

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Wesley dos Santos Silva

VARIAÇÃO NA ESTRUTURA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS ASSOCIADAS À
INFECÇÃO POR *HAEMONCHUS CONTORTUS* EM OVELHAS MORADA NOVA

São Carlos

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Wesley dos Santos Silva

VARIAÇÃO NA ESTRUTURA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS ASSOCIADAS À
INFECÇÃO POR *HAEMONCHUS CONTORTUS* EM OVELHAS MORADA NOVA

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade
Federal de São Carlos.

Orientadora: Dra. Luciana Correia de Almeida
Regitano.

Co-Orientador: Dr. Anderson Ferreira da Cunha.

São Carlos

2023

AGRADECIMENTOS

A Deus e minha família por ter chegado até aqui. Especialmente a minha avó, Araci Pereira dos Santos, carinhosamente chamada por mim por “Dona Araci”. Ela simplesmente é a coisa mais importante da minha vida e sou grato por ter a honra de ser cuidado e aconselhado por ela todos esses anos, por todas as broncas recebidas e principalmente por toda oração e confiança depositada em seu “neto favorito”. Te amo vó e sou muito grato por você na minha vida.

Agradeço ao meu padrinho Marcos por ter possibilitado que eu concretizasse o sonho de me graduar em uma faculdade federal em outra cidade e por ser um exemplo para mim sobre cuidado e se realizar com a realização dos que estão próximos da gente.

Agradeço a minha mãe, Renata, por ter sempre feito mais do que era possível para me dar uma boa educação, formar meu caráter, me sustentar e apoiar desde o meu nascimento. A conclusão desse ciclo é um presente, tanto para mim, quanto para as pessoas importantes na minha vida.

Agradeço a Jéssica Rodrigues dos Santos por ser meu suporte emocional, minha conselheira, minha amiga e, principalmente, por ser a irmã que eu não tive. Todos esses anos até aqui eu sempre pude contar com você nas melhores e piores horas e sou grato por isso.

Agradeço a todos os professores que passaram por minha vida e que de alguma forma me incentivaram e me inspiraram a chegar até aqui, em especial a minha orientadora Luciana Regitano por ter tornado esse trabalho possível. Alguns nomes também merecem reconhecimento na minha trajetória: Maria Lúcia, Maria Regina e Tatiane Comin. Todas me ensinaram algo muito importante sobre mim e sobre a vida e sou grato por isso.

Agradeço aos companheiros de laboratório por todos os aprendizados e colaborações, em especial a Tainã Figueiredo Cardozo por me auxiliar e orientar no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos, primeiramente aos mais antigos e que sei que posso contar por toda minha vida - Matheus Willian, Bruna Dos Reis e Karen Gabriela. Ao “Hope” por completo por todos esses anos de amizade. Agradeço a Carol, Davi e Heitor por conviver

comigo durante esses anos dividindo o lar e a vida. Ao Josemar Oliveira por ser um exemplo de pesquisador e amigo. A Ellen Sousa, Giovanni Oliveira, Lucca Rocha e Semira Silva por serem meu suporte durante os últimos quase seis anos.

Por fim, agradeço a mim. Apesar do longo caminho cheguei até aqui com muito aprendizado, sensação de realização pessoal e orgulho de toda minha trajetória.

*“Cê vai atrás desse diploma com a fúria
da beleza do Sol, entendeu? Faz isso por nós, faz
essa por nós, te vejo no pódio!”*

Amarelo - Emicida

RESUMO

Morada Nova é uma raça de ovelhas deslanadas adaptadas ao clima tropical do país e que possuem aptidão relacionada à produção de carne e couro. As infecções por nematóides gastrintestinais representam um dos problemas mais críticos na produção de ovinos, agravados pelo aumento da resistência devido ao uso indiscriminado de drogas anti-helmínticas. O presente trabalho teve como objetivo identificar marcadores microbiológicos nas fezes e no conteúdo ruminal de ovinos com alta e baixa carga parasitária do nematóide *Haemonchus contortus*, por meio de abordagens da correlação de rede. Foram selecionados cordeiros extremos em termos de alta (N=11) e baixa (N=10) carga parasitária após dois desafios parasitológicos por infecção artificial com larvas infectantes de *H. contortus*. As amostras de fezes e de conteúdo ruminal foram coletadas e sequenciadas para os genes codificadores do rRNA 16s bacteriano. A análise da rede de correlação, realizada pelo software WGCNA, identificou um módulo de variantes de sequência de amplicon (ASV) nas fezes e dois módulos de ASVs no conteúdo ruminal. Os módulos identificados em ambos os ambientes estão significativamente associados à alta carga parasitária. Os resultados obtidos destacam a presença de *Prevotella* sp., *Treponema* sp., *Fibrobacter* sp., *Shuttleworthia* sp. e a família *Bacteroidales* *BS11 grupo intestinal* como microrganismos potencialmente envolvidos na disponibilidade energética após a infecção por *H. contortus*, dado que esses microrganismos atuam na degradação de matéria celulósica em animais ruminantes. O butirato, produto da digestão celulósica pelos gêneros *Shuttleworthia* sp. e *Prevotellaceae* *UCG-001* sp., tem potencial influência na modulação do sistema imune por seu papel anti-inflamatório. Além disso, a mucina tem possível influência no controle de infecção por nematóides gastrintestinais (GIN) e está relacionada ao gênero *Akkermansia*. Nossos resultados permitem uma melhor compreensão de microrganismos que podem estar envolvidos na determinação do fenótipo em ovinos Morada Nova e sugerem potenciais microrganismos como alvos de intervenções ou como marcadores de infecção por *H. contortus*.

Palavras-chave: Nematóides, Variantes de sequências de amplicons, Butirato, Ácidos graxos de cadeia curta, Mucina.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Tamanho do rebanho brasileiro de ovinos em número de cabeças.....	14
Figura 2 - Delineamento experimental e fenotipagem.....	22
Figura 3 - Frequência de ASVs por gêneros de arqueias em FZ e CR.....	26
Figura 4 - PCAs de normalização dos dados de FZ.....	27
Figura 5 - PCAs de normalização dos dados de CR.....	27
Figura 6 - Dendograma de clusterização de ASV de FZ.....	28
Figura 7 - Dendograma de clusterização de ASV de CR.....	29
Figura 8 - Correlação entre módulos e o fenótipo AC em FZ.....	29
Figura 9 - Correlação entre módulos e o fenótipo AC em CR.....	30
Figura 10 - Frequência de ASVs por gênero bacteriano em FZ.....	31
Figura 11 - Frequência de ASVs por gênero bacteriano em CR.....	32
Figura 12 - Frequência de <i>hubs</i> ASVs por gênero em CR (rosa e amarelo) e FZ (marrom)...	33

LISTA DE SIGLAS

ASV	Variantes de sequências de amplicon
CR	Conteúdo ruminal
FZ	Fezes
GIN	Infecção por nematóides gastrintestinais
GMD	Ganho de médio diário
ME	Módulo Eigengene
NGS	Sequenciamento de nova geração
OPG	Ovos por grama de fezes
P _{AJ}	Peso ajustado
VG	Volume globular
WGCNA	<i>Weighted Gene Co-expression Network Analysis</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais métricas do valor de <i>escore</i> de classificação fenotípico.....	23
Tabela 2 - Principais famílias identificadas entre as <i>hubs</i> ASVs dos módulos significativos.	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OVELHAS MORADA NOVA E SEU POTENCIAL NA OVINOCULTURA	13
1.2 INFECÇÃO POR NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS: <i>Haemonchus contortus</i>	14
1.3 DIAGNÓSTICO, FENÓTIPO E TRATAMENTO	15
1.4 IMPORTÂNCIA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS NO PERFIL FENOTÍPICO	16
1.5 ANÁLISE DE REDE DE CO-ABUNDÂNCIA: WGCNA	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. METODOLOGIA	21
3.1 DIRETRIZES DE ÉTICA	21
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E MANEJO	21
3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE MICROBIOTA	23
3.4 PROCESSAMENTO E ENRIQUECIMENTO DE SEQUÊNCIAS	24
3.6 CORREÇÃO DO EFEITO DAS CORRIDAS	24
3.7 ANÁLISE DE REDES DE CO-ABUNDÂNCIA	24
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	34
5.1 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE DIGESTÃO	34
5.2 REGULAÇÃO IMUNOLÓGICA POR BUTIRATO	35
5.3 PRODUÇÃO DE MUCINAS	37
5.4 VIÉS DE DISBIOSE	38
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 OVELHAS MORADA NOVA E SEU POTENCIAL NA OVINOCULTURA

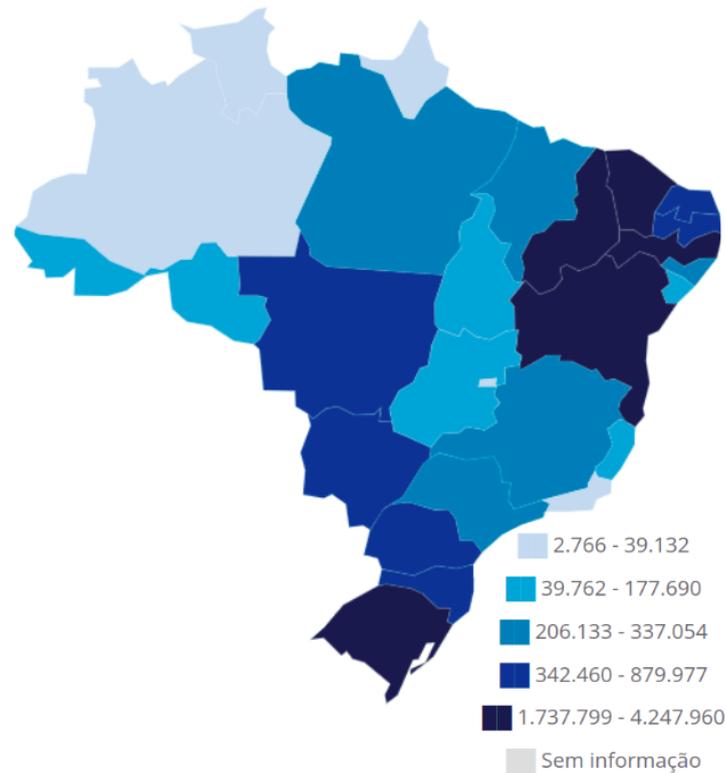
É possível distinguir aproximadamente 1.400 raças de ovinos pelo mundo (JARDIM, 1987). Essas raças apresentam características que as diferem segundo sua adaptação a condições ambientais e desempenho econômico. Os principais produtos obtidos a partir da ovinocultura são predominantemente a lã, o leite, a carne e a pele (JARDIM, 1987). A raça escolhida para criação pode variar conforme critérios de adaptação às condições ambientais (FACÓ et al., 2008), sistemas de criação e desafios parasitológicos (AMARANTE et al., 2004). Contudo algumas raças mostram facilidade adaptativas frente a outras. Ovinos com características rústicas apresentam fácil adaptação às condições adversas e são majoritariamente produtores de pele e carne (FACÓ et al., 2008).

A ovinocultura brasileira, em 2021, abrangia 20.574.474 cabeças (IBGE, 2021). A região Nordeste representa o principal volume da criação de ovinos, totalizando 69,92% do rebanho nacional (**Figura 1**). A raça Morada Nova é uma das principais raças de ovinos rústicos deslanados da região Nordeste, mas também há criações em outras regiões, por exemplo no Sudeste e Centro-Oeste. Economicamente os ovinos Morada Nova possuem aptidão para produção de carne (FIGUEIREDO et al., 1982; SILVA, 2004), e pele de qualidade, tendo couro mais espesso e resistente (JACINTO, 2004). São animais de porte pequeno, sexualmente precoces (SILVA, 1988), com alta procriação e não possuem reprodução de forma sazonal (FACÓ et al., 2008).

Além de bem adaptados ao clima semi-árido, a raça Morada Nova apresenta maior resistência a verminoses gastrintestinais, característica genética muito importante para uso em sistemas de produção. O estudo realizado por Issakowicz et al. (2016), avaliou as raças Santa Inês e Morada Nova segundo peso, condição corporal, escore Famacha (VAN WYK & BATH, 2002), contagem de ovos fecais, coprocultura e índices hematológicos. Os resultados indicaram que as infecções por nematódeos gastrintestinais (GIN) foram principalmente causadas por *Haemonchus contortus*. Todavia as matrizes Morada Nova apresentaram menor taxa de infecção 30 dias pós-parto, período em que normalmente é encontrada maior susceptibilidade de ovinos aos GIN. A resistência a verminoses pode beneficiar a qualidade

de vida dos ovinos, reduzir os custos com vermifugação e sistema de produção, favorecer o controle da resistência helmíntica aos medicamentos disponíveis, além da redução dos efeitos prejudiciais do parasitismo ao metabolismo (TOSCANO, 2019).

Figura 1 - Tamanho do rebanho brasileiro de ovinos em número de cabeças.



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021¹

1.2 INFECÇÃO POR NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS: *HAEMONCHUS CONTORTUS*

Doenças parasitárias causadas por GINs são consideradas um dos principais fatores que limitam a produção de pequenos ruminantes. Dentre os GINs prejudiciais à ovinocultura os gêneros em destaque são da família *Trichostrongylidae*: *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Cooperia* e *Nematodirus*. Os helmintos do gênero *Haemonchus contortus* podem chegar a representar 80% da carga parasitária do nordeste brasileiro (CHARLES, 1995; SOUZA et al., 2013). O gênero foi identificado por Braga e Girardi (1991) em rebanho de ovinos com alta prevalência ao longo de todo o ano de experimento.

¹Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>>. Acesso em: 30 de setembro de 2022.

As infecções por GIN levam à redução da digestão, absorção e do consumo de alimentos. O resultado desse déficit energético é a perda de peso, diminuição da produtividade e reprodutibilidade, aumento da mortalidade de animais com baixo peso e o aumento do gasto com vermifugação do rebanho (LI et al., 2016; DE FREITAS, 2017). Todos esses sintomas podem ser observados como uma grande perda econômica no processo de criação animal (O'CONNOR et al., 2007; CHAGAS, 2022).

O hábito hematófago do parasito *H. contortus* causa lesões na mucosa gastrointestinal de seus hospedeiros uma vez que larvas e parasitos adultos se alojam no tecido do abomaso (CHAGAS, 2022). Os sinais clínicos observados durante a infecção são utilizados para o diagnóstico. Na fase aguda da doença é possível identificar anemia e edema submandibular, diarreia, perda de apetite, redução no ganho de peso, pelos arrepiados e sem brilho (GENNARI et al., 1991; FONSECA et al., 2011).

1.3 DIAGNÓSTICO, FENÓTIPO E TRATAMENTO

Animais acometidos por GINs apresentam três fenótipos possíveis para a relação parasito-hospedeiro: resiliente, resistente e suscetível (ALBERS et al. 1987; WOOLASTON & BAKER, 1996). Segundo Albers et al. (1987) o fenótipo resiliente é caracterizado por uma infecção moderada, ou seja, sem queda brusca no desempenho de produção e contagem parasitária mantida estável. A resistência é uma característica de ovinos que possuem capacidade de supressão da infecção, ainda que em ambiente com alta exposição ao parasita, apresentando baixa contagem de larva, menor quantidade de parasitas adultos e até mesmo recuperação do caso infeccioso. Animais suscetíveis por sua vez apresentam sintomas clínicos acentuados e uma carga parasitária maior, podendo chegar a morte em casos extremos (ALBERS et al. 1987; WOOLASTON & BAKER, 1996).

O diagnóstico do avanço da infecção nos animais pode ser realizado com base em seus sintomas, servindo também para o tratamento seletivo. A contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) é uma das formas de avaliação do perfil infeccioso em ovinos. Segundo Amarante (2000) a contagem de OPG apresenta alta correlação ($r = 0,91$) com a carga parasitária de *H. contortus* em ovinos. Além da avaliação, a aplicação de drogas anti-helmintos é regularmente usada no tratamento e controle parasitário no rebanho. O uso do anti-helmíntico monepantel em dosagem de 1ml/10kg teve eficiência no tratamento de

animais infectados (MENDES et al., 2020). A adequada seleção de indivíduos suscetíveis a GIN para tratamento com drogas anti-helmínticas é essencial para a medicação do menor número possível de animais (FERNANDES et al. 2015). O tratamento inadequado com drogas anti-helminto é um fator de seleção para resistência dos helmintos à medicação (MENDES et al., 2020). A resistência aos principais grupos de drogas usadas para tratar GIN em ovinos, incluindo drogas como monepantel, benzimidazóis, levamisol, ivermectina e moxidectina (VIANA et al., 2021; GEORGE et al., 2021) tem se tornado um problema crescente em todo o mundo. Além do problema gerado com a ineficácia do uso das drogas o custo do manejo e manutenção da criação de ovinos se torna maior, tendo um impacto econômico na ovinocultura (CHAGAS et al., 2022).

1.4 IMPORTÂNCIA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS NO PERFIL FENOTÍPICO

O rúmen é o principal compartimento do sistema digestório de animais ruminantes. Formado por um complexo ecossistema anaeróbico, o microbioma ruminal abriga bactérias, arqueias, fungos e protozoários. Estudos sobre o impacto das interações entre parasitas gastrointestinais, a microbiota e o sistema imune do hospedeiro têm surgido e apontado a infecção por GIN como um fator de modificação da microbiota típica dos hospedeiros, ocasionando a disbiose do microambiente (CÓRTEZ et al., 2020; EL-ASHRAM et al., 2017). A disbiose é caracterizada por um desequilíbrio na microbiota intestinal que produz efeitos prejudiciais ao organismo (ALMEIDA, 2009). Em infecções por *H. contortus* foi observada uma mudança de 98% e 94% dos gêneros no perfil bacteriano abomasal e ruminal respectivamente (EL-ASHRAM et al., 2017). O aumento da população de bactérias envolvidas com processos pró-inflamatórios também é observada na presença do nematóide *Teladorsagia circumcincta* (CÓRTEZ et al., 2020). A mudança do perfil de microbioma também atinge o nematóide. Gêneros abundantes do abomaso do hospedeiro, *Prevotella* sp. e *Fibrobacter* sp., foram adquiridos por nematóides adultos (HOGAN et al., 2019).

Além da modificação da microbiota de forma direta, a modificação do microambiente do abomaso pode ser observada e por sua vez ter influência na microbiota. Segundo El-Ashram (2017) a infecção por *Haemonchus* aumentou o pH gástrico abomasal. Observar o comportamento funcional dos microrganismos do rúmen ainda é um gargalo no estudo de

microbiomas, uma vez que estes são majoritariamente microrganismos não-cultiváveis. O sequenciamento de nova geração (NGS) nos permitem aplicar abordagens distintas para estimar a composição, abundância e influência de dietas na comunidade ruminal através das análises de bioinformática (LOPES et al., 2015; GHANBARI et al., 2020; LI et al., 2022). Os principais membros dessa comunidade microbiana são atualmente conhecidos. A microbiota ruminal em ovelhas tem como principais componentes os *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*, sendo *Prevotella* sp. o gênero observado com mais de 30% do total da comunidade microbiana (LOPES et al., 2015). A presença de tais microrganismos indica um conteúdo enzimático vasto em degradação de fibras (LOPES et al., 2015).

A simbiose entre os microrganismos e o seu hospedeiro tem papel fundamental na provisão de nutrientes, carboidratos e proteínas para o organismo hospedeiro (PENG et al., 2015; FISHER et al., 2017). A subnutrição dos indivíduos de um rebanho além de um sintoma pode ser um fator de suscetibilidade a GIN e intimamente ligada ao desbalanço da comunidade microbiana dos hospedeiros, podendo afetar o funcionamento do sistema imune e processo de resistência a infecções por GIN (BROSSCHOT & REYNOLDS, 2018).

1.5 ANÁLISE DE REDE DE CO-ABUNDÂNCIA: *WGCNA*

A seleção de indivíduos com base no perfil genético para determinadas características comerciais ganhou maior ênfase com o avanço das ciências ômicas. O sequenciamento genômico de indivíduos somado à análise de dados são capazes, por exemplo, de monitorar a diversidade genética entre indivíduos com fenótipos distintos e identificar marcadores genotípicos para características de interesse.

Observar os dados de forma completa e conexa é o objetivo da área nomeada por “biologia de sistemas”, concentrando dados de diferentes naturezas em análises mais robustas na busca de respostas para comportamentos biológicos complexos (RITCHIE et al., 2015). O método *Weighted Gene Co-expression Network Analysis* (WGCNA) (ZHAO et al., 2010), foi adaptado para ser usado para mapear a conexão entre abundância de microrganismos e detectar conjuntos de variantes de sequências de amplicons (ASV) que estão conectados entre si, sendo esses conjuntos denominados os módulos de co-abundância .

O conceito da formação de uma rede é a conexão entre nós por meio de arestas. Na análise WGCNA, os nós são os artefatos, por exemplo, ASVs. As arestas que conectam os nós são os valores de significância de sua co-abundância. Assim, um artefato é conectado com outro à medida que ambos apresentam abundância significativa em uma mesma amostra e em níveis de abundância semelhantes (ZHANG & HORVATH, 2005). Ao contrário de uma rede Bayesiana que busca a causa da relação entre nós, WGCNA assume que todos os artefatos estão conectados e a força de conexão é quantificada por meio da correlação de suas abundâncias (ZHAO et al., 2010).

A estrutura de uma rede pode ser com conexões binárias (1: conectado, 0: não conectado) ou de forma ponderada. O método WGCNA, como o nome indica, pondera a conexão dos artefatos utilizando uma matriz de adjacência, calculada a partir dos valores de similaridades de abundância, elevada a uma potência, *soft thresholding* (β). O uso de uma rede ponderada garante menor perda de informações por meio do uso de valores contínuos na correlação entre artefatos de uma rede (LANGFELDER & HORVATH, 2008). O *soft thresholding* suprime baixos valores de correlação entre os artefatos quando $\beta > 1$, ou seja, potencializa conexões mais fortes (ZHAO et al., 2010).

A análise por WGCNA pode ser dividida em algumas etapas: preparação dos dados, construção de uma matriz de sobreposição topológica (*Topological Overlap Matrix* - TOM), definição de módulos, enriquecimento e anotação dos módulos e análise de correlação (ZHANG & HORVATH, 2005). A primeira consiste na preparação e normalização dos dados de abundância para controle de artefatos de técnica criados por alta variância da medida de abundância. A similaridade na rede pode ser feita por diferentes métricas de distância, por exemplo a correlação de Pearson (ZHANG & HORVATH, 2005). A matriz de sobreposição topológica, TOM, é feita a partir da dissimilaridade entre as abundâncias. A sobreposição topológica de dois nós reflete sua interconexão relativa. A identificação dos módulos é feita a partir da matriz TOM (ZHANG & HORVATH, 2005). O enriquecimento é realizado para adicionar anotações taxômicas que possam colaborar com a interpretação biológica dos módulos identificados na análise. Por fim, a análise de correlação dos módulos aos perfis clínicos ou de tratamentos das amostras são feitas para associar os módulos identificados a possíveis fenótipos ou outros aspectos biológicos de interesse (ZHANG & HORVATH, 2005). Com os módulos formados é possível avaliar as ASVs de destaque dentro do módulo, chamados de *hub*. As ASVs *hubs* são aquelas que apresentam alta conectividade intramodular

(ZHANG & HORVATH, 2005). Ao associar os módulos e seus ASVs *hubs* com características de tratamento ambientais e/ou fenotípicas é possível elucidar comportamentos complexos relacionados à co-abundância de ASVs em organismos biológicos.

A análise de redes de co-abundância utilizando o método WGCNA já foi aplicada em diversas espécies. Fuller et. al. (2007) utilizou a técnica para identificação de módulos gênicos influentes no peso de camundongos. Alexandre et. al. (2015) identificou 34 módulos gênicos em que 4 deles foram fortemente associados com fenótipos bovinos para eficiência alimentar. A aplicação do método WGCNA tem por entrada dados que possam ser dispostos em uma matriz de *medidas quantitativas x amostras* (LANGFELDER & HORVATH, 2008), sendo assim, o método pode ser aplicado para além da complexidade de interação gênica. A análise metabólica de bovinos de corte foi utilizada para identificar metabólitos séricos associados à eficiência alimentar (NOVAIS et al., 2019). A interação entre hospedeiro e microbioma foi estudada por Malmuthuge et al. (2019) para compreensão da regulação do rúmen de ruminantes neonatos. A análise de abundância no microbioma de ovelhas com base no perfil fenotípico de maior e menor liberação de metano levou Ghanbari et. al. (2020) a verificar que organismos metanogênicos precisam estar associados a outras espécies microbianas para realizar modificação fenotípica da produção de metano.

A identificação do perfil microbiológico associado a diferentes fenótipos é uma abordagem enriquecedora no processo de melhoramento genético e na estima de características de interesse. Ovinos como os da raça Morada Nova, conhecidos por sua resistência a GINs, podem ser extremamente beneficiados pela análise de abundâncias microbianas e a associação destes aos fenótipos de interesse. O estudo do perfil microbiológico e a identificação de marcadores microbiológicos para maior e menor carga parasitária pode proporcionar o desenvolvimento de novos métodos de seleção animal. Além disso, a seleção adequada de indivíduos para o tratamento com drogas anti-helmínticas podem ser beneficiadas pela maior especificidade e efetividade de novos métodos de fenotipagem animal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar variantes de sequências de amplicons (ASVs) presentes em fezes e conteúdo ruminal de ovelhas da raça Morada Nova e associá-las à carga parasitária do parasita *Haemonchus contortus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar ASVs de arqueias e bactérias nas fezes e conteúdo ruminal de ovelhas da raça Morada Nova.

Associar ASVs de arqueias e bactérias aos fenótipos de maior e menor carga parasitária do parasita *Haemonchus contortus* em ovelhas da raça Morada Nova.

3. METODOLOGIA

3.1 DIRETRIZES DE ÉTICA

Durante o processo experimental todas as diretrizes de bem-estar animal foram respeitadas e aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da EMBRAPA em Experimentação Animal, São Carlos, São Paulo (Protocolo N° 04/2017).

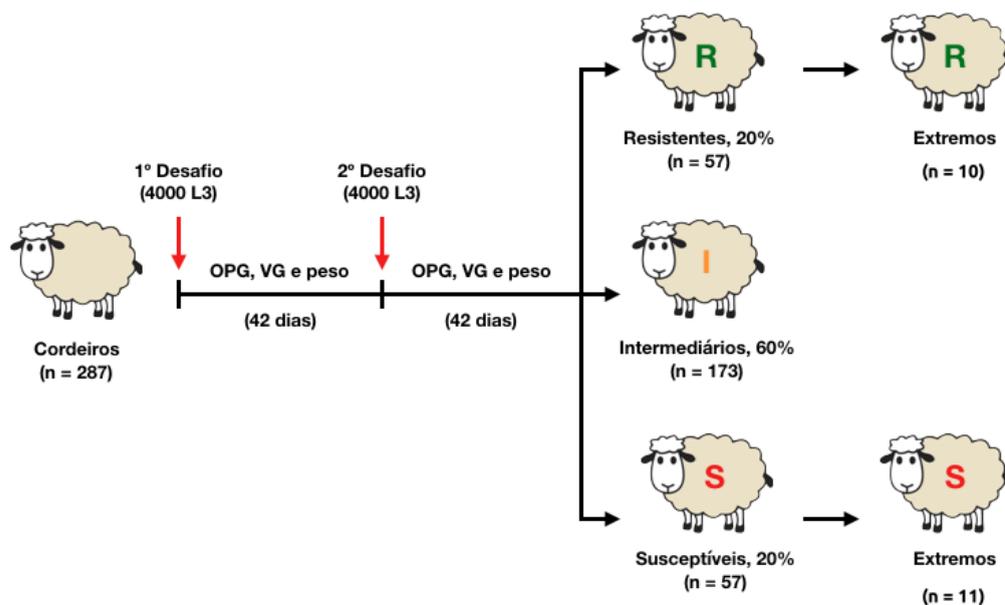
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E MANEJO

As observações experimentais do presente estudo foram conduzidas a partir de uma população de 287 ovinos Morada Nova alojadas em CPPSE/Embrapa, no município de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil. Os animais nasceram entre abril e maio de 2017, e entre março e maio de 2018, sendo 146 machos e 141 fêmeas, com peso médio de nascimento entre 1,10 kg e 4,20 kg (média de $2,74 \pm 0,58$ kg). Os animais tiveram manejo e nutrição conforme descrito em detalhes por Toscano (2019). Em síntese, após completarem 100 dias de idade (média de $98,67 \pm 8,95$ dias), os animais foram desmamados e divididos em lotes com base no sexo e mês de nascimento em cada ano experimental. Os animais foram mantidos junto das matrizes em pasto naturalmente infestado por GINs, predominantemente de capim Aruana, em manejo rotacionado, em uma área de cerca de 3 hectares. A avaliação parasitológica está descrita em detalhes em Toscano (2019).

Em resumo, posterior ao desmame, as amostras fecais de todos animais foram coletadas para realização da OPG (UENO; GONÇALVES, 1998). O tratamento com monepantel (Zolvix®, Novartis) a 2,5 mg/kg de peso corporal foi aplicado com o objetivo de eliminar infecções naturais. Quatorze dias após a vermifugação (D0), os cordeiros foram submetidos a dois desafios parasitários com 4.000 *H. contortus* L3, conforme descrito anteriormente em Toscano (2019). Todo protocolo de infecção foi realizado seguindo as recomendações da Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (WOOD et al., 1995). Individualmente foram coletadas as amostras fecais para OPG nos dias D0, D21, D28, D35 e D42. Quinzenalmente foram coletadas amostras de sangue para determinação de PCV referente aos dias D0, D14, D28 e D42.

Os cordeiros Morada Nova foram classificados quanto a fenótipos de alta carga parasitária, suscetíveis, e baixa carga parasitária, resistentes. Para a classificação foram utilizadas as contagens de OPG, volume globular (VG) e os pesos médios após os dois desafios parasitários, conforme descrito por Toscano (2019), **Figura 2**. O peso dos cordeiros foi ajustado conforme a diferença de idade entre eles e o cordeiro mais velho de cada lote. O cálculo foi feito com base no peso (P) do cordeiro, considerando o ganho médio diário (GMD) do cordeiro e a diferença de idade (ΔId), em dias, entre esse e o cordeiro mais velho, naquela data de pesagem. O peso ajustado (P_{Aj}) foi calculado pela fórmula: $P_{Aj} = P + GMD \cdot \Delta Id$.

Figura 2 - Delineamento experimental e fenotipagem.



Fonte: Adaptado de TOSCANO, 2019.

Com os dados de fenotipagem dos cordeiros, um *score* do grau de infecção foi calculado com o objetivo de distinguir os extremos notáveis entre o rebanho. A classificação dos ovinos foi feita em três grupos: resistentes (20%), intermediários (60%) ou suscetíveis (20%) à infecção por *H. contortus*.

O *score* foi calculado de acordo com a fórmula: $Score = (0,4 \cdot P_{Aj}) - (0,4 \cdot OPG) + (0,2 \cdot VG)$. A fórmula ponderou o peso do cordeiro em relação à observação dos sintomas. Uma vez que o peso do cordeiro ponderado se mostra maior que a contagem de OPG

ponderada o *escore* tende a valores positivos. O VG foi utilizado com menor peso na composição da fórmula dado que a raça Morada Nova que apresenta menor taxa de anemia, portanto menor impacto no fenótipo.

Foram selecionados cordeiros extremos em termos da carga parasitária a partir dos fenótipos resistentes e suscetíveis, alta carga (N=10) e baixa carga (N=11) por meio do *escore* descrito. Os valores de média, máximos e mínimos de *escore* entre os indivíduos selecionados para cada fenótipo estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Principais métricas do valor de *escore* de classificação fenotípico

Carga parasitária	Máximo	Mínimo	Média	Desvio Padrão
Alta	-2746,0	-11203,4	-5128,8	2473,8
Baixa	8,2	-139,7	-49,6	57,8

Fonte: Do Autor.

3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE MICROBIOTA

Aproximadamente 10 g de fezes de cada animal foram obtidos 2 semanas antes do abate, e 50 ml de conteúdo ruminal foram coletados imediatamente após o abate. Todas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e permaneceram armazenadas a -80°C antes de serem processadas. A extração de DNA foi realizada com o kit *Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep* (ZYMO Research Corp., Irvine, CA), utilizando 150 mg de cada amostra e seguindo o protocolo padrão. A amplificação de alvo de PCR para os genes codificadores de rRNA 16S de bactérias e arqueas foi realizada usando os primers 341-bS-17F e 341-bS-17R (KLINDWORTH et al., 2013), e Ar915aF e Ar1386R (KITTELMANN et al., 2013), respectivamente. Amplicons foram sequenciados em uma plataforma Illumina Miseq (2 × 250 bp) usando o kit de sequenciamento Illumina V3 no Centro de Genômica da ESALQ (Piracicaba, SP, Brasil).

3.4 PROCESSAMENTO E ENRIQUECIMENTO DE SEQUÊNCIAS

As *reads* de sequenciamento foram filtradas por qualidade, *phred score* > 25, e cortadas nas posições adequadas com base em gráficos de agregação fornecidos pelo QIIME 2 versão 2018.8 (BOLYEN et al., 2019). Os dados filtrados foram submetidos ao pacote DADA2 para gerar ASVs utilizando a opção de apenas concatenar e excluir sequências quiméricas (CALLAHAN et al., 2016). A anotação das sequências bacterianas foi realizada usando o banco de dados SILVA versão 132 (QUAST et al., 2012) e, para arqueias, utilizando o banco de dados *Rumen and Intestinal Methanogen* (RIM-DB) (SEEDORF et al., 2014). As ASVs foram identificadas nas amostras dos ambientes: fezes (FZ) e conteúdo ruminal (CR).

3.6 CORREÇÃO DO EFEITO DAS CORRIDAS

Os dados de abundâncias relativas foram obtidos a partir do sequenciamento das amostras realizado em duas corridas de sequenciamento distintas. A distribuição dos dados de abundância em análise de componente principal mostrou agrupamentos em relação ao evento de sequenciamento. Para eliminar artefatos técnicos nos resultados, os dados foram normalizados em relação às corridas de sequenciamento. Para tal, foi utilizada a função de remoção de efeito *batch* do pacote Limma no R. Uma nova análise de componentes principais foi realizada após a normalização para confirmação da correção dos dados.

3.7 ANÁLISE DE REDES DE CO-ABUNDÂNCIA

As análises de co-abundância foram realizadas com a ferramenta WGCNA (Weighted Correlation Network Analysis) a partir da abundância relativa normalizada das ASVs (LANGFELDER & HORVATH, 2008). Este algoritmo cria redes de co-abundância de padrão topológico Scale-Free (Livre de Escala) baseada na correlação de Pearson dos valores de abundância utilizados, a fim de agrupar e identificar diferentes módulos (grupos) de ASVs nas fezes e conteúdo ruminal de ovinos. O pacote WGCNA tem uma variedade de funções para a construção de uma rede de correlação. Foi utilizado um formato de rede direcionada ao qual as ASVs são positivamente e negativamente relacionadas. A função *adjacency* calcula a matriz de adjacência dos nós dentro da rede. Redes ponderadas permitem que a adjacência

possua valores contínuos entre 0 e 1. A adjacência dos nós em uma rede ponderada pode ser definida a partir dos dados de abundância, através da correlação de Pearson, e um expoente β (soft threshold). Os valores de similaridade de co-abundância são elevados à potência β . A função *pickSoftThreshold* foi utilizada para identificar o valor $\beta = 13$, em ambos ambientes. Esse valor foi escolhido para que a rede tivesse $r^2 > 0.8$ para a característica de topologia livre e apresentasse conectividade média entre os nós ($k.mean > 0$).

Partindo da matriz de adjacência, a função *TOMsimilarity* calcula a matriz topológica de sobreposição (TOM). A dissimilaridade (1-TOM) é utilizada na definição dos módulos, *i.e.*, conjuntos de ASVs com alta sobreposição topológica. A definição dos módulos a partir da dissimilaridade proporciona módulos mais distintos entre si (Zhang; Horvath, 2005). Os módulos foram formados baseados na clusterização hierárquica do conjunto de dissimilaridades.

Utilizando a função *cutreeStatic* foi adotado um valor de corte para a clusterização de 0,5 de altura, número mínimo de amostras (*minSize* = 2), tendo número de ASVs mínimas definido em 30. Os módulos foram analisados pela dissimilaridade dos eigengenes de cada módulo. Os eigengenes são definidos como o primeiro componente principal, representando o perfil de abundância dos ASVs dentro do módulo (LANGFELDER; HORVATH, 2008; ZHANG; HORVATH, 2005). A identificação nominal dos módulos é feita por sistema de cor, assim, para cada módulo foi atribuída uma cor de forma arbitrária. Por padrão do pacote, ASVs que não foram atribuídas a nenhum módulo são agrupadas no módulo cinza.

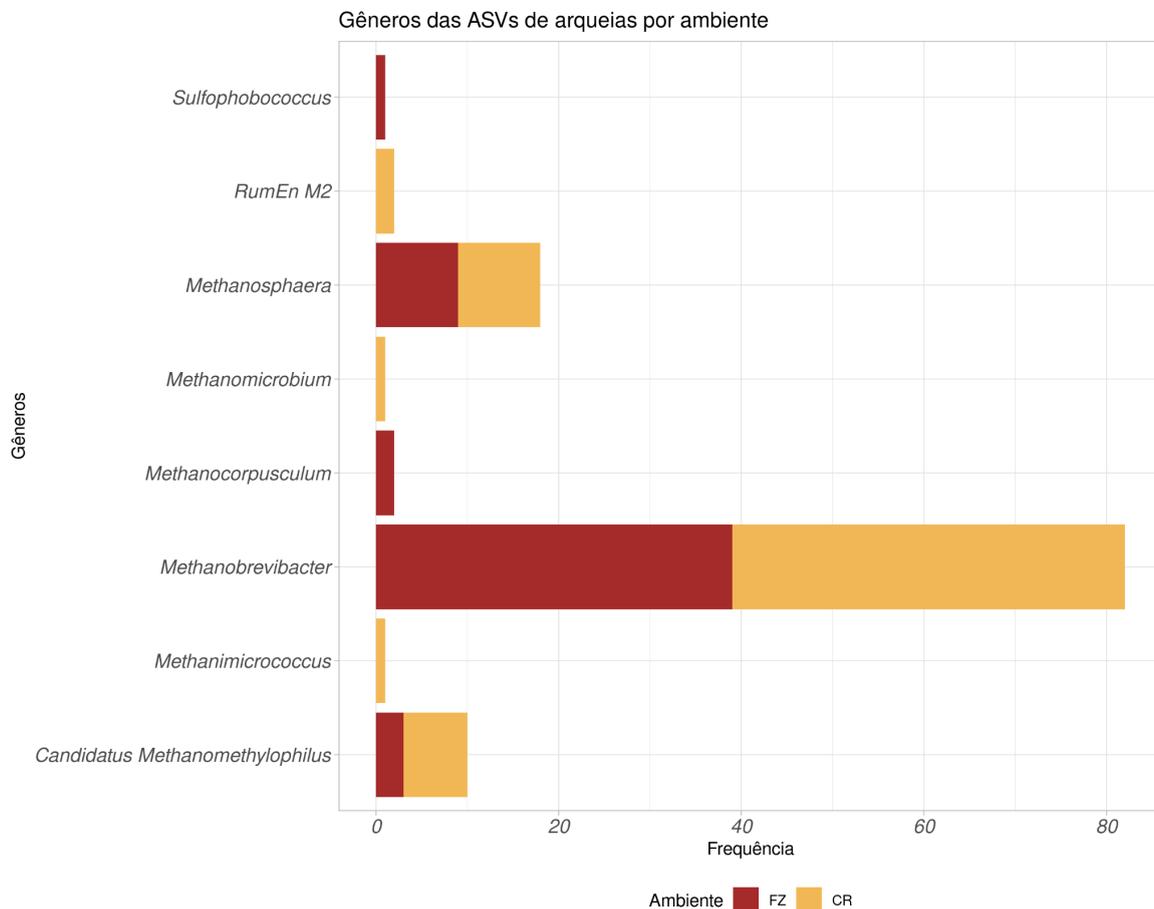
Os Módulos Eigengenes (MEs) e os fenotípicos (Alta carga (AC) e baixa carga (BC)), foram associados em módulo-tratamento permitindo estimar a correlação entre o módulo de ASVs e a característica fenotípica. Os módulos que apresentaram valor de correlação $|r^2| \geq 0,4$ e $p \leq 0,05$ foram selecionados para análise aprofundada das ASVs. As ASVs com maior conexão (*hubs* ASVs) dentro dos módulos selecionados foram identificadas a partir da conectividade ao módulo (*module membership* - *MM*) > 0.70 . A conectividade ao módulo mede o quão abundante é uma ASV em relação às outras ASVs dentro do módulo e, é altamente relacionada a conectividade intramodular (FULLER et al., 2007; ZHANG; HORVATH, 2005). O procedimento completo de análise foi adotado para ambos ambientes (*i.e.*, fezes e conteúdo ruminal) e para ambos domínios de microrganismos (*i.e.*, arqueas e bactérias).

4. RESULTADOS

Os ASVs identificados a partir do enriquecimento das sequências bacterianas foram um total de 12.082 em CR e 1.186 em F. Os ASVs de arqueias por sua vez foram 92 em CR e 79 em FZ.

As ASVs de arqueias não se mostraram diferenciáveis pelo corte de altura > 0.5 , portanto não foi possível identificar módulos. Entretanto, foi possível classificar o gênero *Methanobrevibacter* sp. como o mais frequente nas amostras de FZ e CR (**Figura 3**).

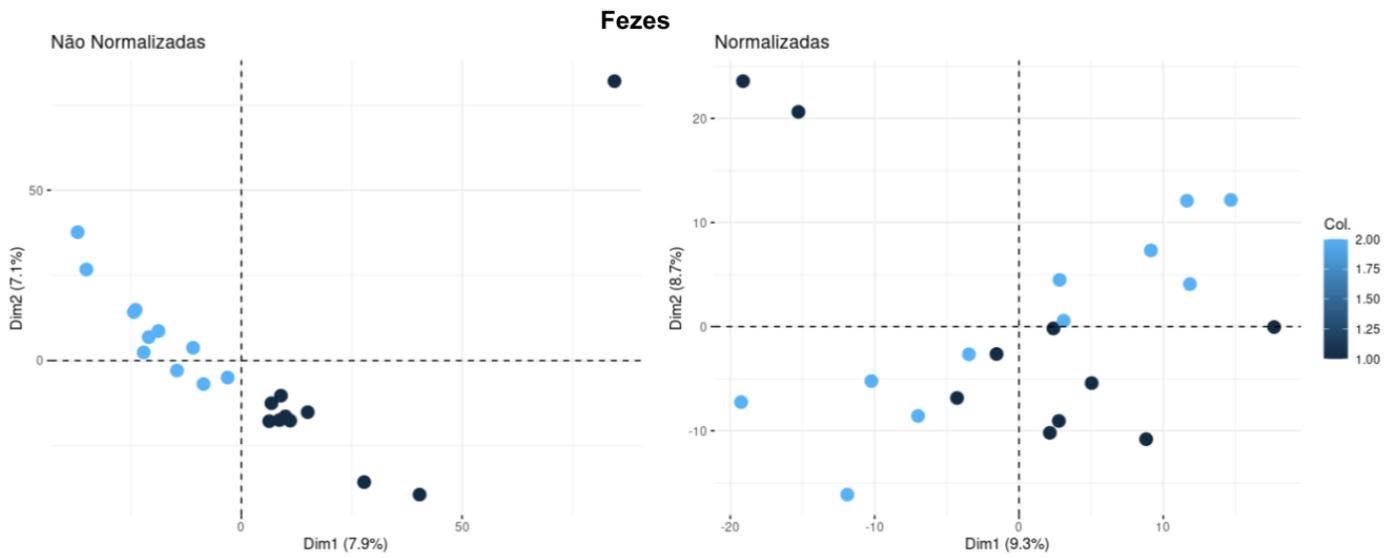
Figura 3 - Frequência de ASVs por gêneros de arqueias em FZ e CR.



Fonte: Do autor.

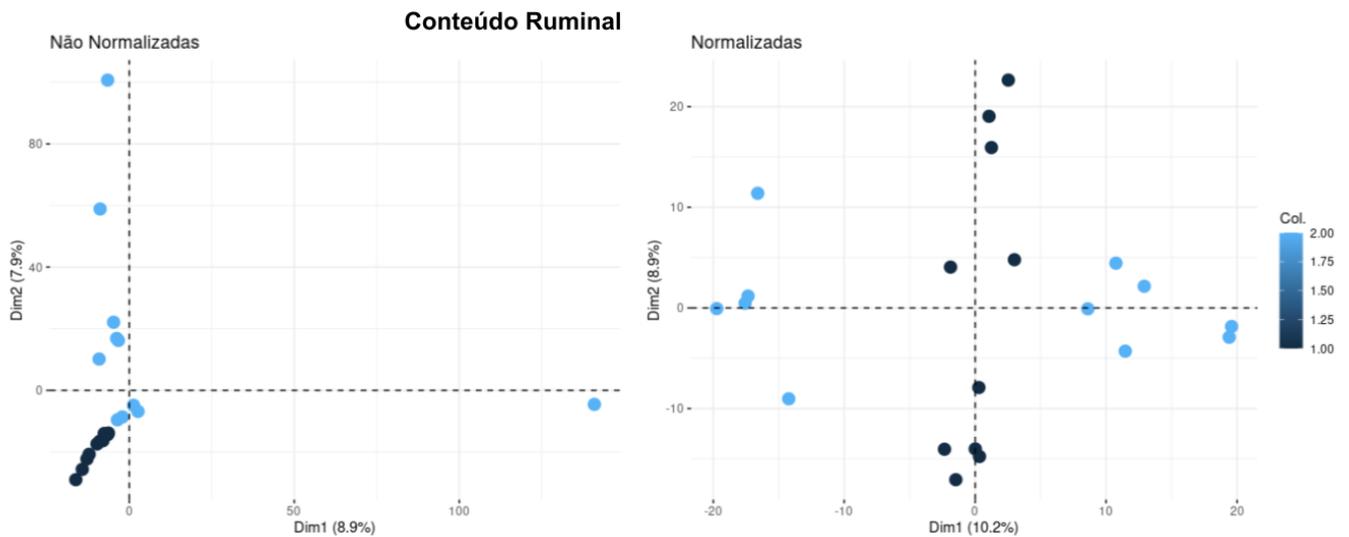
As **Figuras 4 e 5** ilustram os resultados das análises de componente principal realizada a partir dos dados de abundância relativa das ASVs de bactérias antes e depois de normalizados. Os dados foram normalizados para minimizar a segregação dos dados em relação a corrida de sequenciamento realizada.

Figura 4 - PCAs das abundâncias bacterianas em FZ.



Fonte: Do autor.

Figura 5 - PCAs das abundâncias bacterianas em CR.



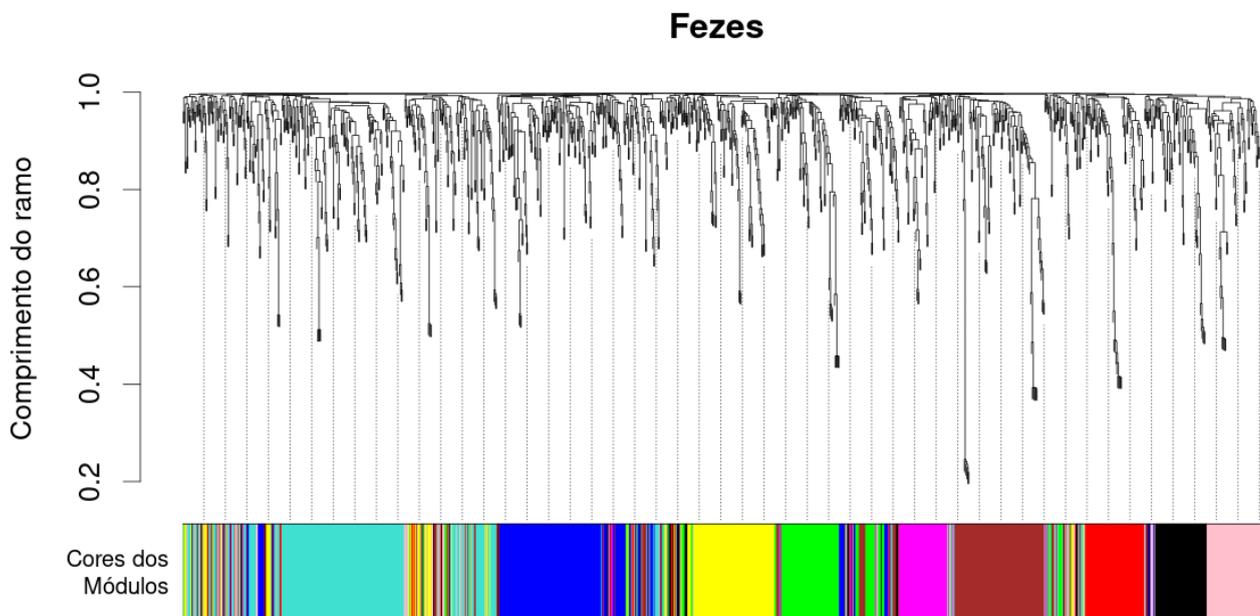
Fonte: Do autor.

A análise de correlação de redes de co-abundância foi executada utilizando o pacote WGCNA a partir do sequenciamento e mensuração da abundância de ASVs de amostras obtidas em dois ambientes (fezes e conteúdo ruminal) de um total de 21 animais.

A análise de ASVs bacterianos realizada pelo WGCNA identificou 10 módulos distintos em FZ e 12 em CR. As **Figuras 6 e 7** ilustram os dendrogramas de clusterização das

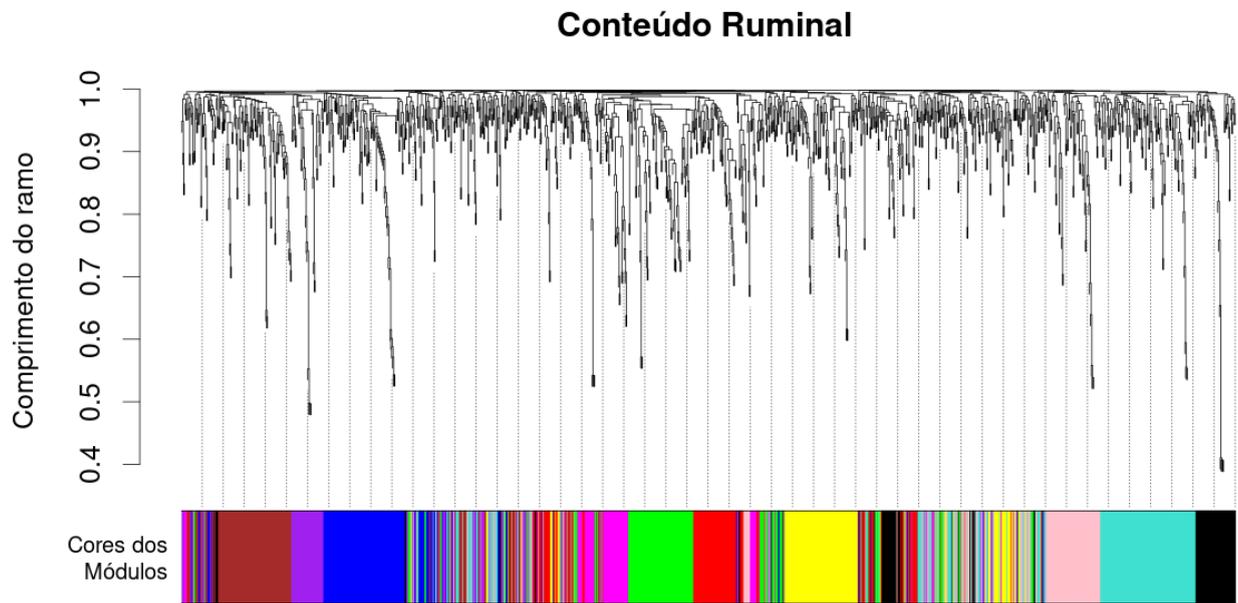
ASVs de FZ e CR respectivamente. Em amostras de FZ foi identificado 1 módulo (marrom), positivamente correlacionado ao fenótipo de AC ($|r^2| \geq 0,4$ e $p \leq 0,05$) (**Figura 8**). Nas amostras de CR foram identificados 2 módulos, rosa e amarelo, ambos positivamente correlacionados ao fenótipo AC (**Figura 9**). O número de ASVs por módulo foi de 152 (módulo marrom) para FZ e variou entre 92 (módulo rosa) e 136 (módulo amarelo) para CR.

Figura 6 - Dendograma de clusterização de ASV de FZ.



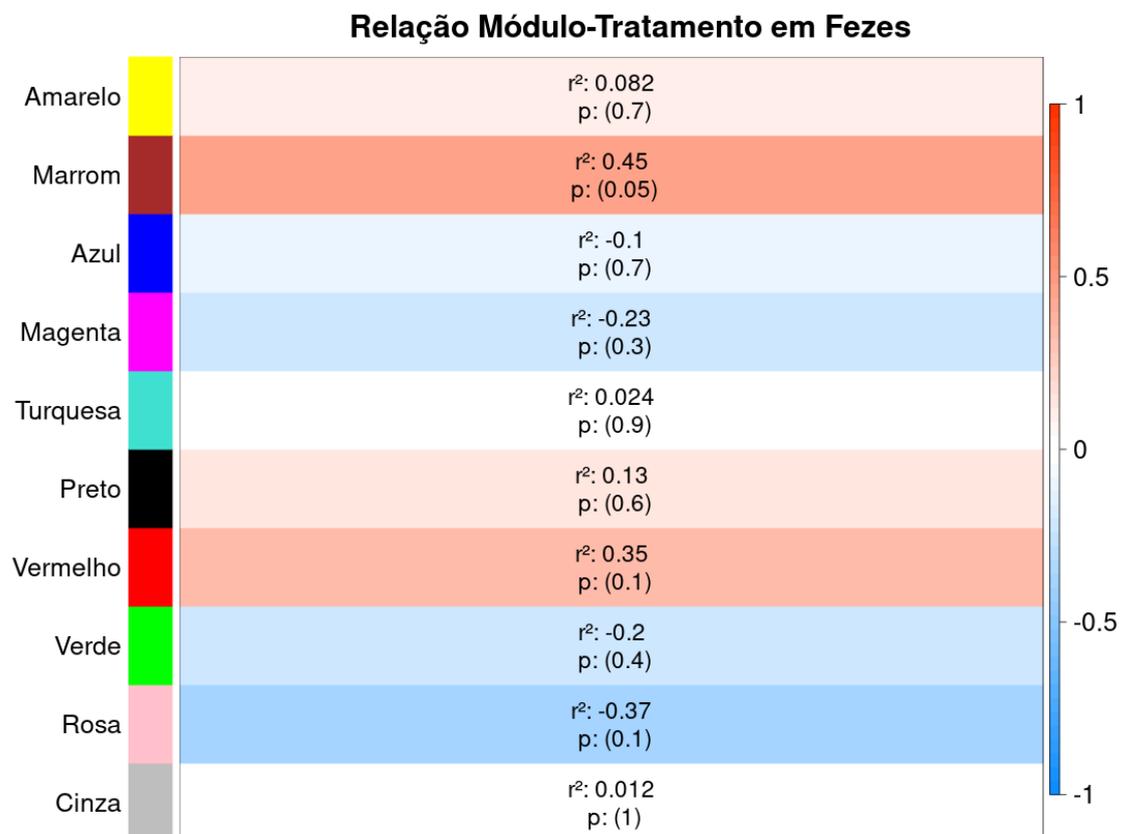
Fonte: Do autor.

Figura 7 - Dendrograma de clusterização de ASV de CR.



Fonte: Do autor.

Figura 8 - Correlação entre módulos bacterianos e o fenótipo AC em FZ.



Fonte: Do autor.

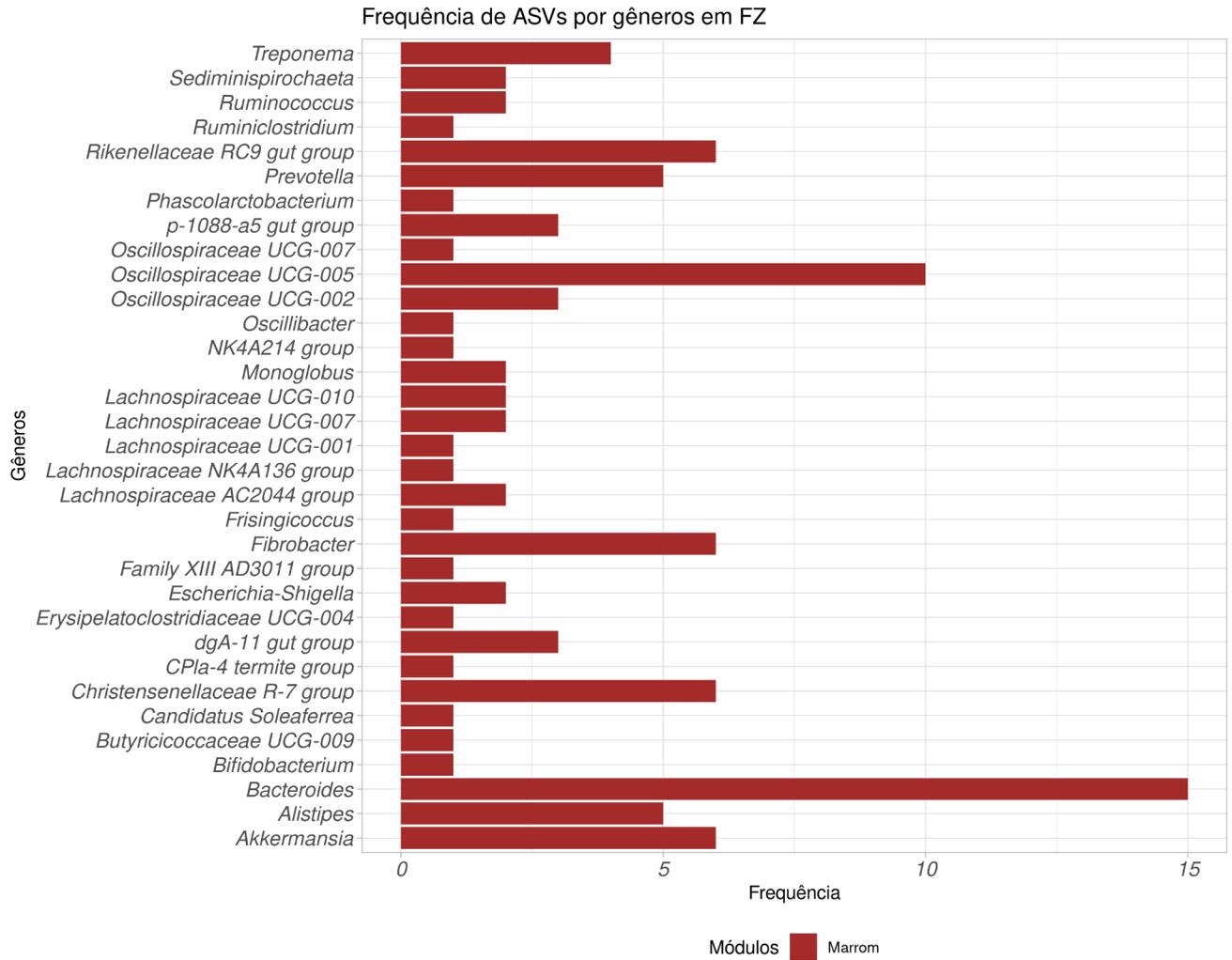
Figura 9 - Correlação entre módulos bacterianos e o fenótipo AC em CR.



Fonte: Do autor.

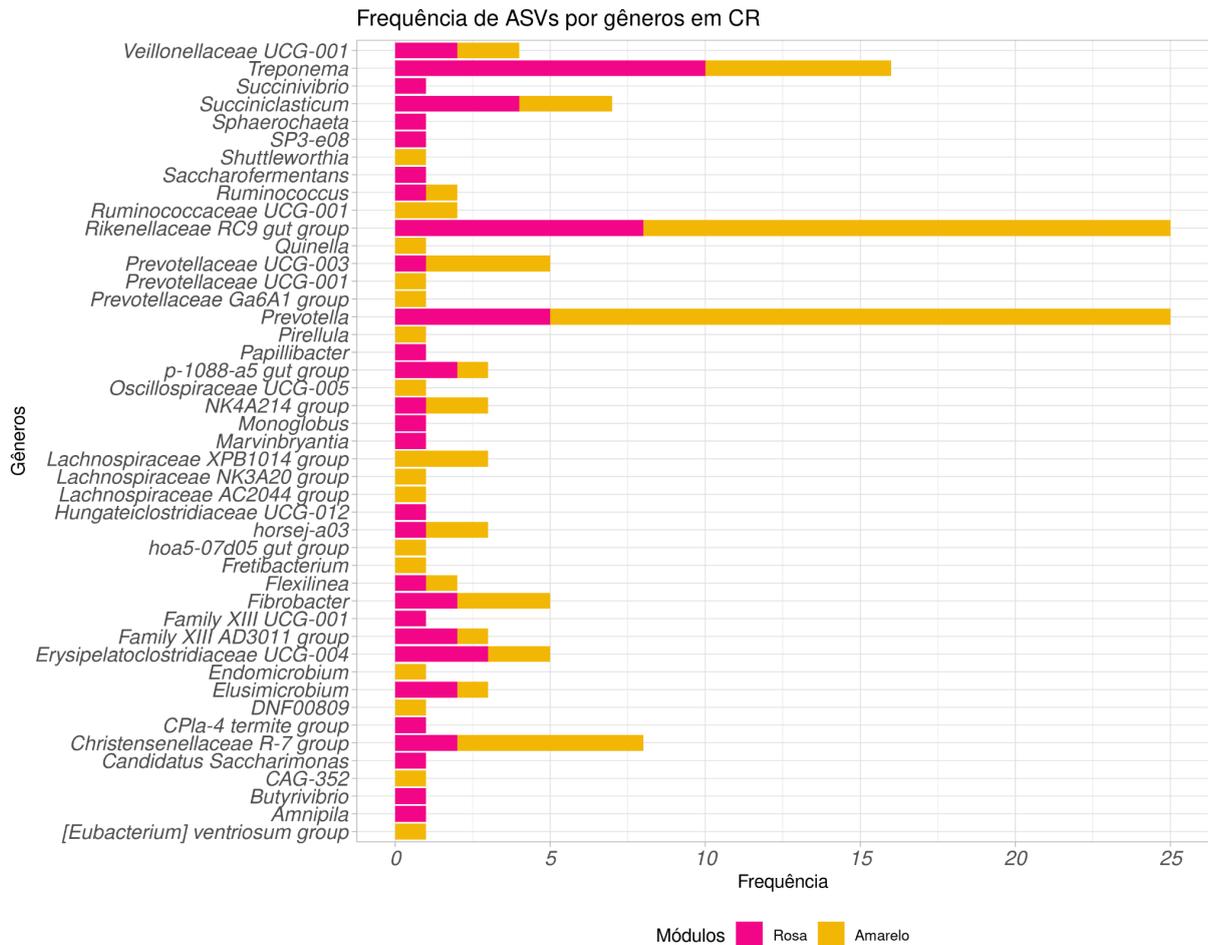
A anotação das ASVs foi feita a partir do banco de dados SILVA (Quast et al., 2012). A partir da classificação taxonômica das ASVs foram preditos os principais gêneros presentes entre os módulos significativos associados à susceptibilidade a *H. contortus* em cada ambiente. Nas amostras de FZ, as ASVs foram classificadas com maior frequência dentro dos gêneros *Bacteroides*, *Oscillospiraceae UCG-005*, *Christensenellaceae R-7 group* e *Rikenellaceae RC9 grupo intestinal* (**Figura 10**). Em amostras de CR, os gêneros associados com mais frequência entre os dois módulos significativos foram *Treponema* sp., *Rikenellaceae RC9 grupo intestinal* sp. e *Prevotella* sp. (**Figura 11**).

Figura 10 - Frequência de ASVs por gênero bacteriano em FZ.



Fonte: Do autor.

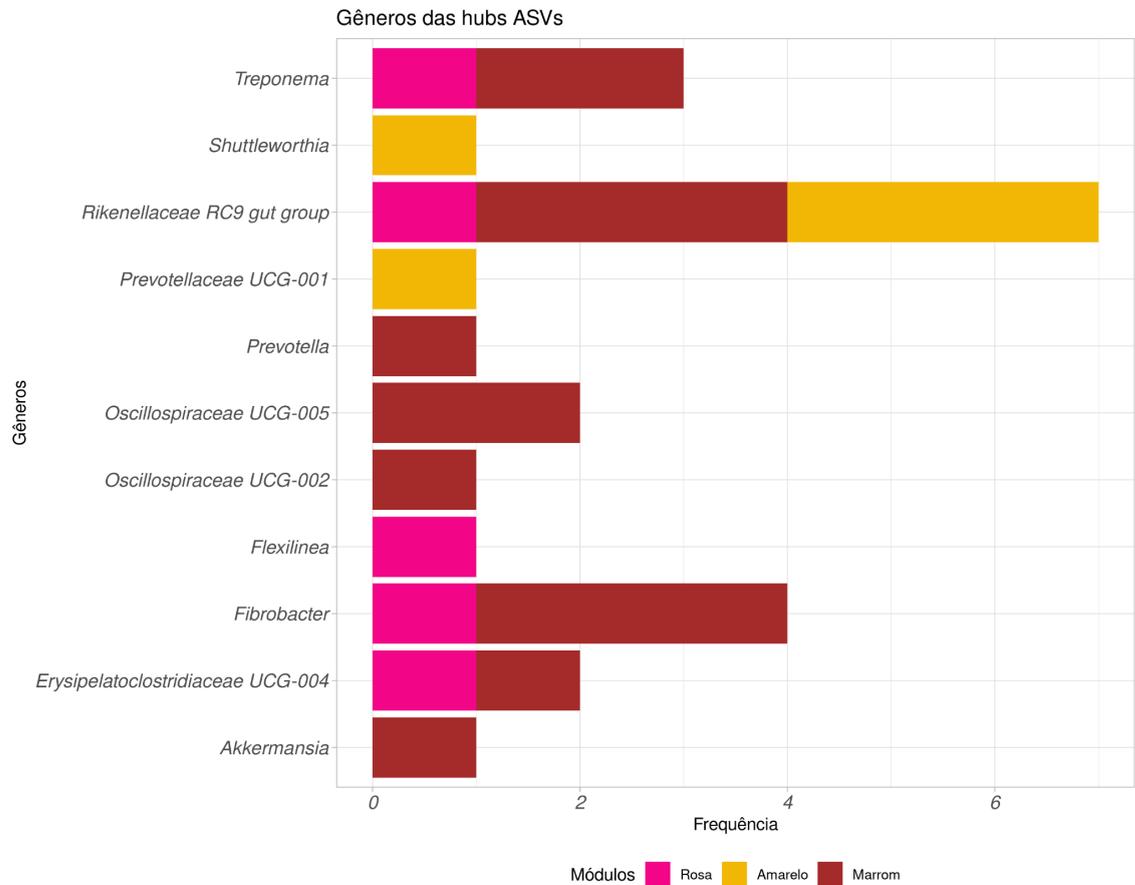
Figura 11 - Frequência de ASVs por gênero bacteriano em CR.



Fonte: Do autor.

Dentro dos módulos significativos, as ASVs que apresentaram valores de conectividade ao módulo (*Module Membership* – MM) maiores que 0,7 foram consideradas como *hubs* ASVs, sendo essas as mais conexas com as demais ASVs presentes dentro de um módulo. O módulo marrom de FZ apresentou 24 ASVs com MM>0,7, em CR obteve-se 10 e 12 ASVs para os módulos amarelo e rosa, respectivamente. Os gêneros mais frequentes foram *Bacteroides* sp., *Oscillospiraceae UCG-005* sp., *Christensenellaceae grupo R-7* sp., *Rikenellaceae RC9 grupo intestinal* sp., *Fibrobacter* sp. e *Treponema* sp. (**Figura 12**). Em 22 das *hubs* ASVs a recuperação taxonômica do gênero com base nas sequências não foi possível, tendo a classificação sido obtida até o nível de família. A mais frequente das famílias foi a F082 da ordem *Bacteroidales*, as demais famílias e ordens são demonstradas na **Tabela 2**.

Figura 12 - Frequência de *hubs* ASVs por gênero nos módulos de CR (rosa e amarelo) e FZ (marrom).



Fonte: Do autor.

Tabela 2 - Principais famílias identificadas entre as *hubs* ASVs dos módulos significativos.

Ordem	Família	Frequência
Bacteroidales	<i>F082</i>	6
Bacteroidales	<i>Bacteroidales BS11 grupo intestinal</i>	2
Bacteroidales	<i>Bacteroidetes BD2-2</i>	2
Bacteroidales	<i>Muribaculaceae</i>	2
Oscillospirales	<i>Eubacterium grupo coprostanoligenes</i>	1
Bacteroidales	<i>Bacteroidales grupo RF16</i>	1
Bacteroidales	<i>Bacteroidales UCG-001</i>	1
Bacteroidales	<i>Barnesiellaceae</i>	1
Bacteroidales	<i>Marinifilaceae</i>	1

Fonte: Do Autor.

5. DISCUSSÃO

Identificar a composição do microbioma ovino durante a infecção parasitária por *H. contortus* pode semear luz à modificação do metabolismo, à modulação do sistema imune e identificar possíveis marcadores microbiológicos para a infecção. O presente trabalho tem como resultado hub ASVs correlacionadas com fenótipo de suscetibilidade ao helminto. São conhecidas algumas mudanças na estrutura do microbioma ruminal de ovinos ocasionados por *H. contortus* (EL-ASHRAM et al., 2017; CORRÊA et al., 2021). Além do rúmen, comparações entre a microbiota das FZ de ovelhas antes e depois do desafio parasitário com *H. contortus* foram realizadas por Mamun et al. (2020). Ovelhas com alta carga parasitária demonstraram diferenças na abundância de Firmicutes e Bacteroidetes da microbiota fecal, enquanto ovelhas com baixa carga parasitária apresentaram menor mudança (MAMUN et al., 2020).

A abundância das *hubs* ASVs identificadas no presente trabalho podem colaborar com o avanço do estado da arte em relação ao microbioma de ovinos com alta carga parasitária a partir da participação dessas ASVs no processo infeccioso ou inflamatório. Por outro lado, a modificação das condições físico-químicas no tecido de interesse decorrente da infecção parasitária, por exemplo, elevação do pH de 2,0 para 4,5 (LI et al., 2016), tem potencial de influenciar no tamanho e composição da população dos microrganismos.

5.1 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE DIGESTÃO

A maior abundância de gêneros envolvidos na digestão e metabolismo celulósico foi observada no presente trabalho. Os gêneros *Prevotella* sp., *Treponema* sp., *Fibrobacter* sp., *Shuttleworthia* sp. e a família *Bacteroidales* *BS11 grupo intestinal* foram os principais identificados relacionados a esse processo.

A ocorrência de GINs em ruminantes perturba o funcionamento regular do metabolismo energético, aumenta a perda endógena de proteínas ao mesmo tempo que tem aumento na secreção de mucinas e efetores imunológicos na tentativa de controle da infecção (VAN HOUTERT & SYKES, 1996). Os microrganismos fermentadores estão envolvidos na disponibilidade energética de animais afetados pela infecção helmíntica no tecido do abomaso (LI et al., 2016; XIANG et al., 2021). A abundância do gênero *Prevotella* sp. encontrada nos

resultados deste trabalho corrobora com estudos prévios que destacam o gênero como biomarcador recorrente em infecções helmínticas (ROONEY et al., 2021; LI et al., 2016; CORRÊA et al., 2021). Em ruminantes, o gênero *Prevotella* sp. tem um papel importante na degradação de proteínas e já foi observado em maior abundância em búfalos com ingestão residual positiva (MCCANN et al., 2014). *Prevotella* sp. ainda foi encontrado associado a altas cargas parasitárias por *H. contortus* em ovelhas, junto ao gênero *Treponema* sp. em trabalhos prévios (MAMUN et al., 2020). O gênero *Treponema* sp., também encontrado como um hub ASV neste estudo, está envolvido no metabolismo de pectina (LIU et al., 2015) e já foi relatado como um gênero de importância no processo de digestão de polissacarídeos em ruminantes, por exemplo em bovinos (PENG et al., 2015) e ovinos (TANCA et al., 2017).

Majoritariamente os animais ruminantes utilizam ácidos graxos de cadeia curta (Short-chain Fatty Acid - SCFA) como fonte energética. SCFAs contribuem com mais de 70% da reserva nutricional de ruminantes (Li & Li, 2006). Bactérias do gênero *Fibrobacter* sp. são conhecidas como dominantes na degradação de matéria celulósica em animais ruminantes e envolvidos também na produção de SCFA (RANSOM-JONES et al., 2012; HU et al., 2020). O aumento da abundância de *Fibrobacter* sp. em bezerros foi relacionado com o aumento da concentração de SCFA por Deng et. al. (2017). Outras hubs ASVs são mencionadas no processo de fermentação para produção de SCFA como, por exemplo, o gênero *Shuttleworthia* sp. (HAO et al., 2017) e a família *Bacteroidales* *BS11 grupo intestinal* (SOLDEN et al., 2017; WEI et al., 2021).

O aumento das populações caracterizadas em literatura como degradadoras de celulose e proteínas em ruminantes demonstra a importância da disponibilidade energética em ovinos infectados por GINs. Essas populações podem ter sua abundância aumentada numa possível relação de regulação do déficit energético causado pela infecção por GINs, pode estar relacionada às mudanças das características físico-químicas do microambiente, assim como pode ser ocasionada por maior disponibilidade de substratos. Sendo assim, faz-se necessário que novos estudos focados na digestão de ruminantes infectados sejam conduzidos.

5.2 REGULAÇÃO IMUNOLÓGICA POR BUTIRATO

No presente trabalho ASVs de gêneros diretamente associados com a produção de SCFA e butirato foram identificados. Os gêneros *Shuttleworthia* sp. e *Prevotellaceae*

UCG-001 sp. foram descritos positivamente correlacionado com butirato por Hao et. al. (2021) e Fan et. al. (2021) respectivamente.

Os SCFA, além de desempenharem um papel importante como recurso energético para ruminantes, podem exercer função na regulação celular. No período de desmame de bezerros o aumento de produção e absorção de SCFA é significativamente maior, a mesma medida que a apoptose e interrupção do ciclo celular é promovida por SCFAs, incluindo butirato (Li & Li, 2008). O mecanismo de modulação celular por butirato é estudado em diferentes espécies e com implicações diversas da sua concentração. Estudos realizados com butirato destacam o efeito desse SCFA na regulação da sinalização anti-inflamatória em doenças humanas (MATHEW et al., 2014). Análises realizadas com tratamento de butirato em células epiteliais renais bovinas resultaram no bloqueio da replicação de DNA nos estágios iniciais da fase S do ciclo celular (Li & Li, 2008). Populações microbianas patogênicas podem também ser afetadas pela concentração de butirato, segundo Cox et. al. (1994) a adição de ácido butírico na alimentação de pintinhos recém chocados reduziu significativamente a colonização do ceco por *Salmonella typhimurium*.

Para o presente trabalho é interessante destacar a interação entre butirato e sistema imune. A ação anti-inflamatória intestinal mediada por butirato é predominantemente induzida por receptores de ácidos graxos livres, da família de receptores acoplados à proteína G, presente na membrana das células epiteliais (SALVI & COWLES, 2021). Estes receptores são ativados por SCFA no intestino delgado e no colo, desencadeando a produção de citocinas anti-inflamatórias, por exemplo, em camundongos (KIM et al., 2013). O butirato ainda foi correlacionado com o aumento da maturação de células T reguladoras, que regulam a intensidade da resposta imune a antígenos (ARPAIA et al., 2013). Outras evidências da modulação celular envolvem a inibição da degranulação dos mastócitos na mucosa intestinal de porcos (WANG et al., 2018) e a modulação epigenética com a inibição da desacetilação de histonas (DAVIE, 2003).

Em conjunto, as ASVs associadas com a degradação celulósica e produção de SCFA trazem luz a possível interação entre os gêneros *Shuttleworthia* sp., *Prevotella* sp., *Fibrobacter* sp. e as famílias *Bacteroidales* *BS11*, *Prevotellaceae* UCG-001 na modulação celular e regulação imunológica de indivíduos com alto parasitismo por *H. contortus*. A literatura demonstra a relação do butirato, produto da digestão dos gêneros encontrados no

presente trabalho, com a modulação celular. Portanto, é possível que a abundância desses gêneros associadas ao fenótipo AC indiquem relação entre o fenótipo e o tipo de resposta imunológica que tais indivíduos tenham desencadeado contra o parasita *H. contortus*.

5.3 PRODUÇÃO DE MUCINAS

O gênero *Akkermansia* sp. encontrado no presente trabalho em maior abundância nos indivíduos com maior carga parasitária é conhecido por ser um importante degradador de mucina, que está presente no muco gastrintestinal. Além disso, o gênero é mencionado na literatura como um colaborador da saúde gastrointestinal em humanos, principalmente na ação anti-inflamatória (GEERLINGS et al., 2018; AGGARWAL et al., 2022).

O muco gastrointestinal, gerado de forma natural por ovinos, apresenta características que são capazes de inibir de forma efetiva o crescimento de helmintos, inibindo a absorção de oxigênio por larvas e favorecendo o desligamento do helminto do tecido do abomaso (DOBSON, 1967). O mecanismo utilizado na expulsão de helmintos tem diferença entre tecidos do estômago e intestino (SCOTT et al., 2017).

A variação da secreção de mucina exerce papel importante no controle da infecção helmíntica, na mesma medida que pode interferir na abundância microbiana. Estudando ovelhas em desafio parasitário por *H. contortus*, ROWE et al. (2009) observou expressão reduzida do gene *Muc5AC*, que codifica para mucina. Condizente com a redução na expressão gênica, Scott et al. (2017) identificou redução nas células superficiais da mucosas em ovelhas infectadas por *T. circumcincta*. Entretanto, foi observada recuperação do tecido em um animal completamente recuperado da infecção (SCOTT et al., 2017). O trabalho conduzido por Rooney et al. (2021) observou diminuição do gênero *Akkermansia* em cordeiros infectados com *T. circumcincta* em animais vacinados e não vacinados. Observando esses resultados é possível dizer que há indícios de que a abundância da população de *Akkermansia* sp. está relacionada a quantidade de substrato, mucinas, no trato intestinal. Entretanto, pouco se sabe da relação entre fenótipos dos ovinos e a produção de mucina e a abundância do gênero *Akkermansia* em infecções por *H. contortus*. Mamun et. al. (2020) analisou fezes de ovelhas Merino e o gênero *Akkermansia* foi associado a ovelhas com menor carga parasitária de *H.*

contortus. Contudo, o presente trabalho encontrou resultados distintos dos demais citados, ou seja, o aumento da abundância de *Akkermansia* sp. foi correlacionado ao fenótipo de alta carga parasitária de *H. contortus*.

O efeito da mucina na infecção por *H. contortus* não é completamente elucidado e por sua vez, não é possível dizer se o aumento da população encontrado no presente trabalho poderia ser uma resposta a disponibilidade de substratos, isto é, decorrente do aumento de produção de mucina pelos animais infectados em uma tentativa do hospedeiro de expulsar o parasita, ou ainda ao mutualismo com os demais organismos descritos no presente trabalho. O método de sequenciamento utilizado no presente trabalho utiliza regiões hipervariáveis dos genes 16S, a informação sobre as espécies e cepas de microrganismos é comprometida e portanto a relação direta do gênero e o fenótipo de AC se torna de difícil afirmação. Entretanto, é evidenciado neste trabalho, e nos demais citados, que o gênero possui conexão com a infecção por helmintos, em especial *H. contortus*. Faz-se portanto necessário aprofundar os estudos para avaliar as múltiplas possibilidades da interação parasito-hospedeiro, parasito-microbiota, microbiota-hospedeiro para melhor entender suas implicações nos produtos da mucosa dos ovinos infectados por *H. contortus*.

5.4 VIÉS DE DISBIOSE

Faz-se necessário levar em consideração que a análise realizada no WGCNA faz uso da relação de co-abundância dos ASVs para a formação de módulos. A associação dos módulos aos perfis fenotípicos pode ou não ter um sentido causa-efeito. Dado que nossos resultados associaram ASVs apenas com fenótipo de AC, podemos ter um viés da análise, em função da disbiose ocasionada pelo parasita, uma vez que os GINs interferem na microbiota típica. Sendo assim, as *hubs* ASVs podem ter tido alteração da população mas não necessariamente significam influência direta com a carga parasitária, uma vez que a disbiose pode favorecer abundância de alguns gêneros por maior disponibilidade de substrato ou menor antagonismo entre microrganismos. Ainda assim, o estudo dos gêneros aqui discutidos é uma alternativa na busca por biomarcadores do fenótipo de suscetibilidade a *H. contortus* e estudos mais aprofundados podem ajudar a elucidar os mecanismos envolvidos.

6. CONCLUSÃO

As comunidades microbianas desempenham um papel fundamental em ruminantes. Presentes no rúmen e responsáveis por digerir e metabolizar alimentos, os microrganismos podem também ter influência direta ou indireta no processo de defesa contra diversos parasitas, como os helmintos. A infecção por *H. contortus* é uma das principais GINs de ovinos e faz-se necessário identificar corretamente indivíduos suscetíveis ou fatores de resistência à infecção, colaborando para um melhor manejo de ovinos Morada Nova e demais raças.

O estudo de microrganismos envolvidos em conjunto no processo de suscetibilidade demonstrou uma gama de abordagens e alvos para o mapeamento de marcadores microbiológicos. O presente trabalho destacou a presença de *Prevotella* sp., *Treponema* sp., *Fibrobacter* sp., *Shuttleworthia* sp. e a família *Bacteroidales* *BS11 grupo intestinal* como microrganismos participantes da digestão de celulose e que possivelmente atuam na disponibilidade energética durante a infecção. A participação dos microrganismos envolvidos na digestão celulósica tem como produto o butirato, especialmente os gêneros *Shuttleworthia* sp. e *Prevotellaceae* UCG-001 sp., sendo o butirato um importante modulador do ciclo celular e mediador da regulação de processos inflamatórios, que pode estar relacionado a resposta imunológica à infecção por *H. contortus*. Além disso, há a provável influência da mucina no controle de GINs e na abundância do gênero *Akkermansia* sp..

A disbiose ocasionada por GINs possui diferentes características a depender do organismo hospedeiro e do parasita infectante. Tendo isso em mente, faz-se necessário que novos estudos abordando gargalos de conhecimento sobre as ASVs, especialmente em sua interação com o parasita e o hospedeiro, sejam realizados e que auxiliem na definição de novas metodologias de fenotipagem e seleção de ovinos para o melhoramento da espécie.

7. REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, Vidushi; SUNDER, Sushant; VERMA, Smita Rastogi. Disease-associated dysbiosis and potential therapeutic role of *Akkermansia muciniphila*, a mucus degrading bacteria of gut microbiome. **Folia Microbiologica**, v. 67, n. 6, p. 811-824, 2022.
- ALBERS, G. A. A. et al. The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young Merino sheep. **International journal for parasitology**, v. 17, n. 7, p. 1355-1363, 1987.
- ALEXANDRE, Pamela A. et al. Liver transcriptomic networks reveal main biological processes associated with feed efficiency in beef cattle. **BMC genomics**, v. 16, p. 1-13, 2015.
- ALMEIDA, Luciana Barros et al. Disbiose intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 24, n. 1, p. 58-65, 2009.
- AMARANTE, A. F. T. et al. Relationship between faecal egg counts and total worm counts in sheep infected with gastrointestinal nematodes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, p. 45-50, 2000.
- AMARANTE, AFT do et al. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary parasitology**, v. 120, n. 1-2, p. 91-106, 2004.
- ARPAIA, Nicholas et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 451-455, 2013.
- BOLYEN, Evan et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852-857, 2019.
- BRAGA, RAMAYANA MENEZES; GIRARDI, JOÃO LUIZ. População de larvas de helmintos infestantes de ovinos em pastagem nativa de Roraima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 569-574, 1991.
- BROSSCHOT, Tara P.; REYNOLDS, Lisa A. The impact of a helminth-modified microbiome on host immunity. **Mucosal immunology**, v. 11, n. 4, p. 1039-1046, 2018.
- CALLAHAN, Benjamin J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.
- CHAGAS, Ana Carolina de Souza et al. Economic impact of gastrointestinal nematodes in Morada Nova sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, 2022.
- CHARLES, Terezinha Padilha. Disponibilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitas de ovinos deslanados no semi-árido pernambucano. **Ciência Rural**, v. 25, p. 437-442, 1995.
- CORRÊA, Patricia Spoto et al. The effect of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* infection on the ruminal microbiome of lambs. **Experimental Parasitology**, v. 231, p. 108175, 2021.

CORTÉS, Alba et al. Infection with the sheep gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta* increases luminal pathobionts. **Microbiome**, v. 8, p. 1-15, 2020.

COSTA, Valéria MM; SIMÕES, Sara VD; RIET-CORREA, Franklin. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 65-71, 2011.

COX, N. A. et al. Effect of butyric or lactic acid on the in vivo colonization of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 3, n. 4, p. 315-318, 1994.

DAVIE, James R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 7, p. 2485S-2493S, 2003.

DE FREITAS, EDILSON PEREIRA. Identificação de caprinos resistentes a *Haemonchus contortus*. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Tese/dissertação (ALICE)**, 2017.

DENG, Y. F. et al. Influence of dairy by-product waste milk on the microbiomes of different gastrointestinal tract components in pre-weaned dairy calves. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42689, 2017.

DOBSON, Colin. Changes in the protein content of the serum and intestinal mucus of sheep with reference to the histology of the gut and immunological response to *Oesophagostomum columbianum* infections. **Parasitology**, v. 57, n. 2, p. 201-219, 1967.

ECHEVARRIA, F.A.M.; ARMOUR, J.L.; DUNCAN, J.L. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**. [S. l.]: Elsevier BV, ago. 1991. DOI 10.1016/0304-4017(91)90044-v. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(91\)90044-V](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(91)90044-V).

EL-ASHRAM, Saeed et al. Microbial community and ovine host response varies with early and late stages of *Haemonchus contortus* infection. **Veterinary research communications**, v. 41, p. 263-277, 2017.

FACÓ, O. et al. Raça Morada Nova: origem, características e perspectivas. 2008.

FAN, Qingshan; WANAPAT, Metha; HOU, Fujiang. Rumen bacteria influence milk protein yield of yak grazing on the Qinghai-Tibet plateau. **Animal Bioscience**, v. 34, n. 9, p. 1466, 2021.

FISHER, Roberta M. et al. The evolution of host-symbiont dependence. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 15973, 2017.

FONSECA, Z.A.A.S. et al. Relação sexual do parasitismo por *Haemonchus contortus* em Caprinos (*Capra hircus*). **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 31, Ed. 178, Art. 1200, 2011.

FULLER, Tova F. et al. Weighted gene coexpression network analysis strategies applied to mouse weight. **Mammalian Genome**, v. 18, p. 463-472, 2007.

GEERLINGS, Sharon Y. et al. *Akkermansia muciniphila* in the human gastrointestinal tract: when, where, and how?. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 75, 2018.

GENNARI, S. M. et al. Pathophysiology of Haemonchus placed infection in calves. **Veterinary Parasitology**, v. 38, n. 2-3, p. 163-172, 1991.

GEORGE, Melissa M. et al. Evaluation of changes in drug susceptibility and population genetic structure in Haemonchus contortus following worm replacement as a means to reverse the impact of multiple-anthelmintic resistance on a sheep farm. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 15, p. 134-143, 2021.

GHANBARI MAMAN, Leila et al. Co-abundance analysis reveals hidden players associated with high methane yield phenotype in sheep rumen microbiome. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

GONÇALVES, P. C.; VIEIRA, J. M. S. Primeira contribuição à sobrevivência de ovos e larvas de nematódeos de ovinos na pastagem, no Rio Grande do Sul. **Rev. Fac. Agron. Vet**, v. 6, p. 95-103, 1963.

H. Ueno, P.C. Gonçalves. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. **Japan International Cooperation Agency**, Tokyo (1998). 143 pp.

HAO, Yangyi et al. Rumen fermentation, digestive enzyme activity, and bacteria composition between pre-weaning and post-weaning dairy calves. **Animals**, v. 11, n. 9, p. 2527, 2021.

HENDERSON, Gemma et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2015.

HOGAN, Glenn et al. Microbiome analysis as a platform R&D tool for parasitic nematode disease management. **The ISME journal**, v. 13, n. 11, p. 2664-2680, 2019.

HU, Ruizhi et al. Dietary protocatechuic acid ameliorates inflammation and up-regulates intestinal tight junction proteins by modulating gut microbiota in LPS-challenged piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 11, p. 1-12, 2020.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agropecuária: Rebanho de Ovinos (Ovelhas e Carneiros)**. Rio de Janeiro: IBGE, 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>. Acesso em: 09 set. 2022.

ISSAKOWICZ, Juliano et al. Parasitic infection, reproductive and productive performance from Santa Inês and Morada Nova ewes. **Small Ruminant Research**, v. 136, p. 96-103, 2016.

JARDIM, W.R. Os ovinos. 4 ed. São Paulo: Livraria Nobel, 1987. 193p.

KEITH, RK. The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. **Australian Journal of Zoology**. [S. l.]: CSIRO Publishing, 1953. DOI 10.1071/zo9530223. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1071/ZO9530223>.

KHATTAK, B. et al. Biological control of Haemonchus contortus by fungal antagonists in small ruminants. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 16, n. 5, p. 5825-5835, 2018.

KIM, Myung H. et al. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. **Gastroenterology**, v. 145, n. 2, p. 396-406. e10, 2013.

KITTELMANN, Sandra et al. Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e47879, 2013.

KLINDWORTH, Anna et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 1, p. e1-e1, 2013.

LANGFELDER, Peter; HORVATH, Steve. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2008.

LI, Cong-jun; LI, Robert W. Butyrate induced cell cycle arrest in bovine cells through targeting gene expression relevant to DNA replication apparatus. **Gene regulation and systems biology**, v. 2, p. GRSB. S465, 2008.

LI, Robert W.; LI, CongJun. Butyrate induces profound changes in gene expression related to multiple signal pathways in bovine kidney epithelial cells. **BMC genomics**, v. 7, p. 1-14, 2006.

LI, Siqi et al. Diet Type Impacts Production Performance of Fattening Lambs by Manipulating the Ruminal Microbiota and Metabolome. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

LIU, Jing et al. Pectin induces an in vitro rumen microbial population shift attributed to the pectinolytic Treponema group. **Current Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 67-74, 2015.

LOPES, Lucas Dantas et al. Exploring the sheep rumen microbiome for carbohydrate-active enzymes. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 108, p. 15-30, 2015.

MAMUN, Md Abdullah Al et al. Variation in gut bacterial composition is associated with Haemonchus contortus parasite infection of sheep. **Animal Microbiome**, v. 2, p. 1-14, 2020.

MATHEW, Omana P.; RANGANNA, Kasturi; MILTON, Shirlette G. Involvement of the antioxidant effect and anti-inflammatory response in butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 11, p. 1008-1027, 2014.

MCCANN, Joshua C. et al. Relationship between the rumen microbiome and residual feed intake-efficiency of Brahman bulls stocked on bermudagrass pastures. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e91864, 2014.

MENDES, Janaína Palermo et al. Haemonchus contortus e Medidas Estratégicas de Controle para Ovinos. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 2, p. 105-110, 2020.

MOLENTO, Marcelo Beltrão et al. Famacha guide as an individual clinic parameter for Haemonchus contortus infection in small ruminants. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1139-1145, 2004.

NICIURA, Simone Cristina Méo et al. Genome-Wide Association Study for *Haemonchus contortus* Resistance in Morada Nova Sheep. **Pathogens**, v. 11, n. 8, p. 939, 2022.

NOVAIS, Francisco José et al. Identification of a metabolomic signature associated with feed efficiency in beef cattle. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2019.

O'CONNOR, Lauren J.; KAHN, Lewis P.; WALKDEN-BROWN, Stephen W. The effects of amount, timing and distribution of simulated rainfall on the development of *Haemonchus contortus* to the infective larval stage. **Veterinary parasitology**, v. 146, n. 1-2, p. 90-101, 2007.

PENG, Shuai et al. First insights into the microbial diversity in the omasum and reticulum of bovine using Illumina sequencing. **Journal of Applied Genetics**, v. 56, p. 393-401, 2015.

QUAST, Christian et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012.

RANSOM-JONES, Emma et al. The Fibrobacteres: an important phylum of cellulose-degrading bacteria. **Microbial ecology**, v. 63, p. 267-281, 2012.

RITCHIE, Marylyn D. et al. Methods of integrating data to uncover genotype–phenotype interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 2, p. 85-97, 2015.

ROBERTS, FHS; O'SULLIVAN, PJ. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**. [S. l.]: CSIRO Publishing, 1950. DOI 10.1071/ar9500099. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1071/AR9500099>.

ROONEY, James et al. Vaccination against the brown stomach worm, *Teladorsagia circumcincta*, followed by parasite challenge, induces inconsistent modifications in gut microbiota composition of lambs. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2021.

ROWE, A. et al. Sequential microarray to identify timing of molecular responses to *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Veterinary parasitology**, v. 161, n. 1-2, p. 76-87, 2009.

SALVI, Pooja S.; COWLES, Robert A. Butyrate and the intestinal epithelium: modulation of proliferation and inflammation in homeostasis and disease. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1775, 2021.

SCOTT, Ian et al. Abomasal dysfunction and cellular and mucin changes during infection of sheep with larval or adult *Teladorsagia circumcincta*. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0186752, 2017.

SEEDORF, Henning et al. RIM-DB: a taxonomic framework for community structure analysis of methanogenic archaea from the rumen and other intestinal environments. **PeerJ**, v. 2, p. e494, 2014.

SOLDEN, Lindsey M. et al. New roles in hemicellulosic sugar fermentation for the uncultivated Bacteroidetes family BS11. **The ISME journal**, v. 11, n. 3, p. 691-703, 2017.

SOUZA, Maria de Fátima de et al. Seasonal distribution of gastrointestinal nematode infections in sheep in a semiarid region, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 351-359, 2013.

TANCA, Alessandro et al. Diversity and functions of the sheep faecal microbiota: A multi-omic characterization. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 541-554, 2017.

TOSCANO, João Henrique Barbosa. Caracterização de respostas imunes locais associadas ao fenótipo de resistência parasitária em cordeiros da raça Morada Nova. 2019.

VAN HOUTERT, Martin FJ; SYKES, Andrew R. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. **International journal for parasitology**, v. 26, n. 11, p. 1151-1167, 1996.

VAN WYK, J.A.; BATH, G.F. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research**, v. 33, n. 5, p. 509-529, 2002.

VIANA, Marcus Vinicius Gonçalves et al. Resistance of *Haemonchus contortus* to monepantel in sheep: first report in Espírito Santo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, 2021.

WANG, Chun Chun et al. Sodium butyrate enhances intestinal integrity, inhibits mast cell activation, inflammatory mediator production and JNK signaling pathway in weaned pigs. **Innate immunity**, v. 24, n. 1, p. 40-46, 2018.

WEI, Xiaojuan et al. Seasonal diets supersede host species in shaping the distal gut microbiota of Yaks and Tibetan sheep. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 22626, 2021.

WOOD, I.B.; AMARAL, N.K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J.L.; KASSAI, T.; MALONE, J.B., Jr.; PANKAVICH, J.A.; REINECKE, R.K.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S.M.; VERCRUYSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**. [S. l.]: Elsevier BV, jun. 1995. DOI 10.1016/0304-4017(95)00806-2. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00806-2](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(95)00806-2).

WOOLASTON, R. R.; BAKER, R. L. Prospects of breeding small ruminants for resistance to internal parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 8-9, p. 845-855, 1996.

XIANG, Hai et al. *Haemonchus contortus* Infection Alters Gastrointestinal Microbial Community Composition, Protein Digestion and Amino Acid Allocations in Lambs. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

ZHANG, Bin; HORVATH, Steve. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. **Statistical applications in genetics and molecular biology**, v. 4, n. 1, 2005.

ZHAO, Wei et al. Weighted gene coexpression network analysis: state of the art. **Journal of biopharmaceutical statistics**, v. 20, n. 2, p. 281-300, 2010.