006), da tireóide (Arnaldi et al., 2005) e de diferentes tecidos (Camargo et al., 2001; Brentani et al., 2003; Mello et al., 2009); identificação de genes relacionados à síndrome tricorinofalangiana do tipo I em pacientes com câncer de mama (Radvanyi et al., 2005); estudos comparativos da expressão gênica obtida por ESTs e ORESTES em células humanas (Sakabe et al., 2003), bem como identificação em larga escala de genes presentes em queratinócitos granulares humanos (Toulza et al., 2007).

Estudos do transcriptoma utilizando a metodologia ORESTES foram também realizados para outros organismos, como *Bos indicus* e *Bos taurus* (da Mota et al., 2004); *Apis mellifera* (Nunes et al., 2004); *Drosophila melanogaster* (Maia et al., 2007), em ratos como modelo de estudo da epilepsia (Avedissian et al., 2007) e em *Biomphalaria glabrata* (Lockyer et al., 2007; Hanelt et al., 2008; Lockyer et al., 2008).



A expressão gênica empregando ORESTES também foi estudada em larga escala para parasitas como *Paracoccidioides brasiliensis* (Garcia et al., 2010); *Trypanosoma rangeli* (Snoeiijer et al., 2004; Grisard et al., 2010); *Taenia solium* (Almeida et al., 2009) e *Schistosoma mansoni* (Fietto et al., 2002; Verjovski-Almeida et al., 2003).

#### 1.6.2 Transcriptoma de Apicomplexa

Há uma grande quantidade de estudos do transcriptoma de diferentes estágios evolutivos de parasitas do filo Apicomplexa (Wastling et al., 2009).

Os bancos de dados dbEST (Boguski et al., 1993), EuPathDB (Aurrecoechea et al., 2007), NCBI dbEST, ApiEST-DB (Li et al., 2004b) e Full-Parasires (<http://fullmal.hgc.jp/>) (Tuda et al., 2010) tem uma grande quantidade de sequências ESTs relacionadas à expressão gênica de parasitas do Filo Apicomplexa, dentre estes, *Babesia bovis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium muris*, *Neospora caninum*, *Plasmodium berguei*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium yoelli*, *Plasmodium vivax*, *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria maxima* e *Eimeria tenella*.

A análise do transcriptoma de parasitas do Filo Apicomplexa tem sido realizada empregando várias metodologias, tais como SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) para *P. falciparum* (Munasinghe et al., 2001), *T. gondii* (Radke et al., 2005) e *Eimeria tenella* (Novaes, 2009); *microarray* para *P. falciparum*, *P. berguei* e *T. gondii* (EuPathDB - <http://eupathdb.org>) e MPSS (*Massively Parallel Signature Sequencing*) para *Theileria annulata* (Bishop et al., 2005) e *Theileria parva* (Shah et al., 2006).

### 1.6.3 Transcriptoma de *Eimeria* spp.

A *Eimeria* apresenta um ciclo de vida complexo, envolvendo vários estágios de desenvolvimento, tais como, fases de proliferação que são críticas para a patogênese no hospedeiro e o ciclo sexual que é de suma importância para a transmissão, dispersão e geração da diversidade genética (Schmatz, 1997; Belli et al., 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre os conjuntos de genes mais importantes e expressos nestes estágios do ciclo evolutivo.

Vários projetos para geração de ESTs de *Eimeria* de galinha doméstica abordando diferentes estágios do ciclo de vida destes parasitas foram realizados. Até o momento foram depositadas no *GenBank* aproximadamente 39.454 sequências ESTs (*Expressed Sequence Tags*), das quais cerca de 88,7% são de *E. tenella*, 6,9% de *E. maxima* e 3,6% são de *E. acervulina*. Dentre os estágios evolutivos estudados, os merozoítos e esporozoítos são os mais freqüentes, representando quase 75% do total de sequências ESTs depositadas até o momento.

Grande parte das sequências ESTs disponíveis são provenientes da parceria WashU-Merck estabelecida entre a *Washington University* e a Merck que produziu 27,500 ESTs de *E. tenella*. Cerca de 1.000 sequências foram produzidas pela *University Kebangsann Malaysia* (Wan et al., 1999; Ng et al., 2002) e 499 ESTs foram geradas a partir de oocistos esporulados e não esporulados pelo USDA (*United States Departamento of Agriculture*) (Miska et al., 2004). *Welcome Trust Sanger Institute* gerou mais de 8.000 ESTs de oocistos não esporulados, esporozoítos e merozoítos de primeira geração (dados não publicados).

Além destas ESTs convencionais, o nosso grupo, como parte integrante do Consórcio Internacional do Genoma de *E. tenella* foi responsável pelo sequenciamento de mais de 15.000 ESTs do tipo ORESTES (*Open Reading Frame EST*) para cada uma das três principais espécies de *Eimeria* de galinha doméstica: *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*.

O primeiro estudo de expressão gênica em larga escala de *Eimeria* de galinha doméstica foi realizado na década de 90. Foram analisados cerca de 500 ESTs provenientes de merozoítos de segunda geração de *E. tenella*. Observou-se que 47,7% das proteínas eram similares a proteínas encontradas na base de dados, entre as quais, proteínas de ribossomo, quinases, oxidases, desidrogenases,

sintetases, entre outras, e um grupo remanescente de ESTs de proteínas putativas de funções diversas. Das sequências geradas, 14,3% eram semelhantes a genes previamente identificados em *E. tenella*. As sequências mais abundantes eram similares a proteínas envolvidas com o processo invasivo (Wan et al., 1999).

Estudo muito similar foi realizado pelo mesmo grupo, onde foram analisados 556 ESTs provenientes de esporozoítos de *E. tenella*. Apenas 27,3% das sequências obtidas apresentaram resultados de BLAST positivo, dentre estas, 22,5% eram genes nunca relatados em *E. tenella*. Após busca por similaridade por BLAST foi observado que esporozoítos e merozoítos apresentavam padrões distintos, denotando transcrição estágio específica. A maior parte dos transcritos de esporozoítos era associada ao crescimento celular, divisão celular e síntese de DNA, enquanto que, os transcritos de merozoítos estavam envolvidos com a expressão de genes e proteínas (Ng et al., 2002).

Padrão semelhante foi observado por Li et al. (2003), após a análise de mais de 55.000 ESTs de organismos do Filo Apicomplexa incluindo cerca de 13.500 ESTs provenientes de *Eimeria tenella* depositadas no banco de dados dbEST/GenBank. Estes autores observaram que 80% das sequências provenientes de esporozoítos e merozoítos de *Eimeria tenella* era estágio-específica. Similar proporção de transcritos estágio-específicos foi encontrada quando formas assexuais de *Plasmodium falciparum* foram analisadas (Li et al., 2003).

Um estudo mais recente também relatou que a expressão dos genes de esporozoítos e merozoítos de *E. tenella* é estágio específica. Após a geração de 35000 tags empregando SAGE foi observado que em merozoítos, grande parte dos produtos proteicos diferencialmente expressos estava relacionada à tradução, modificação e manutenção da conformação das proteínas e processos de ligação. Enquanto que em esporozoítos, os transcritos eram similares a histonas, proteínas associadas a transporte e atividade catalítica (Novaes, 2009).

Diferentemente do relatado em *E. tenella*, para *E. bovis* um estudo empregando *DD* (*Differential display*) demonstrou que grande parte dos transcritos de esporozoítos e merozoítos de primeira geração são compartilhados entre si (Abrahamsen et al., 1995).

Em *E. acervulina* o perfil transcricional de merozoítos de segunda geração foi também estudado. Após a montagem e análise de 1847 ESTs, foi observado que 29% das sequências geradas eram semelhantes às sequências presentes na bases

de dados de ESTS (dbEST). Dentre estas, a maioria era similar a proteínas hipotéticas, proteínas ribossômicas, proteínas envolvidas no metabolismo, replicação do DNA, transcritos, chaperonas e proteína de choque térmico (Miska et al., 2008).

Demais trabalhos avaliando a expressão de esporozoítos e esquizontes de primeira geração em *E. tenella* (Refega et al., 2003), bem como busca de possíveis candidatos vacinais em ESTs de esporozoítos e merozoítos de segunda geração desta mesma espécie (Klotz et al., 2005) foram também realizados. Entretanto há poucos trabalhos que estudam a expressão gênica em outras fases do ciclo de vida, como por exemplo, oocistos.

O primeiro artigo publicado sobre a expressão gênica em larga escala em oocistos de *Eimeria* foi realizado em 1993. Ao estudar *E. bovis*, os autores mostraram que o nível de transcrição de determinados genes varia ao longo da esporulação (Abrahamsen et al., 1993).

Em *E. tenella* também foi verificado que a transcrição de genes é diferente entre oocistos esporulados e não esporulados. Após a análise comparativa de ESTs de oocistos com os provenientes de esporozoítos e merozoítos depositados no *GenBank*, foi verificado que a metade dos transcritos de oocistos esporulados era também expressa em esporozoítos e merozoítos, enquanto que para oocistos não esporulados, 79% dos transcritos não foram detectados em outros estágios de desenvolvimento. Segundo os autores, não é surpresa que oocistos esporulados compartilhem semelhanças aos estágios invasivos, já que cada oocisto esporulado contém 8 esporozoítos no seu interior. Após análise de similaridade empregando o programa BLAST foi verificado que a maioria dos transcritos de oocistos esporulados era codificante para proteínas de micronema (Miska et al., 2004).

Proteínas de micronema, bem como proteína da família BT1 e proteínas ribossomais também foram observadas em transcritos obtidos de bibliotecas de cDNA de oocistos não esporulados, oocistos esporulados, esporozoítos e merozoítos (Wang et al., 2007).

O perfil de expressão gênica de oocistos não esporulados, oocistos esporulados e esporozoítos de *E. tenella* também foi estudado empregando hibridização subtrativa (SSH) e *microarray*. Foi observado que a maioria dos genes diferencialmente expressos era relacionada ao processo de esporulação, invasão

celular, interação parasita-hospedeiro, metabolismo celular, imunoregulação, tradução de sinal e regulação do ciclo celular (Han et al., 2010).

#### 1.6.4 Transcriptoma de *Eimeria maxima*

Há poucos estudos sobre a expressão gênica nas diferentes fases do ciclo de vida de *E. maxima*.

O primeiro trabalho que avaliou a expressão gênica em larga escala em *E. maxima* foi realizado em 2006 por Basak e colaboradores. Estes autores empregaram DD (*Diferencial display*) com o objetivo de analisar o perfil transcricional de oocistos de duas cepas imunologicamente distintas, em diferentes fases da esporulação. Apesar de muitos transcritos estarem presentes em ambas as cepas e nos diferentes estágios estudados, foi verificado que um dos genes era transcrito somente numa das cepas independentemente da fase estudada (Basak et al., 2006).

Com o objetivo de realizar estudos comparativos entre cepas precoces e parentais de *E. maxima*, foi realizada uma análise da expressão gênica de oocistos esporulados de ambas as linhagens utilizando *Supression Subtractive Hybridization* (SSH). Um total de 360 ESTs foi obtido, destes, 21 genes eram mais transcritos na linhagem parental e 11 nas linhagens precoces. A maioria dos genes diferencialmente expressos era similar às proteínas relacionadas com invasão, mudança de estágio de desenvolvimento, esporulação, infectividade, virulência e resistência à drogas (Dong et al., *in press*).

Recentemente, o transcriptoma de *E. maxima* foi estudado a partir de um total de 3.168 ESTs de merozoítos que ao serem montados, resultaram em 416 *contigs* e 964 *singlets*. Após a anotação automática, 48,2% dos transcritos eram semelhantes às proteínas já descritas para organismos do Filo Apicomplexa, principalmente *Eimeria* spp. A maioria destas proteínas era relacionada à tradução, citoesqueleto, glicólise, proteínas de superfície, proteínas de sinalização, transporte, dobramento de proteína (*foldng*), metabolismo e proteínas de micronema. Estudos comparativos entre os transcriptomas das três espécies de *Eimeria* de galinha mais relevantes (*E. maxima*, *E. acervulina* e *E. tenella*) mostrou que há transcritos parcialmente, ou até

mesmo não compartilhados entre estas espécies. Dentre os transcritos mais abundantes, diferentes antígenos de superfície e uma proteína hipotética foram detectados nas três espécies de *Eimeria*. Ainda dentro deste grupo, duas proteínas (GAPDH 1 e antígeno de superfície MZ92/120) foram observadas em duas espécies de *Eimeria* (Schwarz et al., 2010).

Estudos comparativos do transcriptoma de *E. tenella*, *E. maxima* e *E. acervulina* foram também realizados pelo nosso grupo, a partir de sequências ORESTES provenientes de diversos estágios de desenvolvimento do ciclo destes parasitas. Dentro deste projeto, o presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de se obter um perfil de expressão gênica qualitativo em larga escala de oocistos de *Eimeria maxima* em três fases da esporulação (oocistos não esporulados, parcialmente esporulados e esporulados).

O estudo de genes diferencialmente expressos nas fases da esporogonia poderá não somente contribuir para um melhor entendimento do processo de formação do esporozoítio e por consequente a invasão celular, como também no futuro poderá ser utilizado como alvo terapêutico, permitindo assim o desenvolvimento de novas estratégias de controle da doença.

## **6 CONCLUSÃO**

- Foram construídas bibliotecas ORESTES, a partir de oocistos não esporulados, parcialmente esporulados e esporulados, o que resultou no sequenciamento de 20.149 leituras, as quais, após a montagem, geraram 1.207 *contigs* e 2.091 *singlets*.
- Menos de 2% dos *contigs* encontrados são de alta expressão (>100x), o que significa que um pequeno conjunto de genes é altamente expresso em cada fase do parasita.
- A maioria (73,5%) das leituras dos *contigs* era proveniente de uma única fase da esporulação, indicando assim que a transcrição gênica é estágio-específica.
- Os resultados obtidos pelo agrupamento dos perfis gênicos em função dos estágios mostraram que oocistos agrupam num único clado e merozoítos num clado externo, sendo condizentes com a biologia do parasita.
- Após a análise estatística, foram obtidos 379 *contigs* diferencialmente expressos e 828 não diferencialmente expressos.
- Menos de 30% dos transcritos anotados apresentou resultados positivos de BLAST, o que pode indicar que um grande número de genes de *E.maxima* ainda está por ser caracterizado.
- O protocolo de anotação automática gerou dados consistentes, 74,2% dos transcritos com resultados de BLAST positivos apresentaram similaridade com sequências de organismos do Filo Apicomplexa.
- Após análise no programa Threader 3, aproximadamente 72% das proteínas hipotéticas presentes entre os 100 transcritos diferencialmente expressos mais abundantes, apresentaram evovelamento similar com proteínas depositadas no banco de dados RCSB PDB.



- Dentre os 100 transcritos diferencialmente expressos mais abundantes, 10 apresentaram perfil de transcrição gênica em oocistos semelhante à de *E. acervulina* e outras 13 à de *E. tenella*.
- Um pequeno conjunto de genes diferencialmente expressos entre as três fases da esporulação foi submetido a experimentos de RT-qPCR, sendo observada boa concordância entre os perfis de expressão gênica obtidos por ORESTES e PCR em tempo real.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS\*

ABEF (Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos). Relatório Anual 2009/2010. 2009. Available from: [http://www.abef.com.br/portal/\\_clientes/abef/cat/RA\\_2010.pdf](http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/RA_2010.pdf) [2010 dez. 10].

Abrahamsen MS, Clark TG, Mascolo P, Speer CA, White MW. Developmental gene expression in *Eimeria bovis*. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Jan;57(1):1-14.

Abrahamsen MS, Johnson RR, Clark TG, White MW. Developmental regulation of an *Eimeria bovis* mRNA encoding refractile body-associated proteins. *Mol Biochem Parasitol*. 1994 Nov;68(1):25-34.

Abrahamsen MS, Johnson RR, Hathaway M, White MW. Identification of *Eimeria bovis* merozoite cDNAs using differential mRNA display. *Mol Biochem Parasitol*. 1995 May;71(2):183-91.

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*. 1991 Jun 21;252(5013):1651-6.

Allen PC, Fetterer RH. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Jan;15(1):58-65.

Allen PC, Jenkins MC, Miska KB. Cross protection studies with *Eimeria maxima* strains. *Parasitol Res*. 2005 Oct;97(3):179-85.

Allocco JJ, Profous-Juchelka H, Myers RW, Nare B, Schmatz DM. Biosynthesis and catabolism of mannitol is developmentally regulated in the protozoan parasite *Eimeria tenella*. *J Parasitol*. 1999 Apr;85(2):167-73.

Almeida CR, Stoco PH, Wagner G, Sincero TC, Rotava G, Bayer-Santos E, Rodrigues JB, Sperandio MM, Maia AA, Ojopi EP, Zaha A, Ferreira HB, Tyler KM, Davila AM, Grisard EC, Dias-Neto E. Transcriptome analysis of *Taenia solium*

---

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: Sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

cysticerci using Open Reading Frame ESTs (ORESTES). *Parasit Vectors*. 2009;2(1):35.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997 Sep 1;25(17):3389-402.

Arnaldi LA, Borra RC, Maciel RM, Cerutti JM. Gene expression profiles reveal that DCN, DIO1, and DIO2 are underexpressed in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid*. 2005 Mar;15(3):210-21.

Audic S, Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res*. 1997 Oct;7(10):986-95.

Aurrecochea C, Heiges M, Wang H, Wang Z, Fischer S, Rhodes P, Miller J, Kraemer E, Stoeckert CJ, Roos DS, Kissinger JC. ApiDB: integrated resources for the apicomplexan bioinformatics resource center. *Nucleic Acids Research*. 2007 Jan;35:D427-D30.

Avedissian M, Longo BM, Jaqueta CB, Schnabel B, Paiva PB, Mello LE, Briones MR. Hippocampal gene expression analysis using the ORESTES methodology shows that homer 1a mRNA is upregulated in the acute period of the pilocarpine epilepsy model. *Hippocampus*. 2007;17(2):130-6.

Barta JR, Coles BA, Schito ML, Fernando MA, Martin A, Danforth HD. Analysis of infraspecific variation among five strains of *Eimeria maxima* from North America. *International Journal for Parasitology*. 1998 Mar;28(3):485-92.

Basak SC, Lee S, Barta JR, Fernando MA. Differential display analysis of gene expression in two immunologically distinct strains of *Eimeria maxima*. *Parasitol Res*. 2006 Jun;99(1):28-36.

Belli SI, Ferguson DJ, Katrib M, Slapetova I, Mai K, Slapeta J, Flowers SA, Miska KB, Tomley FM, Shirley MW, Wallach MG, Smith NC. Conservation of proteins involved in oocyst wall formation in *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina*. *Int J Parasitol*. 2009 Aug;39(10):1063-70.

Belli SI, Walker RA, Flowers SA. Global protein expression analysis in apicomplexan parasites: current status. *Proteomics*. 2005 Mar;5(4):918-24.

Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*. 2004 Jul 16;340(4):783-95.

Berthonneau J, Rodier MH, El Moudni B, Jacquemin JL. Toxoplasma gondii: purification and characterization of an immunogenic metallopeptidase. *Exp Parasitol.* 2000 Jun;95(2):158-62.

Bishop R, Shah T, Pelle R, Hoyle D, Pearson T, Haines L, Brass A, Hulme H, Graham SP, Taracha EL, Kanga S, Lu C, Hass B, Wortman J, White O, Gardner MJ, Nene V, de Villiers EP. Analysis of the transcriptome of the protozoan *Theileria parva* using MPSS reveals that the majority of genes are transcriptionally active in the schizont stage. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(17):5503-11.

Blake DP, Hesketh P, Archer A, Carroll F, Shirley MW, Smith AL. The influence of immunizing dose size and schedule on immunity to subsequent challenge with antigenically distinct strains of *Eimeria maxima*. *Avian Pathol.* 2005 Dec;34(6):489-94.

Blake DP, Oakes R, Smith AL. A genetic linkage map for the apicomplexan protozoan parasite *Eimeria maxima* and comparison with *Eimeria tenella*. *Int J Parasitol.* 2011 Oct 7;41(2):263-70.

Blake DP, Qin Z, Cai J, Smith AL. Development and validation of real-time polymerase chain reaction assays specific to four species of *Eimeria*. *Avian Pathol.* 2008 Feb;37(1):89-94.

Boguski MS, Lowe TMJ, Tolstoshev CM. Dbest - Database for Expressed Sequence Tags. *Nature Genetics.* 1993 Aug;4(4):332-3.

Bozdech Z, Zhu J, Joachimiak MP, Cohen FE, Pulliam B, DeRisi JL. Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of *Plasmodium falciparum* with a long-oligonucleotide microarray. *Genome Biol.* 2003;4(2):R9.

Brackett S, Bliznick A. The occurrence and economic importance of coccidiosis in chickens. New York: American Cyanamid Co.; 1950.

Brady SM, Long TA, Benfey PN. Unraveling the dynamic transcriptome. *Plant Cell.* 2006 Sep;18(9):2101-11.

Breinich MS, Ferguson DJ, Foth BJ, van Dooren GG, Lebrun M, Quon DV, Striepen B, Bradley PJ, Frischknecht F, Carruthers VB, Meissner M. A dynamin is required for the biogenesis of secretory organelles in *Toxoplasma gondii*. *Curr Biol.* 2009 Feb 24;19(4):277-86.

Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo S, McCurdy S, Foy M, Ewan M, Roth R, George D, Eletr S, Albrecht G, Vermaas E, Williams SR, Moon K, Burcham T, Pallas M, DuBridghe RB, Kirchner J, Fearon K, Mao J, Corcoran K. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol.* 2000 Jun;18(6):630-4.

Brentani H, Caballero OL, Camargo AA, da Silva AM, da Silva WA, Jr., Dias Neto E, Grivet M, Gruber A, Guimaraes PE, Hide W, Iseli C, Jongeneel CV, Kelso J, Nagai MA, Ojopi EP, Osorio EC, Reis EM, Riggins GJ, Simpson AJ, de Souza S, Stevenson BJ, Strausberg RL, Tajara EH, Verjovski-Almeida S, Acencio ML, Bengtson MH, Bettoni F, Bodmer WF, Briones MR, Camargo LP, Cavenee W, Cerutti JM, Coelho Andrade LE, Costa dos Santos PC, Ramos Costa MC, da Silva IT, Estecio MR, Sa Ferreira K, Furnari FB, Faria M, Jr., Galante PA, Guimaraes GS, Holanda AJ, Kimura ET, Leerkes MR, Lu X, Maciel RM, Martins EA, Massirer KB, Melo AS, Mestriner CA, Miracca EC, Miranda LL, Nobrega FG, Oliveira PS, Paquola AC, Pandolfi JR, Campos Pardini MI, Passetti F, Quackenbush J, Schnabel B, Sogayar MC, Souza JE, Valentini SR, Zaiats AC, Amaral EJ, Arnaldi LA, de Araujo AG, de Bessa SA, Bicknell DC, Ribeiro de Camaro ME, Carraro DM, Carrer H, Carvalho AF, Colin C, Costa F, Curcio C, Guerreiro da Silva ID, Pereira da Silva N, Dellamano M, El-Dorry H, Espreadico EM, Scattoni Ferreira AJ, Ayres Ferreira C, Fortes MA, Gama AH, Giannella-Neto D, Giannella ML, Giorgi RR, Goldman GH, Goldman MH, Hackel C, Ho PL, Kimura EM, Kowalski LP, Krieger JE, Leite LC, Lopes A, Luna AM, Mackay A, Mari SK, Marques AA, Martins WK, Montagnini A, Mourao Neto M, Nascimento AL, Neville AM, Nobrega MP, O'Hare MJ, Otsuka AY, Ruas de Melo AI, Paco-Larson ML, Guimaraes Pereira G, Pesquero JB, Pessoa JG, Rahal P, Rainho CA, Rodrigues V, Rogatto SR, Romano CM, Romeiro JG, Rossi BM, Rusticci M, Guerra de Sa R, Sant' Anna SC, Sarmazo ML, Silva TC, Soares FA, Sonati Mde F, de Freitas Sousa J, Queiroz D, Valente V, Vettore AL, Villanova FE, Zago MA, Zalcberg H. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Nov 11;100(23):13418-23.

Bromley E, Leeds N, Clark J, McGregor E, Ward M, Dunn MJ, Tomley F. Defining the protein repertoire of microneme secretory organelles in the apicomplexan parasite *Eimeria tenella*. *Proteomics.* 2003 Aug;3(8):1553-61.

Bruno S, Duschak VG, Ledesma B, Ferella M, Andersson B, Guarnera EA, Angel SO. Identification and characterization of serine proteinase inhibitors from *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2004 Jul;136(1):101-7.

Bumstead J, Tomley F. Induction of secretion and surface capping of microneme proteins in *Eimeria tenella*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Oct;110(2):311-21.

Cai X, Fuller AL, McDougald LR, Zhu G. Apicoplast genome of the coccidian *Eimeria tenella*. *Gene.* 2003 Dec 4;321:39-46.

Camargo AA, Samaia HP, Dias-Neto E, Simao DF, Migotto IA, Briones MR, Costa FF, Nagai MA, Verjovski-Almeida S, Zago MA, Andrade LE, Carrer H, El-Dorry HF, Espreafico EM, Habr-Gama A, Giannella-Neto D, Goldman GH, Gruber A, Hackel C, Kimura ET, Maciel RM, Marie SK, Martins EA, Nobrega MP, Paco-Larson ML, Pardini MI, Pereira GG, Pesquero JB, Rodrigues V, Rogatto SR, da Silva ID, Sogayar MC, Sonati MF, Tajara EH, Valentini SR, Alberto FL, Amaral ME, Aneas I, Arnaldi LA, de Assis AM, Bengtson MH, Bergamo NA, Bombonato V, de Camargo ME, Canevari RA, Carraro DM, Cerutti JM, Correa ML, Correa RF, Costa MC, Curcio C, Hokama PO, Ferreira AJ, Furuzawa GK, Gushiken T, Ho PL, Kimura E, Krieger JE, Leite LC, Majumder P, Marins M, Marques ER, Melo AS, Melo MB, Mestriner CA, Miracca EC, Miranda DC, Nascimento AL, Nobrega FG, Ojopi EP, Pandolfi JR, Pessoa LG, Prevedel AC, Rahal P, Rainho CA, Reis EM, Ribeiro ML, da Ros N, de Sa RG, Sales MM, Sant'anna SC, dos Santos ML, da Silva AM, da Silva NP, Silva WA, Jr., da Silveira RA, Sousa JF, Stecconi D, Tsukumo F, Valente V, Soares F, Moreira ES, Nunes DN, Correa RG, Zalcborg H, Carvalho AF, Reis LF, Brentani RR, Simpson AJ, de Souza SJ. The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 9;98(21):12103-8.

Campbell WC. History of the discovery of sulfaquinoxaline as a coccidiostat. *J Parasitol*. 2008 Aug;94(4):934-45.

Canning EU, Anwar M. Studies on meiotic division in coccidial and malarial parasites. *J Protozool*. 1968 May;15(2):290-8.

Carruthers VB, Tomley F. Receptor-ligand interaction and invasion: Microneme proteins in apicomplexans. *Subcellular Biochemistry* 2008;47:33-45.

Castañón CAB. Análise e reconhecimento digital de formas biológicas para o diagnóstico automático de parasitas do gênero *Eimeria*. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.

Castañón CAB, Fraga JS, Fernandez S, Gruber A, Costa LD. Biological shape characterization for automatic image recognition and diagnosis of protozoan parasites of the genus *Eimeria*. *Pattern Recognition*. 2007 Jul;40(7):1899-910.

Chapman HD. Origins of coccidiosis research in the fowl - The first fifty years. *Avian Diseases*. 2003 Jan-Mar;47(1):1-20.

Chapman HD, Cherry TE, Danforth HD, Richards G, Shirley MW, Williams RB. Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *Int J Parasitol*. 2002 May;32(5):617-29.

Chapman HD, Shirley MW. The Houghton strain of *Eimeria tenella*: a review of the type strain selected for genome sequencing. *Avian Pathol.* 2003 Apr;32(2):115-27.

Charneau S, Bastos IM, Mouray E, Ribeiro BM, Santana JM, Grellier P, Florent I. Characterization of PfDYN2, a dynamin-like protein of *Plasmodium falciparum* expressed in schizonts. *Microbes Infect.* 2007 Jun;9(7):797-805.

Chen J, Sun M, Lee S, Zhou G, Rowley JD, Wang SM. Identifying novel transcripts and novel genes in the human genome by using novel SAGE tags. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 17;99(19):12257-62.

Chiu PW, Huang YC, Pan YJ, Wang CH, Sun CH. A novel family of cyst proteins with epidermal growth factor repeats in *Giardia lamblia*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(5):e677.

Clark TG, Abrahamsen MS, White MW. Developmental expression of heat shock protein 90 in *Eimeria bovis*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996 Jun;78(1-2):259-63.

Cloonan N, Grimmond SM. Transcriptome content and dynamics at single-nucleotide resolution. *Genome Biol.* 2008;9(9):234.

Conseil V, Soete M, Dubremetz JF. Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jun;43(6):1358-61.

Current WL, Upton SJ, Long PL. Taxonomy and Life Cycles. In: Long PL, editor. *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. Boston: CRC Press Inc; 1990. p. 1-17.

da Mota AF, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Shade LL, Matukumalli LK, Wood DL, Capuco AV, Brito MA, Connor EE, Martinez ML, Coutinho LL. Characterization of open reading frame-expressed sequence tags generated from *Bos indicus* and *B. taurus* mammary gland cDNA libraries. *Anim Genet.* 2004 Jun;35(3):213-9.

Dalloul RA, Lillehoj HS. Recent advances in immunomodulation and vaccination strategies against coccidiosis. *Avian Dis.* 2005 Mar;49(1):1-8.

de Souza SJ, Camargo AA, Briones MR, Costa FF, Nagai MA, Verjovski-Almeida S, Zago MA, Andrade LE, Carrer H, El-Dorry HF, Espreafico EM, Habr-Gama A, Giannella-Neto D, Goldman GH, Gruber A, Hackel C, Kimura ET, Maciel RM, Marie SK, Martins EA, Nobrega MP, Paco-Larson ML, Pardini MI, Pereira GG, Pesquero JB, Rodrigues V, Rogatto SR, da Silva ID, Sogayar MC, de Fatima Sonati M, Tajara



EH, Valentini SR, Acencio M, Alberto FL, Amaral ME, Aneas I, Bengtson MH, Carraro DM, Carvalho AF, Carvalho LH, Cerutti JM, Correa ML, Costa MC, Curcio C, Gushiken T, Ho PL, Kimura E, Leite LC, Maia G, Majumder P, Marins M, Matsukuma A, Melo AS, Mestriner CA, Miracca EC, Miranda DC, Nascimento AN, Nobrega FG, Ojopi EP, Pandolfi JR, Pessoa LG, Rahal P, Rainho CA, da Ros N, de Sa RG, Sales MM, da Silva NP, Silva TC, da Silva W, Jr., Simao DF, Sousa JF, Stecconi D, Tsukumo F, Valente V, Zalcbeg H, Brentani RR, Reis FL, Dias-Neto E, Simpson AJ. Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 7;97(23):12690-3.

de Vries E, Corton C, Harris B, Cornelissen AW, Berriman M. Expressed sequence tag (EST) analysis of the erythrocytic stages of *Babesia bovis*. *Vet Parasitol*. 2006 May 31;138(1-2):61-74.

Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, Masuo Y, Agrawal G. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics*. 2007 Jun;8(4):234-51.

Del Cacho E, Gallego M, Pages M, Monteagudo L, Sanchez-Acedo C. HSP70 is part of the synaptonemal complex in *Eimeria tenella*. *Parasitol Int*. 2008 Dec;57(4):454-9.

Del Cacho E, Gallego M, Pereboom D, Lopez-Bernad F, Quilez J, Sanchez-Acedo C. *Eimeria tenella*: hsp70 expression during sporogony. *J Parasitol*. 2001 Oct;87(5):946-50.

Del Cacho E, Pages M, Gallego M, Barbero JL, Monteagudo L, Sanchez-Acedo C. Meiotic chromosome pairing and bouquet formation during *Eimeria tenella* sporulation. *Int J Parasitol*. 2010 Mar 15;40(4):453-62.

Del Cacho E, Pages M, Gallego M, Monteagudo L, Sanchez-Acedo C. Synaptonemal complex karyotype of *Eimeria tenella*. *Int J Parasitol*. 2005 Nov;35(13):1445-51.

Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*. 2004 Jul;37(1):112-4, 6, 8-9.

Dias Neto E, Correa RG, Verjovski-Almeida S, Briones MR, Nagai MA, da Silva W, Jr., Zago MA, Bordin S, Costa FF, Goldman GH, Carvalho AF, Matsukuma A, Baia GS, Simpson DH, Brunstein A, de Oliveira PS, Bucher P, Jongeneel CV, O'Hare MJ, Soares F, Brentani RR, Reis LF, de Souza SJ, Simpson AJ. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3491-6.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):6025-30.

Dinel S, Bolduc C, Belleau P, Boivin A, Yoshioka M, Calvo E, Piedboeuf B, Snyder EE, Labrie F, St-Amand J. Reproducibility, bioinformatic analysis and power of the SAGE method to evaluate changes in transcriptome. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(3):e26.

Dole VS, Myler PJ, Stuart KD, Madhubala R. Expression of biopterin transporter (BT1) protein in *Leishmania*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Feb 19;208(1):89-91.

Dong H, Lin J, Han H, Jiang L, Zhao Q, Zhu S, Huang B. Analysis of differentially expressed genes in the precocious line of *Eimeria maxima* and its parent strain using suppression subtractive hybridization and cDNA microarrays. *Parasitol Res*. *In press*.

Dowse TJ, Pascall JC, Brown KD, Soldati D. Apicomplexan rhomboids have a potential role in microneme protein cleavage during host cell invasion. *Int J Parasitol*. 2005 Jun;35(7):747-56.

Dowse TJ, Soldati D. Rhomboid-like proteins in Apicomplexa: phylogeny and nomenclature. *Trends Parasitol*. 2005 Jun;21(6):254-8.

Dubremetz JF, Garcia-Reguet N, Conseil V, Fourmaux MN. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol*. 1998 Jul;28(7):1007-13.

Dufva M. *DNA Microarrays for Biomedical Research*. New York, USA: Humana Press; 2009. p. 1-22: Introduction to Microarray Technology.

Durham AM, Kashiwabara AY, Matsunaga FT, Ahagon PH, Rainone F, Varuzza L, Gruber A. EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. *Bioinformatics*. 2005 Jun 15;21(12):2812-3.

Echeverria PC, Matrajt M, Harb OS, Zappia MP, Costas MA, Roos DS, Dubremetz JF, Angel SO. *Toxoplasma gondii* Hsp90 is a potential drug target whose expression and subcellular localization are developmentally regulated. *J Mol Biol*. 2005 Jul 22;350(4):723-34.

Eckert J, Taylor M, Catchpole J, Licois D, Coudert P, Bucklar H. Identification of *Eimeria* species and strains: Morphological characteristics of oocysts. In: Eckert J, Braun R, Shirley MW and Coudert P, editors. Guidelines on techniques in coccidiosis research. Luxembourg: Office for official Publications of the European Communities; 1995.

Edgar SA. Sporulation of oocysts at specific temperatures and notes on the prepatent period of several species of avian coccidia. *J Parasitol.* 1955 Apr;41(2):214-6.

Edgar SA, Herrick CA, Fraser LA. Glycogen in the life cycle of coccidium, *Eimeria tenella*. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 1944;63:199-202.

Ellis J, Bumstead J. *Eimeria* species: studies using rRNA and rDNA probes. *Parasitology.* 1990 Aug;101 Pt 1:1-6.

Ellis J, Thurlby T. Changes in the messenger RNA population during sporulation of *Eimeria maxima*. *Parasitology.* 1991 Feb;102 Pt 1:1-8.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998 Mar;8(3):175-85.

Ewing RM, Ben Kahla A, Poirot O, Lopez F, Audic S, Claverie JM. Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Res.* 1999 Oct;9(10):950-9.

Fayer R. Epidemiology of Protozoan Infections - Coccidia. *Veterinary Parasitology.* 1980;6(1-3):75-103.

Fernandez-Gamba A, Leal MC, Morelli L, Castano EM. Insulin-degrading enzyme: structure-function relationship and its possible roles in health and disease. *Curr Pharm Des.* 2009;15(31):3644-55.

Fernandez S. Estudo das variações inter- e intra- específicas de *Eimeria* spp. de galinha doméstica através do polimorfismo de DNA amplificado randomicamente (RAPD). São Paulo: Universidade de São Paulo; 1999.

Fernandez S, Costa AC, Katsuyama AM, Madeira AM, Gruber A. A survey of the inter- and intraspecific RAPD markers of *Eimeria* spp. of the domestic fowl and the development of reliable diagnostic tools. *Parasitol Res.* 2003a Apr;89(6):437-45.

Fernandez S, Katsuyama AM, Kashiwabara AY, Madeira AM, Durham AM, Gruber A. Characterization of SCAR markers of *Eimeria* spp. of domestic fowl and construction of a public relational database (The *Eimeria* SCARdb). *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Sep 1;238(1):183-8.

Fernandez S, Pagotto AH, Furtado MM, Katsuyama AM, Madeira AM, Gruber A. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. *Parasitology.* 2003b Oct;127(Pt 4):317-25.

Fernando MA. *Eimeria*: Infections of the Intestine. In: Long PL, editor. *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. Boston: CRC Press Inc; 1990. p. 63-75.

Ferro M. Desenvolvimento e validação de protocolos para a anotação automática de seqüências ORESTES de *Eimeria* spp. de galinha doméstica [Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Fetterer RH, Barfield RC. Characterization of a developmentally regulated oocyst protein from *Eimeria tenella*. *J Parasitol.* 2003 Jun;89(3):553-64.

Fetterer RH, Jenkins MC, Miska KB, Barfield RC. Characterization of the antigen SO7 during development of *Eimeria tenella*. *J Parasitol.* 2007a Oct;93(5):1107-13.

Fetterer RH, Miska KB, Barfield RC. Partial purification and characterization of an aminopeptidase from *Eimeria tenella*. *J Parasitol.* 2005 Dec;91(6):1280-6.

Fetterer RH, Miska KB, Jenkins MC, Barfield RC. A conserved 19-kDa *Eimeria tenella* antigen is a profilin-like protein. *J Parasitol.* 2004 Dec;90(6):1321-8.

Fetterer RH, Miska KB, Jenkins MC, Barfield RC, Lillehoj H. Identification and characterization of a serpin from *Eimeria acervulina*. *J Parasitol.* 2008 Dec;94(6):1269-74.

Fetterer RH, Miska KB, Lillehoj H, Barfield RC. Serine protease activity in developmental stages of *Eimeria tenella*. *J Parasitol.* 2007b Apr;93(2):333-40.

Fietto JL, DeMarco R, Verjovski-Almeida S. Use of degenerate primers and touchdown PCR for construction of cDNA libraries. *Biotechniques.* 2002 Jun;32(6):1404-11.

Fitz-Coy SH. Antigenic variation among strains of *Eimeria maxima* and *E. tenella* of the chicken. *Avian Dis.* 1992 Jan-Mar;36(1):40-3.

Fleige T, Limenitakis J, Soldati-Favre D. Apicoplast: keep it or leave it. *Microbes Infect.* 2010 Apr;12(4):253-62.

Florent I, Charneau S, Grellier P. *Plasmodium falciparum* genes differentially expressed during merozoite morphogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 2004 May;135(1):143-8.

Fonseca RD, Carraro DM, Brentani H. Mining ORESTES no-match database: can we still contribute to cancer transcriptome? *Genetics and Molecular Research.* 2006;5(1):24-32.

Freeman M. Rhomboid proteases and their biological functions. *Annu Rev Genet.* 2008;42:191-210.

Fullwood MJ, Wei CL, Liu ET, Ruan Y. Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. *Genome Res.* 2009 Apr;19(4):521-32.

Garcia AM, Hernandez O, Aristizabal BH, De Souza Bernardes LA, Puccia R, Naranjo TW, Goldman GH, Goldman MH, Cano LE, Restrepo A, McEwen JG. Gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* transition from conidium to yeast cell. *Med Mycol.* 2010 Feb;48(1):147-54.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Perteau M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002 Oct 3;419(6906):498-511.

Gissot M, Briquet S, Refour P, Boschet C, Vaquero C. PfMyb1, a *Plasmodium falciparum* transcription factor, is required for intra-erythrocytic growth and controls key genes for cell cycle regulation. *J Mol Biol.* 2005 Feb 11;346(1):29-42.

Gomez C, Esther Ramirez M, Calixto-Galvez M, Medel O, Rodriguez MA. Regulation of gene expression in protozoa parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:726045.

Gopalakrishnan AM, Lopez-Estrano C. Comparative analysis of stage specific gene regulation of apicomplexan parasites: Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii. Infect Disord Drug Targets. 2010 Aug;10(4):303-11.

Graat EA, Henken AM, Ploeger HW, Noordhuizen JP, Vertommen MH. Rate and course of sporulation of oocysts of Eimeria acervulina under different environmental conditions. Parasitology. 1994 Jun;108(Pt 5):497-502.

Green CD, Simons JF, Taillon BE, Lewin DA. Open systems: panoramic views of gene expression. J Immunol Methods. 2001 Apr;250(1-2):67-79.

Gregory MW. Pathology of Coccidial Infections. In: Long PL, editor. Coccidiosis of Man and Domestic Animals. Boston: CRC Press; 1990. p. 235-62.

Grisard EC, Stoco PH, Wagner G, Sincero TC, Rotava G, Rodrigues JB, Snoeijer CQ, Koerich LB, Sperandio MM, Bayer-Santos E, Fragoso SP, Goldenberg S, Triana O, Vallejo GA, Tyler KM, Davila AM, Steindel M. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite Trypanosoma rangeli. Mol Biochem Parasitol. 2010 Nov;174(1):18-25.

Gruber A. Expressed sequence tags. In: Dear PH, editor. Bioinformatics. Bloxham Mill, Oxfordshire, UK: Scion Publishing Limited; 2007. p. 141-67.

Hammond DM. Life Cycles and Development of Coccidia. In: Hammod DM and Long PL, editors. The Coccidia: Baltimore -University Park Press e London- Butterworths; 1973. p. 45-80.

Hammond DM, Long PL. The Coccidia. Baltimore -University Park Press London- Butterworths; 1973.

Han HY, Lin JJ, Zhao QP, Dong H, Jiang LL, Wang X, Han JF, Huang B. Construction of subtractive cDNA libraries of the sporogony stage of Eimeria tenella by suppression subtractive hybridization. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2007;23(6):1005-10.

Han HY, Lin JJ, Zhao QP, Dong H, Jiang LL, Xu MQ, Zhu SH, Huang B. Identification of differentially expressed genes in early stages of Eimeria tenella by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. J Parasitol. 2010 2010;96(1):95-102.

Hanelt B, Lun CM, Adema CM. Comparative ORESTES-sampling of transcriptomes of immune-challenged *Biomphalaria glabrata* snails. *J Invertebr Pathol*. 2008 Oct;99(2):192-203.

Hoon M, Hayashizaki Y. Deep cap analysis gene expression (CAGE): genome-wide identification of promoters, quantification of their expression, and network inference. *Biotechniques*. 2008;44:627-32.

Hsieh JJ, Cheng EH, Korsmeyer SJ. Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell*. 2003 Oct 31;115(3):293-303.

Hu K, Johnson J, Florens L, Fraunholz M, Suravajjala S, DiLullo C, Yates J, Roos DS, Murray JM. Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog*. 2006 Feb;2(2):e13.

Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*. 1999 Sep;9(9):868-77.

Huber R, Carrell RW. Implications of the 3-Dimensional Structure of Alpha-1-Antitrypsin for Structure and Function of Serpins. *Biochemistry*. 1989 Nov 14;28(23):8951-66.

Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res*. 2000 Dec;10(12):1845-64.

Jackson JB. Proton translocation by transhydrogenase. *FEBS Lett*. 2003 Nov 27;555(1):176-7.

Jansen G, Westerhof GR, Jarmuszewski MJ, Kathmann I, Rijksen G, Schornagel JH. Methotrexate transport in variant human CCRF-CEM leukemia cells with elevated levels of the reduced folate carrier. Selective effect on carrier-mediated transport of physiological concentrations of reduced folates. *J Biol Chem*. 1990 Oct 25;265(30):18272-7.

Jean L, Grosclaude J, Labbe M, Tomley F, Pery P. Differential localisation of an *Eimeria tenella* aspartyl proteinase during the infection process. *Int J Parasitol*. 2000 Sep;30(10):1099-107.

Jean L, Long M, Young J, Pery P, Tomley F. Aspartyl proteinase genes from apicomplexan parasites: evidence for evolution of the gene structure. *Trends Parasitol.* 2001a Oct;17(10):491-8.

Jean L, Pery P, Dunn P, Bumstead J, Billington K, Ryan R, Tomley F. Genomic organisation and developmentally regulated expression of an apicomplexan aspartyl proteinase. *Gene.* 2001b Jan 10;262(1-2):129-36.

Jones DT. THREADER: Protein Sequence Threading by Double Dynamic Programming. In: Salzberg S, Searls D and Kasif S, editors. *Computational Methods in Molecular Biology.* Amsterdam. Elsevier Science; 1998. p.285-312

Joyner LP. Host and Site Specificity. In: Long PL, editor. *The Biology of Coccidia.* Baltimore: University Park Press; 1982. p. 36-60.

Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol.* 2004 May 14;338(5):1027-36.

Kang SW, Kweon CH, Lee EH, Choe SE, Jung SC, Quyen DV. The differentiation of transcription between tachyzoites and bradyzoites of in vitro cultured *Neospora caninum*. *Parasitol Res.* 2008a Oct;103(5):1011-8.

Kang SW, Lee EH, Jean YH, Choe SE, Van Quyen D, Lee MS. The differential protein expression profiles and immunogenicity of tachyzoites and bradyzoites of in vitro cultured *Neospora caninum*. *Parasitol Res.* 2008b Sep;103(4):905-13.

Kawahara F, Taira K, Nagai S, Onaga H, Onuma M, Nunoya T. Detection of five avian *Eimeria* species by species-specific real-time polymerase chain reaction assay. *Avian Dis.* 2008 Dec;52(4):652-6.

Kim YC, Jung YC, Xuan Z, Dong H, Zhang MQ, Wang SM. Pan-genome isolation of low abundance transcripts using SAGE tag. *FEBS Lett.* 2006 Dec 11;580(28-29):6721-9.

Kinnaird JH, Bumstead JM, Mann DJ, Ryan R, Shirley MW, Shiels BR, Tomley FM. EtCRK2, a cyclin-dependent kinase gene expressed during the sexual and asexual phases of the *Eimeria tenella* life cycle. *Int J Parasitol.* 2004 May;34(6):683-92.



Klotz C, Marhofer RJ, Selzer PM, Lucius R, Pogonka T. *Eimeria tenella*: identification of secretory and surface proteins from expressed sequence tags. *Exp Parasitol*. 2005 Sep;111(1):14-23.

Kramer RA, Tomchak LA, McAndrew SJ, Becker K, Hug D, Pasamontes L, Humbelin M. An *Eimeria tenella* gene encoding a protein with homology to the nucleotide transhydrogenases of *Escherichia coli* and bovine mitochondria. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Aug;60(2):327-31.

Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 2001 Jan 19;305(3):567-80.

Kronegg J, Buloz D. Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI). 1999. Available from: <http://129.194.185.165/dgpi/> [2007 Jan 25].

Laurent F, Bourdieu C, Kaga M, Chilmonczyk S, Zgrzebski G, Yvore P, Pery P. Cloning and characterization of an *Eimeria acervulina* sporozoite gene homologous to aspartyl proteinases. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Dec;62(2):303-12.

Le Roch KG, Zhou Y, Blair PL, Grainger M, Moch JK, Haynes JD, De La Vega P, Holder AA, Batalov S, Carucci DJ, Winzeler EA. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science*. 2003 Sep 12;301(5639):1503-8.

Leerkes MR, Caballero OL, Mackay A, Torloni H, O'Hare MJ, Simpson AJ, de Souza SJ. In silico comparison of the transcriptome derived from purified normal breast cells and breast tumor cell lines reveals candidate upregulated genes in breast tumor cells. *Genomics*. 2002 Feb;79(2):257-65.

Levine ND. *Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man*. Minneapolis: Bugess Publishing Company; 1961. p. 432: The Telosporasida and the Coccidia Proper.

Levine ND. Introduction, History, and Taxonomy. In: Hammod DM and Long PL, editors. *The Coccidia*: Baltimore -University Park Press; 1973. p. 1-22.

Levine ND. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. *J Protozool*. 1988 Nov;35(4):518-20.

Levine PP. A new coccidium pathogenic for chickens. *Eimeria brunetti* n. sp. (Protozoa: Eimeriidae). *Cornell Veterinarian* 1942;32:430-9.

Lew AE, Anderson GR, Minchin CM, Jeston PJ, Jorgensen WK. Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens. *Veterinary Parasitology*. 2003 Feb 28;112(1-2):33-50.

Li H, Han Z, Lu Y, Lin Y, Zhang L, Wu Y, Wang H. Isolation and functional characterization of a dynamin-like gene from *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004a Jul 30;320(3):664-71.

Li L, Brunk BP, Kissinger JC, Pape D, Tang K, Cole RH, Martin J, Wylie T, Dante M, Fogarty SJ, Howe DK, Liberator P, Diaz C, Anderson J, White M, Jerome ME, Johnson EA, Radke JA, Stoeckert CJ, Jr., Waterston RH, Clifton SW, Roos DS, Sibley LD. Gene discovery in the apicomplexa as revealed by EST sequencing and assembly of a comparative gene database. *Genome Res*. 2003 Mar;13(3):443-54.

Li L, Crabtree J, Fischer S, Pinney D, Stoeckert CJ, Jr., Sibley LD, Roos DS. ApiEST-DB: analyzing clustered EST data of the apicomplexan parasites. *Nucleic Acids Res*. 2004b Jan 1;32:D326-8.

Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. 1992 Aug 14;257(5072):967-71.

Liberator P, Anderson J, Feiglin M, Sardana M, Griffin P, Schmatz D, Myers RW. Molecular cloning and functional expression of mannitol-1-phosphatase from the apicomplexan parasite *Eimeria tenella*. *J Biol Chem*. 1998 Feb 13;273(7):4237-44.

Ling KH, Rajandream MA, Rivailler P, Ivens A, Yap SJ, Madeira AM, Mungall K, Billington K, Yee WY, Bankier AT, Carroll F, Durham AM, Peters N, Loo SS, Isa MN, Novaes J, Quail M, Rosli R, Nor Shamsudin M, Sobreira TJ, Tivey AR, Wai SF, White S, Wu X, Kerhornou A, Blake D, Mohamed R, Shirley M, Gruber A, Berriman M, Tomley F, Dear PH, Wan KL. Sequencing and analysis of chromosome 1 of *Eimeria tenella* reveals a unique segmental organization. *Genome Res*. 2007 Mar;17(3):311-9.

Liu ET. Genomic technologies and the interrogation of the transcriptome. *Mech Ageing Dev*. 2005 Jan;126(1):153-9.

Llinas M, DeRisi JL. Pernicious plans revealed: *Plasmodium falciparum* genome wide expression analysis. *Curr Opin Microbiol*. 2004 Aug;7(4):382-7.

Lockyer AE, Spinks J, Kane RA, Hoffmann KF, Fitzpatrick JM, Rollinson D, Noble LR, Jones CS. *Biomphalaria glabrata* transcriptome: cDNA microarray profiling identifies resistant- and susceptible-specific gene expression in haemocytes from snail strains exposed to *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics*. 2008;9:634.

Lockyer AE, Spinks JN, Walker AJ, Kane RA, Noble LR, Rollinson D, Dias-Neto E, Jones CS. *Biomphalaria glabrata* transcriptome: identification of cell-signalling, transcriptional control and immune-related genes from open reading frame expressed sequence tags (ORESTES). *Dev Comp Immunol*. 2007;31(8):763-82.

Long PL. A study of *Eimeria maxima* Tyzzer, 1929, a coccidium of the fowl (*Gallus gallus*). *Ann Trop Med Parasitol*. 1959 Sep;53:325-33.

Long PL, Joyner LP. Problems in the identification of species of *Eimeria*. *J Protozool*. 1984 Nov;31(4):535-41.

Long PL, Millard BJ. Immunological differences in *Eimeria maxima*: effect of a mixed immunizing inoculum on heterologous challenge. *Parasitology*. 1979 Dec;79(3):451-7.

Long PL, Millard BJ, Joyner LP, Norton CC. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet Lat*. 1976 Jul-Sep;6(3):201-17.

Lopez-Estrano C. Comparative analysis of stage specific gene regulation of apicomplexan parasites: *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii*. *Infect Disord Drug Targets*. 2010 Aug;10(4):240-1.

Mai K, Sharman PA, Walker RA, Katrib M, De Souza D, McConville MJ, Wallach MG, Belli SI, Ferguson DJ, Smith NC. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Mar;104(2):281-9.

Maia RM, Valente V, Cunha MA, Sousa JF, Araujo DD, Silva WA, Jr., Zago MA, Dias-Neto E, Souza SJ, Simpson AJ, Monesi N, Ramos RG, Espreafico EM, Paco-Larson ML. Identification of unannotated exons of low abundance transcripts in *Drosophila melanogaster* and cloning of a new serine protease gene upregulated upon injury. *BMC Genomics*. 2007;8:249.

Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, Hao L, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Krylov D, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35:D237-40.

Marchler-Bauer A, Panchenko AR, Shoemaker BA, Thiessen PA, Geer LY, Bryant SH. CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jan 1;30(1):281-3.

Maresca B, Carratu L. The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitol Today.* 1992 Aug;8(8):260-6.

Martin AG, Danforth HD, Barta JR, Fernando MA. Analysis of immunological cross-protection and sensitivities to anticoccidial drugs among five geographical and temporal strains of *Eimeria maxima*. *Int J Parasitol.* 1997 May;27(5):527-33.

Massimine KM, Doan LT, Atreya CA, Stedman TT, Anderson KS, Joiner KA, Coppens I. *Toxoplasma gondii* is capable of exogenous folate transport. A likely expansion of the BT1 family of transmembrane proteins. *Mol Biochem Parasitol.* 2005 Nov;144(1):44-54.

Mathis GF, McDougald LR, McMurray B. Effectiveness of therapeutic anticoccidial drugs against recently isolated coccidia. *Poult Sci.* 1984 Jun;63(6):1149-53.

McDonald V, Shirley MW. Past and future: vaccination against *Eimeria*. *Parasitology.* 2009 Oct;136(12):1477-89.

McDougald LR, Reid WM. Coccidiosis. In: Calnek BW, editor. *Diseases of Poultry*. 9th ed. Ames: Iowa State University Press; 1995. p. 929.

Mello BP, Abrantes EF, Torres CH, Machado-Lima A, Fonseca Rda S, Carraro DM, Brentani RR, Reis LF, Brentani H. No-match ORESTES explored as tumor markers. *Nucleic Acids Res.* 2009 May;37(8):2607-17.

Min W, Dalloul RA, Lillehoj HS. Application of biotechnological tools for coccidia vaccine development. *J Vet Sci.* 2004 Dec;5(4):279-88.

Miska KB, Fetterer RH, Barfield RC. Analysis of transcripts expressed by *Eimeria tenella* oocysts using subtractive hybridization methods. J Parasitol. 2004 Dec;90(6):1245-52.

Miska KB, Fetterer RH, Min W, Lillehoj HS. Heat shock protein 90 genes of two species of poultry *Eimeria*: expression and evolutionary analysis. J Parasitol. 2005 Apr;91(2):300-6.

Miska KB, Fetterer RH, Rosenberg GH. Analysis of transcripts from intracellular stages of *Eimeria acervulina* using expressed sequence tags. J Parasitol. 2008 Apr;94(2):462-6.

Monné L, Hönig G. On the properties of the shells of the coccidian oocysts. Arkiv för Zoologi. 1954 12 may 1954;7(15):251-6.

Moody DE. Genomics Techniques: An overview of methods for the study of gene expression. J Anim Sci. 2001;79:E128-E35.

Morozova O, Hirst M, Marra MA. Applications of New Sequencing Technologies for Transcriptome Analysis. Annual Review of Genomics and Human Genetics. 2009;10:135-51.

Morrisette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. Microbiol Mol Biol Rev. 2002 Mar;66(1):21-38.

Morse DL, Carroll D, Weberg L, Borgstrom MC, Ranger-Moore J, Gillies RJ. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. Anal Biochem. 2005 Jul 1;342(1):69-77.

Mulder N, Apweiler R. InterPro and InterProScan: tools for protein sequence classification and comparison. Methods Mol Biol. 2007;396:59-70.

Mullapudi N, Joseph SJ, Kissinger JC. Identification and functional characterization of cis-regulatory elements in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. Genome Biol. 2009;10(4):R34.

Munasinghe A, Patankar S, Cook BP, Madden SL, Martin RK, Kyle DE, Shoaibi A, Cummings LM, Wirth DF. Serial analysis of gene expression (SAGE) in *Plasmodium*

*falciparum*: application of the technique to A-T rich genomes. Mol Biochem Parasitol. 2001 Mar;113(1):23-34.

Nagai MA, Da Ros N, Neto MM, Junior SRD, Brentani MM, Hirata R, Neves EJ. Gene expression profiles in breast tumors regarding the presence or absence of estrogen and progesterone receptors. International Journal of Cancer. 2004 Oct 10;111(6):892-9.

Nagaraj SH, Gasser RB, Ranganathan S. A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. Brief Bioinform. 2007 Jan;8(1):6-21.

Nathan DF, Vos MH, Lindquist S. In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 25;94(24):12949-56.

Newport G, Culpepper J, Agabian N. Parasite Heat-Shock Proteins. Parasitology Today. 1988 Nov;4(11):306-12.

Ng P, Wei CL, Ruan Y. Paired-end diTagging for transcriptome and genome analysis. Curr Protoc Mol Biol. 2007 Jul;Chapter 21:Unit 21 12.

Ng ST, Sanusi Jangi M, Shirley MW, Tomley FM, Wan KL. Comparative EST analyses provide insights into gene expression in two asexual developmental stages of *Eimeria tenella*. Exp Parasitol. 2002 Jun-Jul;101(2-3):168-73.

Norton CC, Chard MJ. The oocyst sporulation time of *Eimeria* species from the fowl. Parasitology. 1983 Apr;86(Pt 2):193-8.

Novaes J. Análise da expressão diferencial entre merozoítos e esporozoítos de *Eimeria tenella* empregando a técnica de LongSAGE. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.

Nunes FM, Valente V, Sousa JF, Cunha MA, Pinheiro DG, Maia RM, Araujo DD, Costa MC, Martins WK, Carvalho AF, Monesi N, Nascimento AM, Peixoto PM, Silva MF, Ramos RG, Reis LF, Dias-Neto E, Souza SJ, Simpson AJ, Zago MA, Soares AE, Bitondi MM, Espreafico EM, Espindola FS, Paco-Larson ML, Simoes ZL, Hartfelder K, Silva WA, Jr. The use of Open Reading frame ESTs (ORESTES) for analysis of the honey bee transcriptome. BMC Genomics. 2004 Nov 3;5(1):84.

Okhuysen PC, Chappell CL, Kettner C, Sterling CR. Cryptosporidium parvum metalloaminopeptidase inhibitors prevent in vitro excystation. Antimicrob Agents Chemother. 1996 Dec;40(12):2781-4.

Padda RS, Tsai A, Chappell CL, Okhuysen PC. Molecular cloning and analysis of the Cryptosporidium parvum aminopeptidase N gene. Int J Parasitol. 2002 Feb;32(2):187-97.

Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 May 24;91(11):5022-6.

Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. Nucleic Acids Res. 2003 Jul 15;31(14):e73.

Péroval M, Péry P, Labbé M. The heat shock protein 90 of *Eimeria tenella* is essential for invasion of host cell and schizont growth. Int J Parasitol. 2006 Sep;36(10-11):1205-15.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45.

Pfaffl MW. Relative quantification. In: Dorak MT, editor. Real-time PCR. New York, USA: Taylor & Francis Group; 2006. p. 63-82.

Pittilo RM, Ball SJ. The ultrastructural development of the oocyst wall of *Eimeria maxima*. Parasitology. 1980 Aug;81(1):115-22.

Pittilo RM, Ball SJ. Ultrastructural observations on the sporogony of *Eimeria maxima*. Int J Parasitol. 1985 Dec;15(6):617-20.

Ponchel F. Real-time PCR using SYBR® Green. In: Dorak MT, editor. Real-time PCR. New York, USA: Taylor & Francis Group; 2006. p. 139-54.

Possenti A, Cherchi S, Bertuccini L, Pozio E, Dubey JP, Spano F. Molecular characterisation of a novel family of cysteine-rich proteins of *Toxoplasma gondii* and ultrastructural evidence of oocyst wall localisation. Int J Parasitol. 2010 Dec;40(14):1639-49.

Praefcke GJ, McMahon HT. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Feb;5(2):133-47.

Procnier JD, Fernando MA, Barta JR. Species and strain differentiation of *Eimeria* spp. of the domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers. *Parasitol Res.* 1993;79(2):98-102.

Pszenny V, Angel SO, Duschak VG, Paulino M, Ledesma B, Yabo MI, Guarnera E, Ruiz AM, Bontempi EJ. Molecular cloning, sequencing and expression of a serine proteinase inhibitor gene from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Apr 15;107(2):241-9.

Pszenny V, Ledesma BE, Matrajt M, Duschak VG, Bontempi EJ, Dubremetz JF, Angel SO. Subcellular localization and post-secretory targeting of TgPI, a serine proteinase inhibitor from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 2002 May;121(2):283-6.

Radke JR, Behnke MS, Mackey AJ, Radke JB, Roos DS, White MW. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC Biol.* 2005;3:26.

Radvanyi L, Singh-Sandhu D, Gallichan S, Lovitt C, Pedyczak A, Mallo G, Gish K, Kwok K, Hanna W, Zubovits J, Armes J, Venter D, Hakimi J, Shortreed J, Donovan M, Parrington M, Dunn P, Oomen R, Tartaglia J, Berinstein NL. The gene associated with trichorhinophalangeal syndrome in humans is overexpressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 2;102(31):11005-10.

Refega S, Girard-Misguich F, Bourdieu C, Pery P, Labbe M. Gene discovery in *Eimeria tenella* by immunoscreening cDNA expression libraries of sporozoites and schizonts with chicken intestinal antibodies. *Vet Parasitol.* 2003 Apr 2;113(1):19-33.

Rivals E, Boureux A, Lejeune M, Ottones F, Perez OP, Tarhio J, Pierrat F, Ruffle F, Combes T, Marti J. Transcriptome annotation using tandem SAGE tags. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(17):e108.

Romano CM. Caracterização molecular e análise comparativa de genomas mitocondriais de *Eimeria* spp. de galinha doméstica [Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2004.



Rose ME, Long PL. Immunity to four species of *Eimeria* in fowls. *Immunology*. 1962 Jan;5:79-92.

Ryan R, Shirley M, Tomley F. Mapping and expression of microneme genes in *Eimeria tenella*. *Int J Parasitol*. 2000 Dec;30(14):1493-9.

Ryley JF. Cytochemistry, Physiology and Biochemistry. In: Hammond DM and Long PL, editors. *The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and Related Genera*. London: University Park Press; 1973. p. 145-82.

Ryley JF, Bentley M, Manners DJ, Stark JR. Amylopectin, the storage polysaccharide of the Coccidia *Eimeria brunetti* and *E. tenella*. *J Parasitol*. 1969 Aug;55(4):839-45.

Said HM, Chatterjee N, Haq RU, Subramanian VS, Ortiz A, Matherly LH, Sirotnak FM, Halsted C, Rubin SA. Adaptive regulation of intestinal folate uptake: effect of dietary folate deficiency. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Dec;279(6):C1889-95.

Sakabe NJ, de Souza JE, Galante PA, de Oliveira PS, Passetti F, Brentani H, Osorio EC, Zaiats AC, Leerkes MR, Kitajima JP, Brentani RR, Strausberg RL, Simpson AJ, de Souza SJ. ORESTES are enriched in rare exon usage variants affecting the encoded proteins. *C R Biol*. 2003 Oct-Nov;326(10-11):979-85.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.

Santos JM, Lebrun M, Daher W, Soldati D, Dubremetz JF. Apicomplexan cytoskeleton and motors: key regulators in morphogenesis, cell division, transport and motility. *Int J Parasitol*. 2009 Jan;39(2):153-62.

Sargent TD, Dawid IB. Differential Gene-Expression in the Gastrula of *Xenopus-Laevis*. *Science*. 1983;222(4620):133-9.

Sarkis AS. Global analysis of differential gene expression between prostate cancer and normal prostate tissues using cDNA microarray of open-reading frame expressed sequence tags (ORESTES). *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2000 Dec;3(S1):S36.

Schaap D, Arts G, Kroeze J, Niessen R, Roosmalen-Vos SV, Spreeuwenberg K, Kuiper CM, Beek-Verhoeven NV, Kok JJ, Knegt RM, Vermeulen AN. An *Eimeria* vaccine candidate appears to be lactate dehydrogenase; characterization and comparative analysis. *Parasitology*. 2004 Jun;128(Pt 6):603-16.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):467-70.

Schmatz DM. The mannitol cycle in *Eimeria*. *Parasitology*. 1997;114(Suppl):S81-9.

Schnitzler BE, Thebo PL, Mattsson JG, Tomley FM, Shirley MW. Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken. *Avian Pathol*. 1998;27(5):490-7.

Schnitzler BE, Thebo PL, Tomley FM, Uggla A, Shirley MW. PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out. *Avian Pathol*. 1999 Feb;28(1):89-93.

Schwarz RS, Fetterer RH, Rosenberg GH, Miska KB. Coccidian merozoite transcriptome analysis from *Eimeria maxima* in comparison to *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina*. *J Parasitol*. Feb;96(1):49-57.

Schwarz RS, Fetterer RH, Rosenberg GH, Miska KB. Coccidian Merozoite Transcriptome Analysis from *Eimeria Maxima* in Comparison to *Eimeria Tenella* and *Eimeria Acervulina*. *Journal of Parasitology*. 2010 Feb;96(1):49-57.

Schwarz RS, Jenkins MC, Klopp S, Miska KB. Genomic Analysis of *Eimeria* Spp. Populations in Relation to Performance Levels of Broiler Chicken Farms in Arkansas and North Carolina. *Journal of Parasitology*. 2009 Aug;95(4):871-80.

Shah T, de Villiers E, Nene V, Hass B, Taracha E, Gardner MJ, Sansom C, Pelle R, Bishop R. Using the transcriptome to annotate the genome revisited: application of massively parallel signature sequencing (MPSS). *Gene*. 2006 Jan 17;366(1):104-8.

Shiraki T, Kondo S, Katayama S, Waki K, Kasukawa T, Kawaji H, Kodzius R, Watahiki A, Nakamura M, Arakawa T, Fukuda S, Sasaki D, Podhajska A, Harbers M, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y. Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 23;100(26):15776-81.

Shirley MW. Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. *Parasitology*. 1975 Dec;71(3):369-76.

Shirley MW. Electrophoretic variation of enzymes: a further marker for genetic studies of the *Eimeria*. Z Parasitenkd. 1978 Sep 4;57(1):83-7.

Shirley MW. The genome of *Eimeria tenella*: further studies on its molecular organisation. Parasitol Res. 1994;80(5):366-73.

Shirley MW. *Eimeria* species and strains of chicken. In: Eckert J, Braun R, Shirley MW and Coudert P, editors. COST 89/820 Biotechnology: Guidelines on techniques in coccidiosis research. Brussels: Luxembourg European Commission; 1995. p. 1-24.

Shirley MW. *Eimeria* spp. from the chicken: occurrence, identification and genetics. Acta Vet Hung. 1997;45(3):331-47.

Shirley MW. The genome of *Eimeria* spp., with special reference to *Eimeria tenella*--a coccidium from the chicken. Int J Parasitol. 2000 Apr 10;30(4):485-93.

Shirley MW, Blake D, White SE, Sheriff R, Smith AL. Integrating genetics and genomics to identify new leads for the control of *Eimeria* spp. Parasitology. 2004a;128(Suppl 1):S33-42.

Shirley MW, Harvey DA. *Eimeria tenella*: infection with a single sporocyst gives a clonal population. Parasitology. 1996 Jun;112(Pt 6):523-8.

Shirley MW, Harvey DA. A genetic linkage map of the apicomplexan protozoan parasite *Eimeria tenella*. Genome Res. 2000 Oct;10(10):1587-93.

Shirley MW, Ivens A, Gruber A, Madeira AM, Wan KL, Dear PH, Tomley FM. The *Eimeria* genome projects: a sequence of events. Trends Parasitol. 2004b May;20(5):199-201.

Shirley MW, Smith AL, Blake DP. Challenges in the successful control of the avian coccidia. Vaccine. 2007 Jul 26;25(30):5540-7.

Shirley MW, Smith AL, Tomley FM. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. Adv Parasitol. 2005;60:285-330.  
Silveira NJ, Varuzza L, Machado-Lima A, Loretto MS, Pinheiro DG, Rodrigues RV, Severino P, Nobrega FG, Silva WA, Jr., de BPCA, Tajara EH. Searching for

molecular markers in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) by statistical and bioinformatic analysis of larynx-derived SAGE libraries. BMC Med Genomics. 2008;1:56.

Smith CK, Lee DE. Monosaccharide transport by *Eimeria tenella* sporozoites. J Parasitol. 1986 Feb;72(1):163-9.

Smith NC, Wallach M, Miller CM, Braun R, Eckert J. Maternal transmission of immunity to *Eimeria maxima*: western blot analysis of protective antibodies induced by infection. Infect Immun. 1994 Nov;62(11):4811-7.

Snoeijer CQ, Picchi GF, Dambros BP, Steindel M, Goldenberg S, Fragoso SP, Lorenzini DM, Grisard EC. Trypanosoma rangeli Transcriptome Project: Generation and analysis of expressed sequence tags. Kinetoplastid Biol Dis. 2004 May 13;3(1):1.

Sterky F, Lundeberg J. Sequence analysis of genes and genomes. J Biotechnol. 2000 Jan 7;76(1):1-31.

Stotish RL, Wang CC, Meyenhofer M. Structure and composition of the oocyst wall of *Eimeria tenella*. J Parasitol. 1978 Dec;64(6):1074-81.

Stucki U, Braun R, Roditi I. *Eimeria tenella*: characterization of a 5S ribosomal RNA repeat unit and its use as a species-specific probe. Exp Parasitol. 1993 Feb;76(1):68-75.

Sutton CA, Shirley MW, Wisher MH. Characterization of coccidial proteins by two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. Parasitology. 1989 Oct;99(Pt 2):175-87.

Tang J, Wong RN. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. J Cell Biochem. 1987 Jan;33(1):53-63.

Tomley FM, Billington KJ, Bumstead JM, Clark JD, Monaghan P. EtMIC4: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-I repeats. Int J Parasitol. 2001 Oct;31(12):1303-10.

Tomley FM, Bumstead JM, Billington KJ, Dunn PP. Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996 Aug;79(2):195-206.

Tomley FM, Soldati DS. Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends Parasitol*. 2001 Feb;17(2):81-8.

Toulza E, Mattiuzzo NR, Galliano MF, Jonca N, Dossat C, Jacob D, de Daruvar A, Wincker P, Serre G, Guerrin M. Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome Biol*. 2007;8(6):R107.

Tuda J, Mongan AE, Tolba ME, Imada M, Yamagishi J, Xuan X, Wakaguri H, Sugano S, Sugimoto C, Suzuki Y. Full-parasites: database of full-length cDNAs of apicomplexa parasites, 2010 update. *Nucleic Acids Res*. 2010 Nov 4:1-7.

Tuteja R, Tuteja N. Serial analysis of gene expression (SAGE): application in cancer research. *Med Sci Monit*. 2004 Jun;10(6):RA132-40.

Tyzzar EE. Coccidiosis in gallinaceous birds. *Amer J Hyg*. 1929(10):269-83.

Urban S, Lee JR, Freeman M. *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell*. 2001 Oct 19;107(2):173-82.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.

Varuzza L. Métodos Estatísticos para a análise de bibliotecas digitais de expressão gênica [Doutorado (Programa Interunidades de Bioinformática)]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.

Varuzza L, Pereira CAB. Significance test for comparing digital gene expression profiles: Partial likelihood application. *Chilean Journal of Statistics*. 2010;1(1):91-102.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):484-7.

Vencio RZ, Varuzza L, de BPCA, Brentani H, Shmulevich I. Simcluster: clustering enumeration gene expression data on the simplex space. BMC Bioinformatics. 2007;8:246.

Verjovski-Almeida S, DeMarco R, Martins EA, Guimaraes PE, Ojopi EP, Paquola AC, Piazza JP, Nishiyama MY, Jr., Kitajima JP, Adamson RE, Ashton PD, Bonaldo MF, Coulson PS, Dillon GP, Farias LP, Gregorio SP, Ho PL, Leite RA, Malaquias LC, Marques RC, Miyasato PA, Nascimento AL, Ohlweiler FP, Reis EM, Ribeiro MA, Sa RG, Stukart GC, Soares MB, Gargioni C, Kawano T, Rodrigues V, Madeira AM, Wilson RA, Menck CF, Setubal JC, Leite LC, Dias-Neto E. Transcriptome analysis of the acelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. Nat Genet. 2003 Oct;35(2):148-57.

Vermeulen AN, Kok JJ, van den Boogaart P, Dijkema R, Claessens JA. Eimeria refractile body proteins contain two potentially functional characteristics: transhydrogenase and carbohydrate transport. FEMS Microbiol Lett. 1993 Jun 15;110(2):223-9.

Vetterling JM, Doran DJ. Storage polysaccharide in coccidial sporozites after excystation and penetration of cells. J Protozool. 1969 Nov;16(4):772-5.

Vrba V, Blake DP, Poplstein M. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven Eimeria species that infect the chicken. Vet Parasitol. 2010 Sep 15; 174(3-4):183-90

Wagenbach GE, Burns WC. Structure and respiration of sporulating Eimeria stiedae and E. tenella oocysts. J Protozool. 1969 May;16(2):257-63.

Waldenstedt L, Elwinger K, Lunden A, Thebo P, Uggla A. Sporulation of Eimeria maxima oocysts in litter with different moisture contents. Poult Sci. 2001 Oct;80(10):1412-5.

Wan KL, Chong SP, Ng ST, Shirley MW, Tomley FM, Jangi MS. A survey of genes in *Eimeria tenella* merozoites by EST sequencing. Int J Parasitol. 1999 Dec;29(12):1885-92.

Wang CC. Biochemistry and Physiology of Coccidia. In: Long P, editor. The biology of the Coccidia. Georgia: Edward Arnold; 1982. p. 168-228.

Wang CC, Stotish RL. Changes of Nucleic-Acids and Proteins in Oocysts of Eimeria-Tenella during Sporulation. Journal of Protozoology. 1975;22(3):438-43.

Wang CC, Weppelman RM, Lopez-Ramos B. Isolation of amylopectin granules and identification of amylopectin phosphorylase in the oocysts of *Eimeria tenella*. *J Protozool*. 1975 Nov;22(4):560-4.

Wang J, Zhang W, Chen T, Wang M. *Eimeria tenella* cDNA library construction and expressed sequence tags analysis. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2007;24(6):1357-62.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009 Jan;10(1):57-63.

Wastling JM, Xia D, Sohal A, Chaussepied M, Pain A, Langsley G. Proteomes and transcriptomes of the Apicomplexa--where's the message? *Int J Parasitol*. 2009 Jan;39(2):135-43.

Webster WA, McFadden GI. Organelle division: dynamin-related proteins in apicomplexans. *Curr Biol*. 2009 Apr 28;19(8):R334-6.

Weiss LM, Fiser A, Angeletti RH, Kim K. *Toxoplasma gondii* proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2009 Jun;6(3):303-13.

Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D, McClelland M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res*. 1992 Oct 11;20(19):4965-70.

Williams RB. Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *Int J Parasitol*. 1998 Jul;28(7):1089-98.

Wilson PA, Fairbairn D. Biochemistry of Sporulation in Oocysts of *Eimeria Acervulina*. *Journal of Protozoology*. 1961;8(4):410-6.

Wilson RJ, Denny PW, Preiser PR, Rangachari K, Roberts K, Roy A, Whyte A, Strath M, Moore DJ, Moore PW, Williamson DH. Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol*. 1996 Aug 16;261(2):155-72.

Witcombe DM, Belli SI, Wallach MG, Smith NC. Molecular characterisation of EmTFP250: a novel member of the TRAP protein family in *Eimeria maxima*. *Int J Parasitol*. 2003 Jul;33(7):691-702.

Xia D, Sanderson SJ, Jones AR, Prieto JH, Yates JR, Bromley E, Tomley FM, Lal K, Sinden RE, Brunk BP, Roos DS, Wastling JM. The proteome of *Toxoplasma gondii*: integration with the genome provides novel insights into gene expression and annotation. *Genome Biol.* 2008;9(7):R116.

Xu JH, Qin ZH, Liao YS, Xie MQ, Li AX, Cai JP. Characterization and expression of an actin-depolymerizing factor from *Eimeria tenella*. *Parasitol Res.* 2008 Jul;103(2):263-70.