

Aspectos gerais da biologia do genoma, transcriptoma e proteoma de *Eimeria* spp. de galinha doméstica

General aspects of the biology, genome, transcriptome and proteome of *Eimeria* spp. of domestic fowl

Jeniffer Novaes¹; Alessandra Popov dos Santos Manha¹; Laureana Stelmastchuk Benassi Fontolan¹; Alda Maria Backx Noronha Madeira^{1,2}

¹ Laboratório de Biologia Molecular de Coccídias, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

Resumo. Sete espécies de *Eimeria* spp. causam a coccidiose aviária, doença entérica responsável por grandes perdas econômicas e que é controlada pelo uso de drogas anticoccidianas e/ou vacinas vivas. Com o intuito de fazer uma breve revisão sobre estes parasitas, este artigo aborda aspectos gerais da biologia, do genoma, transcriptoma e proteoma de *Eimeria* spp. que acometem a galinha doméstica.

Palavras-chave. Coccidiose aviária, *Eimeria* spp., expressão gênica, expressed sequence tags (ESTs).

Abstract. Seven species of *Eimeria* spp. cause avian coccidiosis, an enteric disease responsible for high economic losses which is controlled by anticoccidial drugs and/or live vaccines. With the purpose to set up a brief review on these parasites, general aspects of the biology, genome, transcriptome and proteome of *Eimeria* spp. of domestic fowl were discussed in this article.

Keywords. Coccidiosis, *Eimeria* spp., gene expression, expressed sequence tags (ESTs).

² Contato do autor:

albackx@usp.br

Recebido 30set10

Aceito 03mar11

Publicado

Eimeria spp. e a coccidiose aviária

Parasitas do gênero *Eimeria* são protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa, o qual compreende diversas espécies de grande importância médica e veterinária, como os gêneros *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e *Neospora* (Roos, 2005; Striepen e col., 2002). Os parasitas do gênero *Eimeria* podem ser encontrados em diversos hospedeiros, incluindo invertebrados e vertebrados, como aves e mamíferos.

Em galinha doméstica, a *Eimeria* é responsável pela coccidiose aviária, doença de distribuição mundial que acomete principalmente frangos de corte e matrizes reprodutoras (Williams, 1998). Esta parasitose pode ser causada por sete espécies de *Eimeria*: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. praecox* e *E. mitis* (Allen e Fetterer, 2002; Fernando, 1990).

Apesar da grande variedade de drogas anticoccidianas e vacinas utilizadas para a prevenção (Chapman e col., 2002; McDonald e Shirley, 2009; Williams, 2002a; Williams, 2002b), a coccidiose ainda causa grande prejuízo à indústria avícola (Allen e Fetterer, 2002). Calcula-se que os gastos mundiais com o controle desta doença variem de 800 milhões (Allen e Fetterer, 2002) a 3 bilhões de dólares por ano (Shirley e col., 2004a).

Devido ao aumento da resistência parasitária, das

crescentes restrições legais ao uso de aditivos em rações animais e ao custo elevado das vacinas vivas, são crescentes os estudos para a produção de novas vacinas (Allen e Fetterer, 2002; Brake, 2002; Chapman e col., 2002; Williams, 2002a; Williams, 2002b), bem como de novas estratégias para o controle desta doença (Jenkins, 2001).

Biologia e ciclo de vida do parasita

Os parasitas do gênero *Eimeria* apresentam um ciclo de vida monoxênico (isto é, com um único hospedeiro) que se inicia quando um hospedeiro susceptível ingere um oocisto esporulado (Current e col., 1990; McDougald e Reid, 1995) (Figura 1). O oocisto, ao ser ingerido (1) é rompido na moela por trituração mecânica, liberando os esporocistos (2). No intestino, devido à ação de sais biliares e tripsina, os esporozoítos saem ativamente do esporocisto e penetram nas células epiteliais intestinais (3). Nesta etapa há vários ciclos intestinais endógenos nos quais os parasitas se multiplicam por fissão múltipla (merogonia ou esquizogonia) resultando na formação de esquizontes, os quais contêm centenas de merozoítos (4, 5 e 6). Em seguida, há a fase sexuada do ciclo, gamogonia ou gametogonia, onde os merozoítos diferenciam-se em macrogametócito, gamonte feminino (7) ou microgametócito, gamonte masculino (8). Após a fecundação do macrogameta pelo microgameta (9) há a formação do oocisto

(10) que é liberado no ambiente juntamente com as fezes (11). Sob condições favoráveis de temperatura, oxigênio e umidade, o oocisto sofre um processo de esporogonia ou esporulação envolvendo meiose e mitose resultando na formação do oocisto esporulado que contém quatro esporocistos com dois esporozoítos em cada (1) (Canning e Anwar, 1968; Ferguson e col., 1978a; Ferguson e col., 1978b).

As espécies de *Eimeria* são identificadas com base na dimensão, morfologia e tempo mínimo de esporulação dos oocistos, especificidade do hospedeiro (são parasitas espécie-específicos), sítios de colonização, características

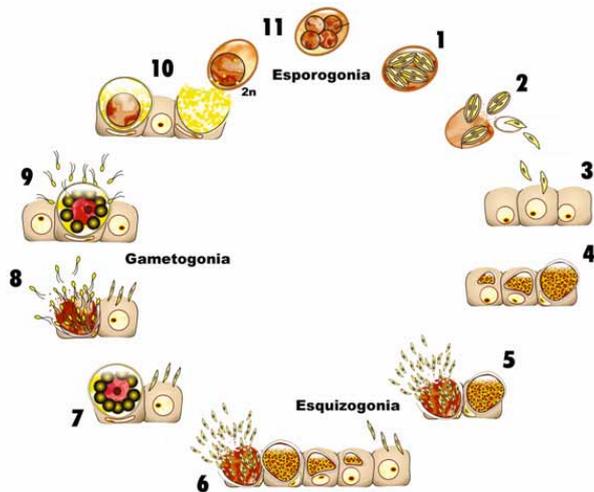


Figura 1 - Ciclo de vida de *Eimeria* spp. {Fonte - Pôster de divulgação: "Entendendo e Controlando a Coccidiose aviária", Texto: Arthur Gruber, Arte gráfica: Helton Barreiro, Patrocínio Biovet. Edição geral: Gessulli Agribusiness}.

das lesões, período pré-patente e especificidade imunológica (Long e Joyner, 1984; Long e col., 1976).

Estes parâmetros analisados de forma conjunta permitem a distinção das espécies de *Eimeria*, entretanto, nem sempre o diagnóstico é confiável; principalmente quando há infecções mistas. Desta forma, técnicas baseadas em métodos moleculares também têm sido utilizadas. Nosso grupo desenvolveu um método de diagnóstico de espécies por PCR multiplex baseado num conjunto de marcadores moleculares denominados SCARs (*Sequence-Characterized Amplified Regions*), os quais permitem a diferenciação e o diagnóstico das sete espécies simultaneamente (Fernandez e col., 2003).

Genoma

O genoma de *Eimeria* spp. possui 55 milhões de pares de bases, conteúdo GC de 53% (Ling e col., 2007; Shirley, 2000) e está organizado em 14 cromossomos, que variam de tamanho entre 1 a mais de 7 Mpb (Shirley, 1994; Shirley, 2000). O genoma de *E. tenella* cepa H foi sequenciado e está disponível no sítio do Instituto Sanger (http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella/). Além do genoma, o cromossomo 1 desta espécie foi totalmente sequenciado (Ling e col., 2007). Este cromossomo possui uma organização genômica incomum segmentada em regiões R (feature-rich), que são ricas em repetições, apresentam-

do elementos similares a transposons e repetições teloméricas (Shirley, 2000; Shirley e col., 2004b), além disso, apresenta segmentos livre de repetições P (feature-poor) (Ling e col., 2007).

Estes organismos também apresentam dois genomas extracromossômicos: o genoma mitocondrial que é constituído de segmentos de DNA lineares contendo unidades repetitivas de 6kb (Chapman e Shirley, 2003; Romano, 2004) e o genoma do apicoplasto (organela exclusiva dos organismos do Filo Apicomplexa) que é circular, rico em conteúdo AT e em *Eimeria tenella*, contém cerca de 35 kb (Cai e col., 2003).

Transcriptoma

Para um melhor entendimento da biologia deste parasita, diversos projetos de geração e análise de ESTs (Expressed sequence tags) de *Eimeria* spp. têm sido realizados (Li e col., 2003; Miska e col., 2004; Miska e col., 2008; Ng e col., 2002; Schwarz e col., 2010; Wan e col., 1999). O nosso grupo coordenado pelos professores Arthur Gruber (ICB/USP) e Alda Maria B. N. Madeira (ICB/USP) como parte integrante do Consórcio Internacional do Genoma de *E. tenella* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella/consortium.shtml), gerou um conjunto de cerca de 15.000 leituras do tipo ORESTES (*Open Reading Frame ESTs*) de *E. tenella*, *E. acervulina* e *E. maxima* (Shirley e col., 2004a; Shirley e col., 2004b). Vários estágios como esporozoítos, merozoítos de segunda geração, oocistos não esporulados, parcialmente esporulados e esporulados foram estudados. Para *E. tenella*, adicionamos aos nossos dados, cerca de 35.000 ESTs disponíveis em bancos internacionais. Além disso, com a finalidade de obter um perfil de expressão quantitativo, o nosso grupo também gerou mais de 35.000 tags (etiquetas) provenientes de bibliotecas de LongSAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) ou seja, análise seriada da expressão gênica, de dois estágios invasivos (merozoítos de segunda geração e esporozoítos) de *Eimeria tenella* (Novaes, 2009). A anotação das sequências montadas foi realizada em um *pipeline* automático de anotação que utiliza o sistema EGene (Durham e col., 2005), desenvolvido pelo nosso grupo de bioinformática.

Após a anotação automática foi observado para ambas as técnicas, que grande parte dos transcritos obtidos era desconhecida. De fato, cerca de 50 a 65% dos genes sequenciados em *Eimeria* e de outros organismos do Filo Apicomplexa ainda não possuem uma função conhecida. (Gardner e col., 2002; Miska e col., 2004; Wan e col., 1999).

A partir da análise comparativa dos genes diferencialmente expressos foi observado que para as três espécies de *Eimeria* um pequeno conjunto de genes é altamente expresso em cada fase do ciclo de vida, e que menos de 20% dos genes são compartilhados entre os estágios estudados (Novaes, 2009; Novaes e col., 2005). Em *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* a análise do perfil de transcrição em diferentes estágios evolutivos também revelou a predominância de grupos de genes diferencialmente expressos de forma estágio-específica (Bozdech e col., 2003; Cleary e col., 2002; Duncan, 2004; Li e col., 2003; Llinas e DeRisi, 2004).

Nossos estudos evidenciaram que em *Eimeria tenella*, para merozoítos, muitos dos produtos protéicos diferencialmente expressos estão relacionados à tradução, modificação e manutenção da conformação das proteínas e processos de ligação. Em esporozoítos, o perfil transcricional obtido é distinto, já que muitos transcritos não são conhecidos e alguns dos produtos protéicos identificados são histonas, proteínas associadas ao transporte e atividade catalítica (Novaes, 2009).

De modo semelhante, vários trabalhos têm relatado um maior número de transcritos associados com crescimento e divisão celular e síntese de DNA em esporozoítos de *Eimeria tenella* (Ng e col., 2002; Wan e col., 1999). Já para merozoítos, há predominância de transcritos envolvidos com a expressão de genes e proteínas, tanto em *E. tenella* (Schaap e col., 2005), quanto em *E. acervulina* (Miska e col., 2008) e *E. maxima* (Schwarz e col., 2010).

Este padrão diferencial da expressão gênica em *Eimeria* spp pode estar relacionado às diferenças funcionais entre estes estágios invasivos. Enquanto os esporozoítos são responsáveis pelo início da replicação endógena do parasita sendo alvo preferencial da resposta imune protetora do hospedeiro (Lillehoj e Lillehoj, 2000), os merozoítos estão relacionados à patogênica da doença propriamente dita (Ng e col., 2002), sendo responsáveis por consideráveis danos à mucosa e submucosa intestinais (Schmatz, 1997).

Após a fase de proliferação, crítica para a patogênese, ocorre o ciclo sexual, importante para a geração da diversidade genética. Os oocistos de *Eimeria* são responsáveis pela transmissão e dispersão da doença para novos hospedeiros e são capazes de permanecer viáveis no ambiente por longos períodos de tempo (Belli e col., 2005; Schmatz, 1997).

A esporulação é um processo dinâmico e ainda pouco estudado. Sabe-se que determinados genes, como de proteínas de micronema (Ryan e col., 2000), organela presente no complexo apical de parasitas do Filo Apicomplexa e que tem grande importância no processo de adesão e invasão; EtCRK2 (Kinnaird e col., 2004); eimepsina (Jean e col., 2001); MOP (major oocyst protein) (Fetterer e Barfield, 2003; Fetterer e col., 2007); antígeno SO7 (Fetterer e col., 2007); proteína associada ao corpo refrátil dos esporozoítos (Abrahamsen e col., 1994) e proteínas de choque térmico tais como Hsp70 (del Cacho e col., 2001) e Hsp90 (Miska e col., 2005) são diferencialmente expressos durante a esporulação. Miska e colaboradores (2004) ao analisarem ESTs de oocistos esporulados e não esporulados obtidos por hibridização subtrativa também verificaram este perfil de expressão diferencial entre tais estágios.

Proteoma

Os primeiros estudos de mapeamento de proteínas foram realizados por eletroforese bi-dimensional a partir de esporozoítos das sete espécies de *Eimeria* que infectam galinhas (Sutton e col., 1989). Com o avanço dos estudos genômicos, novas proteínas puderam ser identificadas como as do micronema (Bromley e col., 2003), do corpo refrátil (de Venevelles e col., 2004; de Venevelles e col.,

2006), proteases, enzimas glicolíticas e proteínas de choque térmico (Belli e col., 2005). Recentemente Lal e colaboradores (2009) realizaram um estudo do proteoma de quatro estágios do ciclo de vida de *E. tenella*. Estes autores também observaram que em merozoítos, há uma maior abundância de proteínas relacionadas à transcrição, síntese protéica e ao ciclo celular do que em esporozoítos.

Finalmente, apesar do parasita e de seu ciclo de vida já serem conhecidos, poucos processos bioquímicos em *Eimeria* foram descritos até o momento.

Estudos do genoma, proteoma, expressão gênica, e outras abordagens como ribonoma, metaboloma, ORFoma, interatoma, entre outros, poderão no futuro, permitir a elucidação de vários mecanismos moleculares ainda desconhecidos possibilitando desta forma, a proposição de novas estratégias de controle da coccidiose aviária.

Contribuição dos autores

Busca bibliográfica e redação do artigo: Novaes, J.; Manha, A.P.S.; Stelmastchuk, L.B.F.; Madeira, A.M.B.N.. Revisão do artigo. Madeira, A.M.B.N.

Bibliografia

- Abrahamsen, M. S., Johnson, R. R., Clark, T. G. e White, M. W. (1994). Developmental regulation of an *Eimeria bovis* mRNA encoding refractile body-associated proteins. *Mol Biochem Parasitol* 68, 25-34.
- Allen, P. C. e Fetterer, R. H. (2002). 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* 15, 58-65.
- Belli, S. I., Walker, R. A. e Flowers, S. A. (2005). Global protein expression analysis in apicomplexan parasites: current status. *Proteomics* 5, 918-24.
- Bozdech, Z., Zhu, J., Joachimiak, M. P., Cohen, F. E., Pulliam, B. e DeRisi, J. L. (2003). Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of *Plasmodium falciparum* with a long-oligonucleotide microarray. *Genome Biol* 4, R9.
- Brake, D. A. (2002). Vaccinology for control of apicomplexan parasites: a simplified language of immune programming and its use in vaccine design. *International Journal for Parasitology* 32, 509-515.
- Bromley, E., Leeds, N., Clark, J., McGregor, E., Ward, M., Dunn, M. J. e Tomley, F. (2003). Defining the protein repertoire of microneme secretory organelles in the apicomplexan parasite *Eimeria tenella*. *Proteomics* 3, 1553-61.
- Cai, X., Fuller, A. L., McDougald, L. R. e Zhu, G. (2003). Apicoplast genome of the coccidian *Eimeria tenella*. *Gene* 321, 39-46.
- Canning, E. U. e Anwar, M. (1968). Studies on meiotic division in coccidian and malarial parasites. *J Protozool* 15, 290-8.
- Chapman, H. D., Cherry, T. E., Danforth, H. D., Richards, G., Shirley, M. W. e Williams, R. B. (2002). Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *Int J Parasitol* 32, 617-29.
- Chapman, H. D. e Shirley, M. W. (2003). The Houghton strain of *Eimeria tenella*: a review of the type strain selected for genome sequencing. *Avian Pathol* 32, 115-27.
- Cleary, M. D., Singh, U., Blader, I. J., Brewer, J. L. e Boothroyd, J. C. (2002). *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Eukaryot Cell* 1, 329-

- 40.
- Current, W. L., Upton, S. J. e Long, P. L. (1990). Taxonomy and Life Cycles. In *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*, (ed. P. L. Long), pp. 1-17. Boston: CRC Press Inc.
- de Venevelles, P., Chich, J. F., Faigle, W., Loew, D., Labbe, M., Girard-Misguich, F. e Pery, P. (2004). Towards a reference map of *Eimeria tenella* sporozoite proteins by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Int J Parasitol* 34, 1321-31.
- de Venevelles, P., Francois Chich, J., Faigle, W., Lombard, B., Loew, D., Pery, P. e Labbe, M. (2006). Study of proteins associated with the *Eimeria tenella* refractile body by a proteomic approach. *Int J Parasitol* 36, 1399-407.
- del Cacho, E., Gallego, M., Pereboom, D., Lopez-Bernad, F., Quilez, J. e Sanchez-Acedo, C. (2001). *Eimeria tenella*: hsp70 expression during sporogony. *J Parasitol* 87, 946-50.
- Duncan, R. (2004). DNA microarray analysis of protozoan parasite gene expression: outcomes correlate with mechanisms of regulation. *Trends Parasitol* 20, 211-5.
- Durham, A. M., Kashiwabara, A. Y., Matsunaga, F. T., Ahagon, P. H., Rainone, F., Varuzza, L. e Gruber, A. (2005). EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. *Bioinformatics* 21, 2812-3.
- Ferguson, D. J., Birch-Andersen, A., Hutchinson, W. M. e Siim, J. C. (1978a). Light and electron microscopy on the sporulation of the oocysts of *Eimeria brunetti*. I. Development of the zygote and formation of the sporoblasts. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 86, 1-11.
- Ferguson, D. J., Birch-Andersen, A., Hutchinson, W. M. e Siim, J. C. (1978b). Light and electron microscopy on the sporulation of the oocysts of *Eimeria brunetti*. II. Development into the sporocyst and formation of the sporozoite. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 86, 13-24.
- Fernandez, S., Pagotto, A. H., Furtado, M. M., Katsuyama, A. M., Madeira, A. M. e Gruber, A. (2003). A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. *Parasitology* 127, 317-25.
- Fernando, M. A. (1990). *Eimeria*: Infections of the Intestine. In *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*, (ed. P. L. Long), pp. 63-75. Boston: CRC Press Inc.
- Fetterer, R. H. e Barfield, R. C. (2003). Characterization of a developmentally regulated oocyst protein from *Eimeria tenella*. *J Parasitol* 89, 553-64.
- Fetterer, R. H., Jenkins, M. C., Miska, K. B. e Barfield, R. C. (2007). Characterization of the antigen SO7 during development of *Eimeria tenella*. *J Parasitol* 93, 1107-13.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S. e col. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498-511.
- Jean, L., Long, M., Young, J., Pery, P. e Tomley, F. (2001). Aspartyl proteinase genes from apicomplexan parasites: evidence for evolution of the gene structure. *Trends Parasitol* 17, 491-8.
- Jenkins, M. C. (2001). Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 101, 291-310.
- Kinnaird, J. H., Bumstead, J. M., Mann, D. J., Ryan, R., Shirley, M. W., Shiels, B. R. e Tomley, F. M. (2004). EtCRK2, a cyclin-dependent kinase gene expressed during the sexual and asexual phases of the *Eimeria tenella* life cycle. *Int J Parasitol* 34, 683-92.
- Lal, K., Bromley, E., Oakes, R., Prieto, J. H., Sanderson, S. J., Kurian, D., Hunt, L., Yates, J. R., 3rd, Wastling, J. M., Sinden, R. E. e col. (2009). Proteomic comparison of four *Eimeria tenella* life-cycle stages: unsporulated oocyst, sporulated oocyst, sporozoite and second-generation merozoite. *Proteomics* 9, 4566-76.
- Li, L., Brunk, B. P., Kissinger, J. C., Pape, D., Tang, K., Cole, R. H., Martin, J., Wylie, T., Dante, M., Fogarty, S. J. e col. (2003). Gene discovery in the apicomplexa as revealed by EST sequencing and assembly of a comparative gene database. *Genome Res* 13, 443-54.
- Lillehoj, H. S. e Lillehoj, E. P. (2000). Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Dis* 44, 408-25.
- Ling, K. H., Rajandream, M. A., Rivallier, P., Ivens, A., Yap, S. J., Madeira, A. M., Mungall, K., Billington, K., Yee, W. Y., Bankier, A. T. e col. (2007). Sequencing and analysis of chromosome 1 of *Eimeria tenella* reveals a unique segmental organization. *Genome Res* 17, 311-9.
- Llinas, M. e DeRisi, J. L. (2004). Pernicious plans revealed: *Plasmodium falciparum* genome wide expression analysis. *Curr Opin Microbiol* 7, 382-7.
- Long, P. L. e Joyner, L. P. (1984). Problems in the identification of species of *Eimeria*. *J Protozool* 31, 535-41.
- Long, P. L., Millard, B. J., Joyner, L. P. e Norton, C. C. (1976). A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet Lat* 6, 201-17.
- McDonald, V. e Shirley, M. W. (2009). Past and future: vaccination against *Eimeria*. *Parasitology* 136, 1477-89.
- McDougald, L. R. e Reid, W. M. (1995). Coccidiosis. In *Diseases of Poultry*, (ed. B. W. Calnek), pp. 929. Ames: Iowa State University Press.
- Miska, K. B., Fetterer, R. H. e Barfield, R. C. (2004). Analysis of transcripts expressed by *Eimeria tenella* oocysts using subtractive hybridization methods. *J Parasitol* 90, 1245-52.
- Miska, K. B., Fetterer, R. H., Min, W. e Lillehoj, H. S. (2005). Heat shock protein 90 genes of two species of poultry *Eimeria*: expression and evolutionary analysis. *J Parasitol* 91, 300-6.
- Miska, K. B., Fetterer, R. H. e Rosenberg, G. H. (2008). Analysis of transcripts from intracellular stages of *Eimeria acervulina* using expressed sequence tags. *J Parasitol* 94, 462-6.
- Ng, S. T., Sanusi Jangi, M., Shirley, M. W., Tomley, F. M. e Wan, K. L. (2002). Comparative EST analyses provide insights into gene expression in two asexual developmental stages of *Eimeria tenella*. *Exp Parasitol* 101, 168-73.
- Novaes, J. (2009). Análise da expressão diferencial entre merozoítos e esporozoítos de *Eimeria tenella* empregando a técnica de LongSAGE. In *Instituto de Ciências Biomédicas vol. Doutorado*, pp. 219. São Paulo: Universidade de São Paulo.
- Novaes, J., Kashiwabara, A. Y., Varuzza, L., Nagao, L. T., Manha, A. P. S., Fernandez, S., Durham, A. M., Gruber, A. e Madeira, A. M. B. N. (2005). Survey of *Eimeria* spp. transcripts using open reading frame ESTs (ORESTES). In *In: The IXth International Coccidiosis Conference*, pp. 150. Foz do Iguassu, Parana, Brazil.
- Romano, C. M. (2004). Caracterização molecular e análise comparativa de genomas mitocondriais de *Eimeria* spp. de galinha doméstica, pp. 138. São paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- Roos, D. S. (2005). Genetics. Themes and variations in apicomplexan parasite biology. *Science* 309, 72-3.
- Ryan, R., Shirley, M. e Tomley, F. (2000). Mapping and expression of microneme genes in *Eimeria tenella*. *Int J Parasitol* 30, 1493-9.
- Schaap, D., Arts, G., van Poppel, N. F. e Vermeulen, A. N. (2005). De novo ribosome biosynthesis is transcriptionally

- regulated in *Eimeria tenella*, dependent on its life cycle stage. *Mol Biochem Parasitol* 139, 239-48.
- Schmatz, D. M. (1997). The mannitol cycle in *Eimeria*. *Parasitology* 114 Suppl, S81-9.
- Schwarz, R. S., Fetterer, R. H., Rosenberg, G. H. e Miska, K. B. (2010) Coccidian merozoite transcriptome analysis from *Eimeria maxima* in comparison to *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina*. *J Parasitol* 96, 49-57.
- Shirley, M. W. (1994). The genome of *Eimeria tenella*: further studies on its molecular organisation. *Parasitol Res* 80, 366-73.
- Shirley, M. W. (2000). The genome of *Eimeria* spp., with special reference to *Eimeria tenella*--a coccidium from the chicken. *Int J Parasitol* 30, 485-93.
- Shirley, M. W., Blake, D., White, S. E., Sheriff, R. e Smith, A. L. (2004a). Integrating genetics and genomics to identify new leads for the control of *Eimeria* spp. *Parasitology* 128 Suppl 1, S33-42.
- Shirley, M. W., Ivens, A., Gruber, A., Madeira, A. M., Wan, K. L., Dear, P. H. e Tomley, F. M. (2004b). The *Eimeria* genome projects: a sequence of events. *Trends Parasitol* 20, 199-201.
- Striepen, B., White, M. W., Li, C., Guerini, M. N., Malik, S. B., Logsdon, J. M., Jr., Liu, C. e Abrahamsen, M. S. (2002). Genetic complementation in apicomplexan parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6304-9.
- Sutton, C. A., Shirley, M. W. e Wisner, M. H. (1989). Characterization of coccidial proteins by two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology* 99 Pt 2, 175-87.
- Wan, K. L., Chong, S. P., Ng, S. T., Shirley, M. W., Tomley, F. M. e Jangi, M. S. (1999). A survey of genes in *Eimeria tenella* merozoites by EST sequencing. *Int J Parasitol* 29, 1885-92.
- Williams, R. B. (1998). Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *Int J Parasitol* 28, 1089-98.
- Williams, R. B. (2002a). Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. *Avian Pathol* 31, 317-53.
- Williams, R. B. (2002b). Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952-2002). *Avian Dis* 46, 775-802.