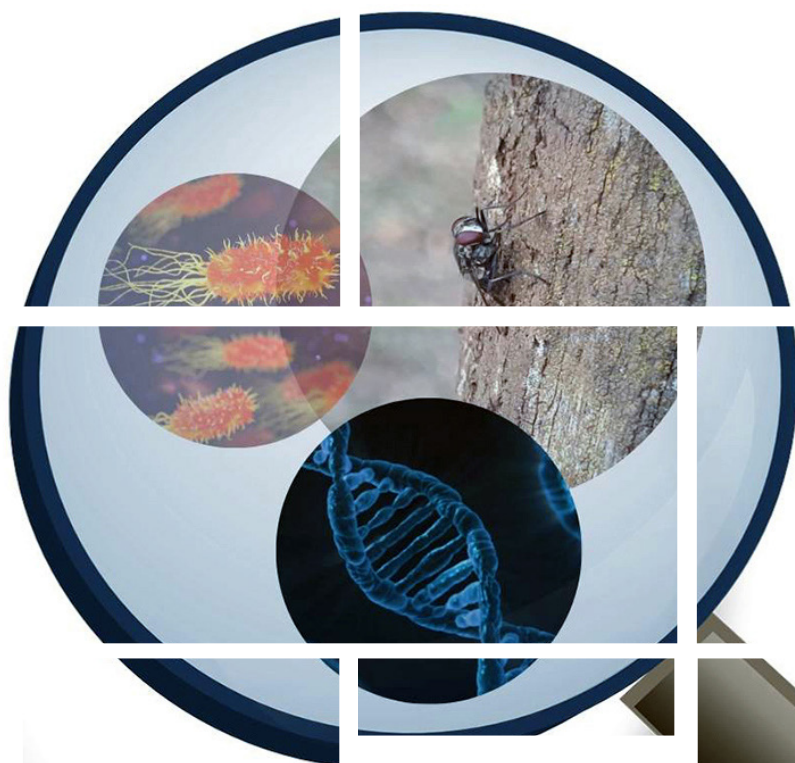


Metagenômica e possíveis aplicações biotecnológicas – identificação do microbioma de ectoparasitos que impactam a bovinocultura



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

DOCUMENTOS 272

Metagenômica e possíveis aplicações biotecnológicas – identificação do microbioma de ectoparasitos que impactam a bovinocultura

*Lenita Ramires dos Santos
Andréa Alves do Egito
Grácia Maria Soares Rosinha
Eronides Marques de Souza*

Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2019

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte
Av. Rádio Maia, 830, Zona Rural, Campo Grande, MS,
79106-550, Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368 2000
Fax: (67) 3368 2150
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Gado de Corte

Presidente
Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes

Secretário-Executivo
Rodrigo Carvalho Alva

Membros
Alexandre Romeiro de Araújo, Andréa Alves do Egito, Liana Jank, Lucimara Chiari, Marcelo Castro Pereira, Mariane de Mendonça Vilela, Rodiney de Arruda Mauro, Wilson Werner Koller

Supervisão editorial
Rodrigo Carvalho Alva

Revisão de texto
Rodrigo Carvalho Alva

Tratamento das ilustrações
Rodrigo Carvalho Alva

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Rodrigo Carvalho Alva

Foto da capa
Composição: Antonio Thadeu Medeiros de Barros e Imagem de Pixabay

1ª edição
Publicação digitalizada (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Gado de Corte

Metagenômica e possíveis aplicações biotecnológicas : identificação do microbioma de ectoparasitos que impactam a bovinocultura / Lenita Ramires dos Santos ... [et al.] - Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2019.
PDF (24 p.) : il. color. - (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974X ; (272).

1. Biotecnologia. 2. Gado de Corte. 3. Gado de Leite. 4. Genoma. 5. Parasito. 6. Taxonomia. 7. Vetor. I. Santos, Lenita Ramires dos. II. Egito, Andréa Alves do. III. Rosinha, Grácia Maria Soares. IV. Souza, Eronides Marques de. V. Série.

CDD 636.20896 (23. ed.)

Maria de Fátima da Cunha (CRB – 1/2616)

© Embrapa, 2019

Autores

Lenita Ramires dos Santos

Bióloga, doutora em Imunologia, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

Andréa Alves do Egito

Médica-Veterinária, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

Grácia Maria Soares Rosinha

Engenheira-Agrônoma, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

Eronides Marques de Souza

Médica-Veterinária, mestre em Zootecnia

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução.....	9
Explorando a diversidade microbiana	10
As diferentes abordagens para análise metagenômica	16
Considerações finais	19
Referências	20

Resumo

A comunidade microbiana que coexiste em habitats tais como a superfície externa e ambientes internos de ectoparasitos de bovinos pode e deve ser conhecida quanto a sua composição e fisiologia. Este conhecimento pode contribuir para o estabelecimento de estratégias de controle, busca de novas moléculas funcionais, prevenção de transmissão de patógenos emergentes e reemergentes, entre outras possibilidades biotecnológicas. Análises completas e complexas de taxonomia, filogenia e funcionalidade têm sido possíveis pelo uso da metagenômica. Por esta metodologia, baseada em sequenciamento concomitante de diferentes genomas, seguido de análises *in silico* (ferramentas de bioinformática), é possível identificar inclusive microrganismos não cultiváveis, abordagem esta que antes não era possível a partir de métodos de isolamento tradicionais. Até recentemente, pouco se conhecia sobre a comunidade microbiana associada a diferentes ectoparasitos de bovinos. De interesse maior estão o carrapato-do-boi e a mosca-dos-estábulo, responsáveis por impactarem negativamente a produção na bovinocultura de corte e de leite. Esta publicação apresenta uma breve revisão na busca da identificação e entendimento da interação da comunidade microbiana presente e/ou carreada por ectoparasitos de bovinos e, também, uma breve descrição da metodologia que tem permitido avanço significativo do conhecimento nesta área.

Palavras-chave: genomas, taxonomia, bioinformática, vetores, micróbios.

Abstract

The microbial community that coexists in habitats such as the outer surface and inner parts of bovine ectoparasites can and should be known regarding their composition and physiology. This knowledge can contribute to the establishment of control strategies, search for new functional molecules, prevention of transmission of emerging and reemerging pathogens, among other biotechnological possibilities. Complete and complex analyzes of taxonomy, phylogeny and functionality were made possible by the use of metagenomics. Through this methodology, based on the sequencing of different genomes followed by in silico analysis (bioinformatics tools), it is possible to identify even non-cultivable microorganisms, an approach that was not previously possible using only traditional methods. Until recently, little was known about the microbial community associated with different cattle ectoparasites. Of greater interest are the cattle tick and the stable fly, both responsible for negatively impacting production in beef and dairy cattle. This publication presents the state of the art in searching to identify and understand the interaction of the microbial community present and carried by bovine ectoparasites, as well as a brief description of the methodology that allowed the significant advance of knowledge in this area.

Keywords: *genome, taxonomy, bioinformatic, vectors, microbes.*

Introdução

O setor agropecuário no Brasil tem impulsionado a economia nacional, sendo responsável por elevado percentual referente ao que é comercializado ao exterior (Brasil, 2017) e com perspectiva de crescimento para os próximos anos. Especificamente em relação à pecuária bovina, o último levantamento apresentado oficialmente (IBGE, 2018) aponta para mais de 218 milhões de cabeças. Além de o Brasil ser o maior exportador de carne bovina do mundo (Brasil, 2015), e conseqüentemente, manter a pecuária bovina impactando positivamente no balanço comercial brasileiro (ABIEC, 2017), há perspectiva de aumento de consumo de carne pelos consumidores brasileiros, podendo atingir 8,32 milhões de toneladas em 2021. Sabe-se que a estabilidade do agronegócio está diretamente ligada à manutenção dos altos níveis de produção e qualidade das cadeias. Ademais, a cadeia produtiva da pecuária bovina mantém sua produção em níveis elevados a partir de um conjunto de fatores associados, entre os quais a presença de doenças é uma das maiores ameaças ao sistema, com impactos que excedem 20% das perdas na produção de animais em todo o mundo (apud ZANELLA, 2016).

As ectoparasitoses podem ocasionar prejuízos diretos e indiretos à bovinocultura de corte e leite, pois podem causar danos diversos tais como perda de peso, lesões no couro, transmissão de agentes patogênicos, entre outros (DE LA FUENTE et al., 2008; SILVA et al., 2010). Além disto, a ação de ectoparasitas na pele do animal muitas vezes o mantém sob estresse contínuo (WEGHER, 2010). Os principais ectoparasitos dos bovinos causam elevadas perdas econômicas aos produtores. Segundo estimativas de Grisi et al. (2014), dentre os ectoparasitos relevantes que afetam o bem-estar do gado, a produtividade no Brasil e elevado impacto econômico (em dólares), estão: carrapato bovino (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) - \$3,24 bilhões; mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) - \$2,56 bilhões; berne (*Dermatobia hominis*) - \$0,38 bilhões; mosca-da-bicheira (*Cochliomyia hominivorax*) - \$0,34 bilhões; e a mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) - \$0,34 bilhões.

Vários aspectos devem ser considerados para o controle de ectoparasitos, dentre eles o uso de pesticidas de base química; no longo prazo, o uso frequente destes produtos tem reduzido sua eficácia devido à seleção de resistência nas populações, sendo este um grande obstáculo atual. Entende-se

que o estabelecimento de um programa nacional de controle de parasitos e uma estratégia adequada de manejo de resistência a pesticidas refletirá direta e positivamente na saúde animal e indústria pecuária brasileira, bem como no sistema de saúde pública.

Taylor *et al.* (2001) estimaram que mais de 60% dos organismos infecciosos, conhecidos como patogênicos para seres humanos, são zoonóticos, e ainda, que há uma probabilidade maior de que patógenos de origem animal estejam mais associados às doenças emergentes (75%) do que a doenças não emergentes (TAYLOR *et al.*, 2001; PAROLA & RAOULT, 2001). Isto pode ocorrer, em parte, pela facilidade com que alguns ectoparasitos transitam entre habitats contaminados, animais e seres humanos (Figura 1). Assim, obter informações acerca da diversidade de microrganismos presentes em ectoparasitos, que possam atuar como transmissores de agentes patogênicos, paralelamente ao estudo de múltiplos fatores associados, pode contribuir para antecipar cenários futuros quanto a prevenção de novas doenças além de auxiliar na prospecção de novas moléculas com potencial para aplicações biotecnológicas. Atualmente, novas ferramentas estão disponíveis para auxiliar no estudo de microrganismos intra e entre-comunidades, mesmo aqueles não cultiváveis.

Explorando a diversidade microbiana

A metagenômica é uma abordagem baseada na análise genômica de uma população de microrganismos que permite identificar e avaliar comunidades microbianas em diferentes ecossistemas, incluindo aqueles não-cultiváveis (HANDELSMAN *et al.*, 2004). Amostras ambientais representativas de diferentes tipos de solo e águas podem ser estudadas quanto à diversidade da comunidade microbiana presente, sua estrutura e interação dinâmica; assim como insetos e artrópodes de interesse em saúde animal podem ser analisados em diferentes condições (estágios do ciclo, habitats, partes do corpo, hospedeiros, etc.). O recente progresso observado nos métodos de sequenciamento de DNA, chamados de sequenciamento de nova geração (New Generation Sequencing – NGS) e de alto rendimento, somados à variedade de ferramentas disponíveis em bioinformática, possibilitaram análises múltiplas de genomas (Figura 2).

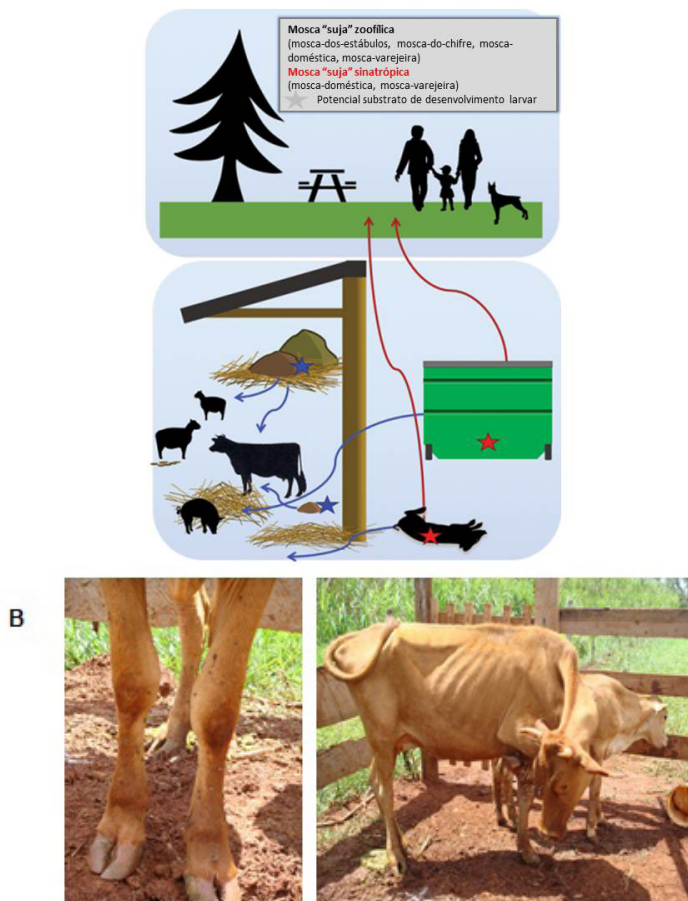


Figura 1. A proximidade entre animais e seres humanos e a possibilidade de relação entre eles via insetos ou outros ectoparasitos vetores. (A) Moscas que se reproduzem em ambientes ricos em micróbios, como substratos contaminados com esterco e estrume, lixo ou carcaça em decomposição, podem disseminar micróbios para animais domésticos, animais de produção e seres humanos. Como algumas moscas zoófilas são obrigatoriamente hematófagas (por exemplo, mosca-dos-estábulo, mosca-do-chifre, etc.), as larvas dessas moscas se desenvolvem no esterco e estrume dos animais nos quais os adultos se alimentam. Se esta reprodução ocorre em fazendas, os adultos disseminam micróbios dos habitats larvares para o gado (setas azuis). Moscas-domésticas e moscas-varejeiras são sinantrópicas e, portanto, têm o potencial adicional de disseminar micróbios para habitats domésticos (setas vermelhas). A mosca-dos-estábulo, em decorrência de surtos, também procura outros animais, além do bovino e seres humanos. Adaptado de Nayduch, 2017 (Special Collection: Filth Fly–Microbe Interactions. *Annals of the Entomological Society of America*, 2017, 2–5). (B) Bovino infestado por mosca-dos-estábulo, incomodado com a presença das moscas (Foto: Thadeu Barros - Embrapa Gado de Corte)

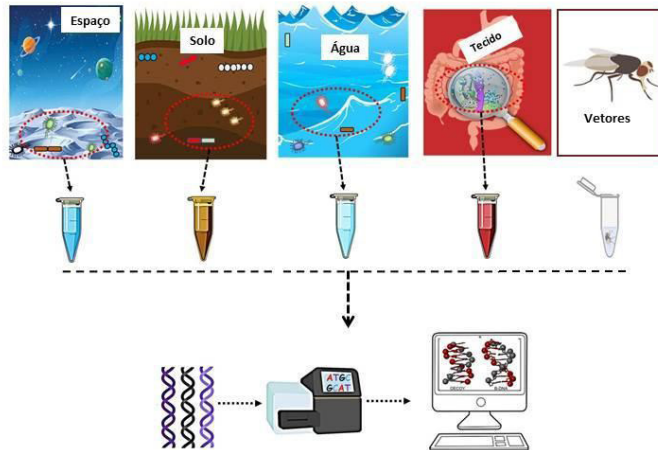


Figura 2. Representação esquemática de estudo metagenômico para análise de amostras ambientais. Um conjunto de microorganismos está presente nas amostras desde o início do processamento e são identificados pela análise de seus genomas. Adaptado de Verma, I., 2018 (Metagenomics in the Era of Next Generation Sequencing, Published in Reporting from the Lab/SciWorld - Ilustrador: Bhruyu Yagnik).

Dentre os componentes encontrados em diversas comunidades microbianas estão bactérias, vírus, protozoários, protistas, archaea e fungos. As interações entre hospedeiros e microrganismos são cada vez mais reconhecidas como um princípio onipresente na natureza (MORGAN *et al.*, 2013 citado por JUNQUEIRA *et al.*, 2017). Assim, todos estes componentes populacionais presentes em uma determinada condição, podem e devem ser estudados conjuntamente - ainda que sejam desconhecidos e não cultiváveis - pois cada microrganismo de fato não vive isoladamente e, assim seu metabolismo é influenciado pelo ecossistema em que se encontra, da mesma forma que o influencia. Assim sendo, uma cultura clonal falha em representar o verdadeiro estado de “relacionamento” na natureza, no que diz respeito à interação dos organismos e a variação genômica populacional, bem como, em relação às funções biológicas resultantes dessa interação. Apesar de todo avanço, a complexidade para apresentar informações significativas a partir de milhões de sequências de diferentes genomas, tem sido um grande desafio para a área de bioinformática (WOOLEY *et al.*, 2010).

Moscas-domésticas, moscas-varejeiras e uma diversidade de mosquitos foram recentemente analisadas quanto ao seu microbioma (ENGEL & MORAN, 2013; LEWIS & LIZÉ, 2015; FRAIHI *et al.*, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2016; KELLY *et al.*, 2017; JUNQUEIRA *et al.*, 2017). O fato de atuarem como vetores mecânicos e biológicos de agentes patogênicos e, principalmente, pela complexa aproximação a seus hospedeiros (surto, condições favoráveis, etc.) instigam novas descobertas pelo uso de ferramentas meta-ômicas. O mesmo tem ocorrido para ectoparasitos de bovinos e outros animais de produção, ainda que de forma incipiente.

Recentemente, a carga e a diversidade bacteriana presentes em moscas-domésticas e moscas-varejeiras foram identificadas em um estudo que avaliou separadamente quatro partes corporais que compõem os insetos (cabeça, tórax, abdômen e pernas/asas), para determinar as potenciais vias de dispersão microbiana por fatores mecânicos (JUNQUEIRA *et al.*, 2017). Apesar das asas e pernas terem uma pequena massa corporal, as mesmas apresentam uma maior área de superfície (Figura 2) e possuem a maior diversidade de espécies bacterianas, o que provavelmente, leva a um desempenho significativo na dispersão de bactérias por vetores mecânicos de um local de pouso para outro.

Conhecidos ectoparasitos de bovinos, a mosca-dos-estábulo e o carrapato-do-boi estão associados a uma variedade de agentes patogênicos (BALDACCHINO *et al.*, 2013; de la FUENTE *et al.*, 2008). Uma aquisição inicial de dados foi realizada para identificar a diversidade bacteriana do carrapato-do-boi, em 2011, pelo uso de pirosequenciamento-16S (ANDREOTTI *et al.*, 2011). Na China, *Rhipicephalus* daquela região foi analisado também quanto ao seu viroma (comunidade viral) natural. Muitas das sequências identificadas originaram de vírus que não haviam sido previamente descritos em carrapatos (XIA *et al.*, 2015).

Poucos estudos foram realizados a partir de mosca-dos-estábulo para avaliação da biodiversidade de microrganismos e, os disponíveis, apresentam certa limitação da informação obtida pelas metodologias, envolvendo apenas cultura ou análise pontual por clonagem molecular (MRAMBA *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2013; FÖRSTER *et al.*, 2007; HADI & AMERY, 2012; OLAFSON *et al.*, 2019). De qualquer forma, estes estudos demonstraram o papel da mosca como car-

reador de vários agentes patogênicos, tanto para seres humanos como para animais. Castro e colaboradores (2013) apresentaram resultados de isolamento bacteriano com grande prevalência de *Escherichia coli*. O isolamento e identificação de colônias bacterianas pós-cultivo de material obtido de 200 moscas coletadas apresentou um total de 159 agentes bacterianos, sendo a maioria (44/159 – 27.7%) identificada como *E. coli*. Neste estudo, genes de produção de Shiga toxina (*stx1*, *stx2* e *eae*) foram detectados em 13,6% das cepas de *E. coli* isoladas. A análise de três diferentes partes anatômicas da mosca-dos-estábulo pela Reação de Polimerase em Cadeia Multiplex (PCR Multiplex) revelou que as áreas mais frequentemente identificadas com *E. coli* Shiga toxigênica (do inglês Shiga toxin *Escherichia coli* - STEC) foram a superfície externa, seguida pelo trato digestivo abdominal e pelo aparelho bucal. Sendo STEC um microrganismo com reconhecido potencial patogênico, atenção deve ser dada à possibilidade de sua propagação e contaminação de alimentos por meio da mosca-dos-estábulo.

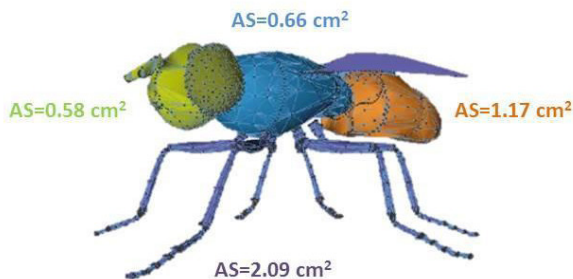


Figura 3. Modelo tridimensional de uma mosca (composta de 11.421 triângulos) usada para calcular uma estimativa da área de superfície (AS) das quatro partes do corpo. Asas e pernas, apesar do pequeno volume e massa, tem a maior área de superfície. Adaptado de JUNQUEIRA *et al.* (2017).

Recentemente, a mosca-dos-estábulo foi utilizada em análises genômicas por *metabarcoding* para comparar as comunidades microbianas bacterianas (marcador 16S) e eucarióticas (18S) em larvas de mosca e seus substratos de desenvolvimento (SCULLI *et al.*, 2017). A partir desta análise ficou demonstrado que a comunidade microbiana das larvas (diferentes habitats/substratos) é distinta daquelas encontradas nos substratos, ao mes-

mo tempo em que é menos diversificada, sugerindo que a fisiologia da larva hospedeira pode desempenhar um papel seletivo em relação ao enriquecimento e retenção dos microrganismos em *S. calcitrans*, como é observado em outros insetos (mecanismos digestivos/enzimas, etc.) (TERRA *et al.*, 1988; LEMOS & TERRA, 1991, MORAES *et al.*, 2010). Como discutido por SCULLI *et al.* (2017), uma possibilidade que merece investigação é que produtos antibacterianos secretados por bactérias que colonizam o intestino de *S. calcitrans* possam prevenir competição/colonização por outras espécies bacterianas.

Está descrito na literatura que bactérias são essenciais para o desenvolvimento de moscas-domésticas, assim como para a mosca-dos-estábulo (GINGRICH, 1960; LYSYK *et al.*, 1999). Embora possa haver proliferação de bactérias remanescentes no trato alimentar larvar no momento da pupação, a maioria delas é evacuada no pupário durante a emergência dos adultos (ROCHON *et al.*, 2005). Ainda que seja considerado que moscas adultas emergentes apresentem uma tendência a abrigar uma quantidade baixa de bactérias, numerosos estudos mostram que uma grande variedade de moscas adultas podem transportar bactérias resistentes a antimicrobianos (revisto em ONWUGAMBA *et al.*, 2018). Assim, a mosca-dos-estábulo e outros vetores que acometem animais de produção devem ser atentamente analisados quanto a este aspecto.

Segundo BALDACCHINO e colaboradores (2013) além de bactérias - vírus e protozoários também já foram associados à *S. calcitrans* e avaliados quanto à transmissão natural/experimental. Apesar de sua exposição a um conjunto de micróbios em diferentes fases do desenvolvimento, a transmissão biológica a partir de moscas-dos-estábulo tem sido demonstrada apenas para *Habronema microstoma* e *Enterobacter sakazakii* (revisto em BALDACCHINO *et al.*, 2013), enquanto a transmissão mecânica está associada à anemia equina infecciosa, gripe suína africana, febre do Nilo, tripanossomoses e *Besnoitia* spp., entre outras. Análises genômicas que abordem também estes demais microrganismos e que permitam a identificação de outras espécies e/ou cepas devem contribuir em vários aspectos biológicos e fisiológicos, inclusive por permitir novas abordagens que podem auxiliar a mitigar problemas de surtos em função de controle biológico e resistência a inseticidas, entre outros.

As diferentes abordagens para análise metagenômica

A análise metagenômica se inicia com um desenho experimental (um *pipeline*) amplo e com definições claras, as quais se concretizam mediante a hipótese a ser validada/buscada (Figura 4, modelo sugerido por QUINCE *et al.*, 2017). Aqui são apresentadas, de uma maneira bastante resumida, as etapas de desenvolvimento de uma análise metagenômica (leitura sugerida: WOLLEY *et al.*, 2010).

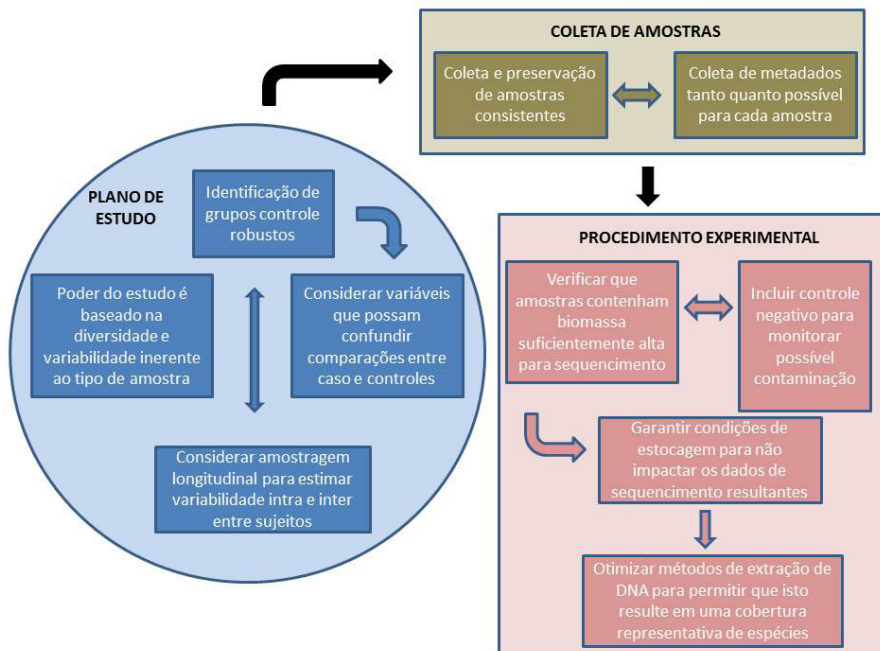


Figura 4. Exemplo de fluxo de trabalho para planejamento de estudos metagenômicos. A orientação apresentada aqui é direcionada a pesquisadores iniciantes nesta área. As principais considerações para o desenho do estudo (caixa azul), coleta de amostras (caixa verde) e procedimentos experimentais (caixa rosa) são destacadas. A compreensão do potencial de fatores de confusão e a otimização do planejamento podem melhorar substancialmente a qualidade dos dados da sequência metagenômica e da interpretação. Adaptado de QUINCE *et al.*, 2017.

O primeiro passo neste tipo de estudo é estabelecer os parâmetros para as amostras “ambientais” (número de amostras/coletas necessárias). A amostra deve representar a população da qual ela está sendo retirada, e seu tamanho pode influenciar diretamente na riqueza de espécies. Então, uma das possibilidades é utilizar curvas de rarefação ou outras métricas disponíveis para estimativa da fração de espécies sequenciadas (estudo piloto), ou seja, o número de espécies em função do número de indivíduos amostrados (HAEGEMAN *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-R & KONSTANTINIDIS, 2014). O platô desta curva, ou sua inclinação, tende a indicar que poucas espécies estão sendo descobertas por amostra (considera-se que há uma pouca contribuição da amostragem no número total de unidades taxonômicas operacionais - OTUs). Ainda em relação à amostragem, é importante ressaltar que metadados devem ser registrados de forma padronizada, abrangente e rigorosa (características físicas, químicas e ambientais, informações clínicas, história médica, características genéticas, entre outras), permitindo uma correlação entre os dados de sequências genômicas e os metadados relacionados. Há inclusive uma recomendação de informações mínimas em genômica e metagenômica (MIGS/MIMS, do inglês: *Minimal Information of Genome Sequence or Metagenome Sequence*) publicadas por FIELD e colaboradores (2008), que auxiliam a delinear estratégias de obtenção e registros de dados.

Feita a extração de DNA, duas abordagens diferentes podem ser realizadas pela metagenômica, baseadas em sequenciamento de nova geração (*New Generation Sequencing* – NGS): *metabarcoding* e *shotgun*. Basicamente, na estratégia a partir de metabarcoding (ou targeted) utiliza-se de um iniciador (*primer*) que irá amplificar uma sequência altamente conservada em regiões hipervariáveis/específicas do grupo microbiológico de interesse. Em bactérias amplifica-se a região 16S, em fungos a 18S e em Archaea a região ITS, as quais serão posteriormente sequenciadas (PAVAN-KUMAR *et al.*, 2015). Dentre as diversas limitações, destaca-se que o sequenciamento de *amplicons* é limitado à análise de táxons para os quais são conhecidos os marcadores genéticos taxonomicamente informativos, ou seja, apenas o que já é conhecido pode ser identificado. Adiciona-se a esta limitação a realização de amplificação do gene alvo, o que pode levar a uma estimativa da diversidade que não reflete a realidade. Além disso, análises a partir da região 16S podem resultar em superestimação da diversidade da comunidade, pois este loco pode ser transferido entre taxa distante (ou seja, transferência horizontal de genes) (ACINAS *et al.*, 2004).

Quando se trata de *shotgun* (QUINCE *et al.*, 2017), o sequenciamento de DNA é feito sem direcionamento (*untargeted*), ou seja, todos os genomas microbianos presentes em uma amostra, quer sejam procariotos, eucariotos ou vírus serão sequenciados simultaneamente. Várias das limitações encontradas pelo uso de *metabarcoding* podem ser prevenidas. Ao invés de ter como “alvo” um loco genômico específico para amplificação, todo o DNA obtido da amostra ambiental é fragmentado e sequenciado independentemente. Como resultado, as várias sequências de DNA (isto é, *reads*) ao serem analisadas irão se alinhar as regiões genômicas homólogas dos diferentes genomas presentes na amostra, incluindo os não-micróbios. Alguns desses reads serão complementares a locos gênicos taxonomicamente informativos (16S, 18S, ITS) enquanto outras serão complementares a sequências codificantes (genes) que fornecem informações sobre as funções biológicas codificadas no genoma. Assim, pela análise de dados metagenômicos de *shotgun* pode-se responder concomitantemente duas perguntas importantes a respeito de uma dada comunidade microbiana: o que está lá e o que é capaz de fazer? (revisito em ACINAS *et al.*, 2014). São muito específicas as questões que levam à escolha de uma abordagem ou outra, estando relacionadas principalmente à pergunta ou hipótese que se quer provar.

A partir da obtenção dos dados brutos de sequenciamento (*raw reads*), uma análise em cadeia baseada em bioinformática é empregada para se alcançar as principais questões envolvidas em estudo de metagenômica (Figura 5). Como parte do processamento dos *reads*: filtragem pela qualidade, remoção de adaptadores, trimagem (processo de limpeza), entre outros. E finalmente, montagem e anotações; criação e processamento de OTUs para avaliação da abundância, diversidade e riqueza; análise taxonômica e filogenética. Diversos recursos e plataformas online, assim como programas para download estão disponíveis em websites, facilitando as análises de bioinformática (DUDHAGARA *et al.*, 2015). Como exemplos destacam-se: MG-RAST (<https://metagenomics.anl.gov/>), IMG/M (<http://img.jgi.doe.gov/m>), METAREP (<http://jcv.org/metarep/>), MOTHUR (<https://www.mothur.org/>), QIIME (<http://qiime.org/>). De iniciativa nacional, o Stingray@Galaxy (<http://galaxy.biowebdb.org>) auxilia as análises sem a necessidade de conhecer sistemas operacionais e nem de instalar ferramentas de bioinformática (WAGNER *et al.*, 2014). A plataforma Galaxy foi desenvolvida por um grupo de pesquisadores da Johns Hopkins University. Seu código é aberto e permite que desenvol-

vedores no mundo inteiro colaborem com sua evolução. Diversas funcionalidades do STINGRAY foram portadas para a plataforma Galaxy, surgindo assim o Stingray@Galaxy. Para uma lista mais completa e atualizada consultar <https://www.biostars.org/p/58279/>, considerando sempre a velocidade de desenvolvimento de novos softwares nesta área.

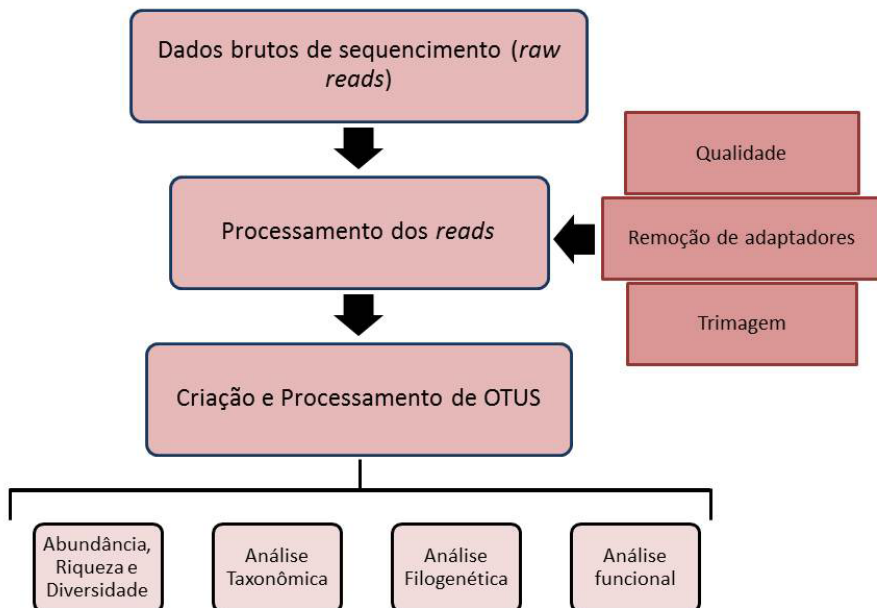


Figura 5. Análise de bioinformática aplicada à metagenômica. Um conjunto de etapas são realizadas para tratamento dos dados brutos de sequenciamento do genoma total da microbiota (microbioma). A qualidade geral do material a ser analisado (após pareamento, trimagem, estatística, etc) influencia na criação de OTUs e toda análise posterior.

Considerações finais

Os resultados obtidos pelo uso de ferramentas como a metagenômica não visam apenas a descrição do mundo microbiano, mas também podem ser usados em vigilância biológica, avaliação da segurança alimentar ou até prover novidades para a indústria (MALACRINÓ, 2018). À medida em que as relações microrganismos-ectoparasitos-ambiente sejam compreendidas,

estas poderão ser manipuladas visando seu uso no controle biológico de pragas, ou seja, na utilização de inimigos naturais ou seus metabólitos para controle populacional ou extinção de um dado organismo. Esta importância está refletida nas novas diretrizes internacionais de produção que visam favorecer a conservação e o uso sustentável dos recursos biológicos.

O conhecimento do ambiente microbiano e sua relação com o hospedeiro e o ambiente pode ainda impulsionar as indústrias farmoquímica, química e farmacêutica, dada a prospecção de novos organismos ainda não descritos, bem como novas e diferentes moléculas antimicrobianas que poderão ser utilizadas nas mais diferentes abordagens, inclusive na formulação de novos medicamentos.

Referências

ACINAS, Silvia G. et al. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2629-2635, 2004.

BALDACCHINO, Frédéric et al. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. **Parasite**, v. 20, 2013.

CASTRO, Bruno G. de et al. Aerobic bacterial microbiota in *Stomoxys calcitrans*: preliminary studies in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, p. 193-197, 2007.

CASTRO, B. G. et al. Enterobacterial microbiota on *Stomoxys calcitrans* external surface. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, n. 1-2, p. 22-24, 2010.

CASTRO, Bruno Gomes et al. Occurrence of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 318-321, 2013.

DE LA FUENTE, Jose et al. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Front Biosci**, v. 13, n. 13, p. 6938-6946, 2008.

DUDHAGARA, Pravin et al. Web resources for metagenomics studies. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 13, n. 5, p. 296-303, 2015.

ENGEL, Philipp; MORAN, Nancy A. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 699-735, 2013.

FIELD, Dawn et al. The minimum information about a genome sequence (MIGS) specification. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 541, 2008.

FOSTER, M. KLIMPEL, S., MEHLHORN, H., SIEVERT, K., MESSLER, S., PFEFFER, K., Pilot study on synanthropic flies (e.g. *Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fannia*, *Lucilia*, *Stomoxys*) as vectors of pathogenic microorganisms. **Parasitol Research**, v.101, p.243246, 2007.

FRAIHI, Wael et al. An integrated overview of the midgut bacterial flora composition of *Phlebotomus perniciosus*, a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in the Western Mediterranean Basin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. e0005484, 2017.

GINGRICH, Richard E. Development of a synthetic medium for aseptic rearing of larvae of *Stomoxys calcitrans* (L.). **Journal of Economic Entomology**, v. 53, n. 3, p. 408-411, 1960.

HAEGEMAN, Bart et al. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. **The ISME Journal**, v. 7, n. 6, p. 1092, 2013.

HANDELSMAN, Jo. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.

KELLY, Patrick H. et al. The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. **MBio**, v. 8, n. 1, p. e01121-16, 2017.

HADI, A. M., & AL-AMERY, A. M. A., Isolation and identification of some blood parasites from midgut of stable fly (*Stomoxys calcitrans*). **Al-Qadisiya Journal of Vet. Med. Sci.** v. 11 (1), p. 2833, 2012.

JUNQUEIRA, A. C. M. et al. The microbiomes of blowflies and houseflies as bacterial transmission reservoirs. **Sci Rep** 7: 16324. 2017.

LEMONS, F. J.; TERRA, Walter R. Digestion of bacteria and the role of midgut lysozyme in some insect larvae. Comparative biochemistry and physiology. B, **Comparative Biochemistry**, v. 100, n. 2, p. 265-268, 1991.

LEWIS, Zenobia; LIZÉ, Anne. Insect behaviour and the microbiome. **Current Opinion in Insect Science**, v. 9, p. 86-90, 2015.

LYSYK, T. J. et al. Rearing stable fly larvae (Diptera: Muscidae) on an egg yolk medium. **Journal of Medical Entomology**, v. 36, n. 3, p. 382-388, 1999.

MALACRINÒ, Antonino. Meta-omics tools in the world of insect-microorganism interactions. **Biology**, v. 7, n. 4, p. 50, 2018.

MONTEIRO, Carolina Cunha et al. Bacterial diversity of the American sand fly *Lutzomyia intermedia* using high-throughput metagenomic sequencing. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 480, 2016.

MORAES, Ana Paula Rodrigues; BITTENCOURT, Vânia Rita Elias Pinheiro; BITTENCOURT, Avelino José. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* sobre estágios imaturos de *Stomoxys calcitrans*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1802-1807, 2010.

MORGAN, Xochitl C.; SEGATA, Nicola; HUTTENHOWER, Curtis. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 1, p. 51-58, 2013.

MRAMBA, F.; BROCE, A. B.; ZUREK, L. Vector competence of stable flies, *Stomoxys calcitrans* L.(Diptera: Muscidae), for *Enterobacter sakazakii*. **Journal of vector Ecology**, v. 32, n. 1, p. 134-140, 2007.

NAYDUCH, Dana. Special collection: filth fly–microbe interactions. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 110, n. 1, p. 2-5, 2017.

OLAFSON, Pia U. et al. Functional genomics of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, reveals mechanisms underlying reproduction, host interactions, and novel targets for pest control. **BioRxiv**, p. 623009, 2019.

ONWUGAMBA, Francis C. et al. The role of ‘filth flies’ in the spread of antimicrobial resistance. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 22, p. 8-17, 2018.

PAROLA, Philippe; RAOULT, Didier. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 897-928, 2001.

PAVAN-KUMAR, A.; GIREESH-BABU, P.; LAKRA, W. S. DNA metabarcoding:

a new approach for rapid biodiversity assessment. **J Cell Sci Mol Biol**, v. 2, n. 1, p. 111, 2015.

QUINCE, Christopher et al. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 833, 2017.

ROCHON, K.; LYSYK, T. J.; SELINGER, L. B. Retention of *Escherichia coli* by house fly and stable fly (Diptera: Muscidae) during pupal metamorphosis and eclosion. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 3, p. 397-403, 2005.

RODRIGUEZ-R, Luis M.; KONSTANTINIDIS, Konstantinos T. Estimating coverage in metagenomic data sets and why it matters. **The ISME Journal**, v. 8, n. 11, p. 2349, 2014.

SCULLY, Erin et al. Microbial communities associated with stable fly (Diptera: *Muscidae*) larvae and their developmental substrates. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 110, n. 1, p. 61-72, 2017.

TAYLOR, Louise H.; LATHAM, Sophia M.; WOOLHOUSE, Mark EJ. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 356, n. 1411, p. 983-989, 2001.

TERRA, Walter R. et al. The larval midgut of the housefly (*Musca domestica*): ultrastructure, fluid fluxes and ion secretion in relation to the organization of digestion. **Journal of Insect Physiology**, v. 34, n. 6, p. 463-472, 1988.

XIA, Han et al. Metagenomic profile of the viral communities in *Rhipicephalus* spp. ticks from Yunnan, China. **PloS One**, v. 10, n. 3, p. e0121609, 2015.

WAGNER G, et al. STINGRAY: system for integrated genomic resources and analysis. **BMC Res Notes**. 2014;7:132. Published 2014 Mar 7.

WOOLEY, John C.; GODZIK, Adam; FRIEDBERG, Iddo. A primer on metagenomics. **PLoS Computational Biology**, v. 6, n. 2, p. e1000667, 2010.

Embrapa

Gado de Corte



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



CGPE 15702