

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DE PERFIS EPIGENÔMICOS EM CÉLULAS NUCLEADAS DO  
SANGUE DURANTE A EXPOSIÇÃO AO CALOR EM BOVINOS DAS  
RAÇAS ANGUS E NELORE**

**Ludmilla Balbo Zavarez**

Médica Veterinária

**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DE PERFIS EPIGENÔMICOS EM CÉLULAS NUCLEADAS DO  
SANGUE DURANTE A EXPOSIÇÃO AO CALOR EM BOVINOS DAS  
RAÇAS ANGUS E NELORE**

**Ludmilla Balbo Zavarez**

**Orientador: Prof. Adj. José Fernando Garcia**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

Z39a	<p>Zavarez, Ludmilla Balbo</p> <p>Análise de perfis epigenômicos em células nucleadas do sangue durante a exposição ao calor em bovinos das raças Angus e Nelore / Ludmilla Balbo Zavarez. -- Jaboticabal, 2018</p> <p>71 p. : il., tabs.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: José Fernando Garcia</p> <p>1. Bovino. 2. Epigenética. 3. Estresse Térmico. 4. Metilação do DNA. 5. RRBS. I. Título.</p>
------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.

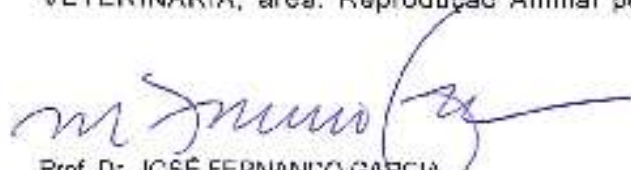
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ANÁLISE DE PERFILS EPIGENÔMICOS EM CÉLULAS NUCLEADAS DO SANGUE DURANTE A EXPOSIÇÃO AO CALOR EM BOVINOS DAS RAÇAS ANGUS E NELORE

AUTORA: LUDMILLA BALBO ZAVAREZ

ORIENTADOR: JOSÉ FERNANDO GARCIA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. JOSÉ FERNANDO GARCIA  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA-Araçatuba/SP



Prof. Dr. MARCOS VINÍCIUS GUALBERTO BARBOSA DA SILVA  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Juiz de Fora/MG



Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTTI  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA/UNESP - Araçatuba



Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / UNESP Campus Araçatuba



Prof. Dr. FÁBIO ANTONIO CADIOLI  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FMVA/UNESP - Araçatuba

Jaboticabal, 28 de outubro de 2018

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**LUDMILLA BALBO ZAVAREZ** - filha de Ivone Aparecida Balbo Zavarez e João Edno Zavarez, nascida em 05 de julho de 1988 em Araçatuba-SP, Brasil. Zavarez é formada pelas Faculdades Adamantinenses Integradas (FAI), como Médica Veterinária (Bacharelado em Medicina Veterinária) em 2011. Nesse mesmo ano, realizou estágio no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal (LBBMA) na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Araçatuba, sob a supervisão do Prof. Adj. José Fernando Garcia e no Departamento de Reprodução Animal na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, sob a supervisão do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia. Iniciou seu mestrado por meio do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV - UNESP, Campus de Jaboticabal, em agosto de 2012, com foco na área de Reprodução Animal. Durante o período de mestrado Zavarez recebeu bolsas de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). No ano de 2013, Zavarez cursou disciplinas de pós-graduação em dois campus da Unesp, Araçatuba e Jaboticabal. Dedicou-se também ao desenvolvimento do projeto de mestrado e participou na publicação de artigos juntamente com membros do grupo de pesquisa do LBBMA. De Fevereiro a Junho de 2014, Zavarez realizou estágio de pesquisa no exterior, no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture - USDA*), sob supervisão do Pesquisador Dr. Tad S. Sonstegard. Em Março de 2015, Zavarez iniciou o curso de pós-graduação nível doutorado na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) no campus de Jaboticabal e teve a publicação de um artigo em revista internacional e como primeira autora, sendo intitulado como "Assessment of autozygosity in Nelore cows (*Bos indicus*) through high-density SNP genotypes". *Frontiers in Genetics*, v.6, p.1 - 8, 2015. Também participou de outros artigos que foram publicados nas revistas *Scientific Reports*, *Plos One*, *BMC Genetics*. Realizou estágio de pesquisa no exterior, no Departamento de Zootecnia da *Università Cattolica Duò Sacro Core (Unicatt)*, e na empresa *Parco Tecnológico Padano (PTP)* no norte da Itália (Piacenza e Lodi), sob supervisão do Professor Paolo Ajmone Marsan. No final do ano de 2015 e no ano de 2016, Zavarez dedicou-se ao experimento com coletas de tecidos biológicos, tais como: fígado, pele, músculo e gordura dos bovinos das raças Nelore e Angus. No ano de 2017, cursou disciplinas de pós-graduação em dois campus da Unesp, Araçatuba e Jaboticabal e em

2018 realizou as análises estatística e dos padrões de metilação do DNA de bovinos das raças Angus e Nelore. Ministrou palestras sobre Epigenética em duas faculdades de Medicina Veterinária. Participou das aulas ministradas pelo Prof. Dr. José Fernando Garcia durante quatro horas/semanais como monitora, e também exercia a docência por duas horas/semanais para os alunos do primeiro ano do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA - UNESP).

***“Todo caminho da gente é resvaloso.***

***Mas também, cair não prejudica demais – a gente levanta, a gente sobe, a gente volta!...***

***O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:  
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.***

***O que ela quer da gente é coragem.”***

***João Guimarães Rosa, Grande sertão: Veredas, 1956***

## DEDICO

*Aos meus pais (João e Ivone) e irmãos (Larissa e Vitor) pelo incentivo, apoio e amor incondicional.*

*Amo vocês!*



## AGRADECIMENTOS

São meus sinceros agradecimentos....

Agradeço profundamente a **Deus** por ter me dado força e serenidade para percorrer esse caminho e também pela conquista e realização de mais uma etapa da vida!

Ao meu orientador **Prof. Adjunto José Fernando Garcia**, pela orientação, os ensinamentos valiosos e exemplo de excelente pesquisador. Agradeço também pela oportunidade de desenvolvimento desta pesquisa e por ter contribuído no meu crescimento profissional, como também por toda dedicação, apoio e paciência durante o desenvolvimento dos nossos trabalhos.

Ao **Prof. Assistente Dr. Joaquim Mansano Garcia** pela oportunidade de ingressar nessa instituição desde os estágios extracurriculares na época da graduação, por ter me aberto as portas do seu laboratório juntamente com a **Marina**, meu enorme carinho!

Meus sinceros agradecimentos ao **Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira** pelas diretrizes durante o experimento com os animais.

Ao **João**, meu namorado, companheiro de todos os momentos durante o curso, por me fortalecer, estimular, apoiar, ter paciência, dedicação e amor. Te amo!

Aos meus avós, tios e primos por serem meus amigos, companheiros e acima de tudo, minha **família**. Obrigada por tudo!

Às amigas de todos os tempos **Camilla Pontes, Anne e Helô Marangoni, Patrícia Oshiro, Ana Luíza Noronha, Miriam, Maira e Bruna Morgado**.

Ao casal de amigos mais que especiais, Dona **Neusa** e Sr **David**, pelo incentivo, apoio, ensinamentos e amor incondicional.

Meu muito obrigada à **Andressa Leão** por tanta dedicação, cuidados, ensinamentos que levarei por toda vida! Você me fez crescer muito como pessoa e ampliou meus horizontes.

Aos meus pupilos estagiários **Samanta, Guilherme e Rafael**, que tanto me ajudaram no desenvolvimento do projeto, apoio, carinho e manejo dos animais. Sem vocês não seria possível. Vocês são ótimos!

Às minhas amigas **Cidinha e Vânia** pelo apoio espiritual, verdadeiras anjinhas de Deus.

Às minhas amigas de pós-graduação **Nicole Tramonte, Roberta Gaspar, Júlia Pierucci, Marina Mechler e Nathália** pela amizade, companheirismo e carinho.

À todos os colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal da Unesp de Araçatuba, por todos os momentos de convivência: **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cáris, Yuri, Rafaela, Pier, Anirene, Adam, Silvana, Fernanda, Marco Milanessi, Tamiris, Dandara, Flávia, Kenya, Sarita e Carolina.**

Aos alunos de iniciação científica do UniSalesiano **Ailana e Nathan** meu muito obrigada. Sigam em frente com muita dedicação e empenho.

Ao **Prof. Paolo Ajmone Marsan** pela colaboração, incentivo, confiança e oportunidade de trabalhar no seu laboratório e os demais pesquisadores do Departamento de Zootecnia da Itália – *Università Cattolica Duo Sacro Core*.

A empresa **Parco Tecnológico Padano – PTP** situada na cidade de Lodi na Itália, aos diretores e pesquisadores: **Alessandra, Francesco, Ezequiel, Filippo, Stefano, Riccardo, Gabriele, Andrea, Paolo, Ilaria, Barbara, Stefano Fratinni, Serena e Piero**

Aos membros da banca do exame de qualificação e defesa, **Prof. Dr. Heidge Fukumasu e Prof. Dr. Felipe Perecin, Prof. Dr. Guilherme de P. Nogueira, Prof. Dr. Fabiano Cadioli, Dr. Marcos Vinícius B. da Silva e Profa. Dra. Gisele Mingoti** pelas excelentes sugestões e contribuições na correção deste trabalho.

Às fazendas do estado do **Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul** pela disponibilização dos animais que utilizamos durante a experimentação científica.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal** instituição pela qual tenho enorme carinho. À ela devo minha formação científica.

À **Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, Araçatuba**, pelos ensinamentos e desenvolvimento da parte experimental do projeto de pesquisa.

Aos alunos **Danilo, Adelina, Betinho, Cabelo, João, André e Jaleco** e aos funcionários **Adão e Pedro** pela participação na alimentação e manejo dos animais.

Ao **Dr. Paulo** da USP que me treinou nas biópsias de fígado.

À todos os **funcionários da Seção de Pós-graduação da Unesp** de Jaboticabal e Araçatuba pelos esclarecimentos em relação as normas da pós-graduação, meu muito obrigada!

Ao **CNPq** e a **FAPESP** pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

**MUITO OBRIGADA!**

**Ludmilla Balbo Zavarez**

**Jaboticabal, Outubro 2018.**

## **APOIO FINANCEIRO**

Este projeto obteve bolsa para desenvolvimento do projeto pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob processo nº407102/2013 – 0;

Bolsa de pesquisador visitante especial pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob processo nº 202722/2015 – 5;

Bolsa do país concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob processo nº 2015/08553 – 4.

## SUMÁRIO

ANÁLISE DE PERFIS EPIGENÔMICOS EM CÉLULAS NUCLEADAS DO SANGUE DURANTE A EXPOSIÇÃO AO CALOR EM BOVINOS DAS RAÇAS ANGUS E NELORE .	iv
ANALYSIS OF EPIGENOMIC PROFILES IN NUCLEATED BLOOD CELLS DURING EXPOSURE TO HEAT IN ANGUS AND NELORE CATTLE .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	11
3. HIPÓTESE .....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1 Animais.....	30
4.2 Etapas Experimentais.....	31
4.2.1 Período de Adaptação (PRE) .....	31
4.2.2 Período de Desafio (EXP) .....	32
4.2.3 Período de Recuperação (POST).....	32
4.3 Dados Ambientais.....	32
4.4 Análises epigenômicas .....	33
4.4.1 Extração do DNA Genômico.....	34
4.4.2 Bibliotecas de Sequenciamento de Bissulfito de Representação Reduzida (RRBS)..	34

4.4.3 Identificação e caracterização de Regiões Metiladas Diferencialmente (DMR).....	36
4.4.4 Análise das Interações Gênicas (redes gênicas).....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÕES .....	46
7. REFERÊNCIAS .....	46



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Compreensão de padrões de metilação em bovinos para adaptações ao estresse térmico**", Processo FOA nº 2014-01445, sob responsabilidade de Guilherme de Paula Nogueira apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Junho de 2015.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 15 de Janeiro de 2017.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 15 de Fevereiro de 2017.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Understanding methylome patterns of cattle adaptation to heat stress**", Protocol FOA nº 2014-01445, under the supervision of Guilherme de Paula Nogueira presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 24, 2015.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** January 15, 2017.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** February 15, 2017.

**Profa. Adj. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende**  
Vice-Coordenadora da CEUA  
CEUA Vice-Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP  
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

## ANÁLISE DE PERFIS EPIGENÔMICOS EM CÉLULAS NUCLEADAS DO SANGUE DURANTE A EXPOSIÇÃO AO CALOR EM BOVINOS DAS RAÇAS ANGUS E NELORE

**RESUMO** – Uma das questões mais interessantes que poderiam ser elucidadas empregando a análise de metilação em todo o genoma é como ela afeta a regulação da temperatura corporal em animais domésticos. A resposta a esta questão torna-se imperativa, particularmente no caso de bovinos de leite e corte, uma vez que as raças modernas mais populares descendem de ancestral comum, que derivou em duas subespécies (*Bos taurus* e *Bos indicus*) as quais respondem aos estímulos ambientais de formas opostas (raças de zonas temperadas ou adaptadas a regiões tropicais, respectivamente). Mapas de metilação do DNA genômico foram originados usando a técnica de RRBS à partir de células nucleadas do sangue de um grupo de bovinos Angus e Nelore puros, expostos ao estresse ambiental condicionado pelo calor. Os dados de metilação distribuídos ao longo dos cromossomos bovinos puderam ser representados graficamente, enfatizando padrão altamente homogêneo entre as amostras analisadas e a robustez do método. A cobertura de sequenciamento empregada foi suficientemente profunda (em todos os casos superior a 20 vezes o tamanho do genoma), permitindo concluir sobre a ocorrência de eventos de metilação do DNA possivelmente associados a alterações fisiológicas causadas pelo estresse térmico. A análise da metilação do DNA revelou 4.662 janelas metiladas diferencialmente (cada uma com 1.000 pares de bases), sendo a maioria (2.695) relacionada a diferenças entre as raças e não diretamente à resposta ao estresse térmico. A análise das 214 janelas comuns (compreendendo 103 genes) revelou sinais epigenéticos relacionados à resposta ao estresse por calor e à recuperação deste, que foram principalmente específicos da raça. A comparação dos padrões de metilação do DNA em células nucleadas, apontou para genes específicos diferencialmente metilados (ACTL8, PNOC e FGFR2) que poderiam ser o resultado de mudanças epigenômicas que ocorrem durante adaptação às mudanças climáticas drásticas. Ficou evidente a presença de sítios de metilação do DNA no genoma nessas raças bovinas que devem interferir na regulação de processos metabólicos, tais como ruminação, digestão, capacidade de dissipação do calor, entre outros, e que afetam diretamente o desempenho econômico da produção pecuária. Exploração mais profunda dos mecanismos que os genes candidatos metilados usam para interagir e desempenhar suas funções faz-se necessária para melhorar o entendimento sobre esse comportamento adaptativo dos bovinos.

**Termos-chave:** Bovino, Epigenética, Estresse Térmico, Metilação do DNA, RRBS



## ANALYSIS OF EPIGENOMIC PROFILES IN NUCLEATED BLOOD CELLS DURING EXPOSURE TO HEAT IN ANGUS AND NELORE CATTLE

**ABSTRACT** – One of the most interesting questions that could be solved using genome-wide methylation analysis is how it affects the regulation of body temperature in domestic animals. The answer to this question becomes imperative, particularly in the case of dairy and beef cattle, since modern breeds more frequently descended from a common ancestor, derived in two subspecies (*Bos taurus* and *Bos indicus*), which respond to environmental stimuli of different forms (breeds of temperate zones and adapted to tropical regions, respectively). Genomic maps were originated using RRBS DNA methylation data from nucleated blood cells of a group of pure Angus and Nelore cattle exposed to environmental heat stresses. Methylation data distributed along the bovine chromosomes could be represented graphically, emphasizing a highly homogeneous pattern between the analyzed samples and the robustness of the method. The sequencing coverage used was sufficiently deep (in all cases higher than 20 times the genome size) leading to the identification of DNA methylation events possibly associated with physiological changes caused by heat stress. The DNA methylation analysis showed a total of 4,662 differentially methylated windows (each with 1,000 base pairs), most of them (2,695) related to differences between breeds and not to the response to heat stress. Analysis of the 214 common windows (comprising 103 genes) revealed epigenetic signals related to the heat stress response and recovery, which were mainly breed-specific. Comparison of DNA methylation patterns in nucleated cells, pointed to genomic regions and differentially methylated specific genes (ACTL8, PNOC e FGFR2) that could be the result of epigenic changes occurring during acute adaptation to drastic climate changes. It was evident the presence of DNA methylation sites in the genome of these bovine breeds, which should interfere in the regulation of metabolic processes, such as rumination, digestion, heat dissipation capacity, among others, and which directly affect the economic performance of livestock production. Deeper investigation of the mechanisms these candidate methylated genes use to interact and perform their functions is necessary to improve understanding of this adaptive behavior in cattle.

**Keywords:** Bovine, DNA Methylation, Epigenetics, Heat Stress, RRBS

## LISTA DE ABREVIATURAS

AUC: área sob a curva;

AUCS5D: cinco dias sob condições de verão;

AUCW5D: cinco dias sob condições de inverno;

BTA20: cromossomo 20 do *Bos taurus*;

ChIP-seq: Sequenciamento de imunoprecipitação da cromatina;

CGIs: ilhas CpG;

CpG: base C (citosina) seguida imediatamente por uma base G (guanina);

DEGs: Genes expressados diferencialmente;

DMGs: Genes metilados diferencialmente;

DMRs: Regiões metiladas diferencialmente;

DNA: Ácido desoxirribonucleico;

DNMTs: DNA metiltransferases: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B;

DNMT3L: Isoformas das metiltransferases;

EEF1D: Fator de alongamento de tradução eucariótica 1 delta

EVHL: Perda de calor por evaporação cutânea;

GWAS: Estudo de Associação Genômica;

HSF: Fator de transcrição do choque térmico;

HSF1: Fator de transcrição do choque térmico 1;

HSP: Proteína de choque térmico;

HSP70: Proteína de choque térmico 70;

IGF2: Fator de Crescimento da Insulina 2

Mb: Megabase ( $10^6$  nucleotídeos);

MBD: Regiões de domínios de ligação para a metilação;

MBD-seq: Sequenciamento de domínio de ligação de metil-CpG;

MeDIP: Sequenciamento de imunoprecipitação de DNA metilado

NaHSO<sub>3</sub>: Bissulfito de sódio;

NGS: Tecnologia de sequenciamento da próxima geração;

PRLR: Via de sinalização de prolactina e do seu receptor;

QTL: Loci de características quantitativas;

RNA: Ácido ribonucleico;

RNAmi: Micro RNA;

RNA-Seq: Sequenciamento de RNA;

RPL8: Proteína L8 ribossomal na subunidade 60S;

RRBS: Método de sequenciamento de bisulfito de baixa representação;

SAM: S-adenosil metionina;

SNP: Polimorfismo de sítio único.

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Médias dos parâmetros ambientais durante o experimento.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Diagrama de Venn de janelas metiladas diferencialmente em diferentes raças (Angus e Nelore) e estações (fevereiro e junho).

**Figura 2.** Representação circular (Circos Plot) da distribuição genômica de DMRs. O círculo externo exibe os cromossomos bovinos. O círculo concêntrico externo representa as DMRs em Angus e o interno representa as DMRs em Nelore. No total, são representadas graficamente as 214 DMRs comuns às duas raças e os 103 genes metilados diferencialmente. Barras vermelhas indicam maior metilação e barras verdes menor metilação.

**Figura 3.** Representação circular (Circos Plot) da distribuição genômica de DMRs. O círculo externo exibe os cromossomos bovinos. O círculo concêntrico externo representa as DMRs exclusivamente em Angus e o interno representa as DMRs exclusivamente em Nelore. No total, são representadas graficamente as 857 DMRs e os 352 genes metilados em Angus exclusivamente e as 896 DMRs e os 367 genes metilados em Nelore exclusivamente. Barras vermelhas indicam maior metilação e barras verdes menor metilação.

**Figura 4.** Representação gráfica de rede gênica onde os nós identificam os genes e em as arestas os níveis de interação entre eles.

## 1. INTRODUÇÃO

Mudanças climáticas extremas, rápidas e imprevisíveis, tais como secas e ciclos de altas temperaturas, estão afetando a produtividade agrícola mundial e podem comprometer a segurança alimentar global. As mudanças climáticas estão alterando as estações de crescimento e mudando a viabilidade regional de culturas agrícolas específicas, além de desafiar a permanência de recursos genéticos pecuários em diversas situações específicas. Nas áreas mais vulneráveis a essas mudanças, a criação de animais com manutenção da boa forma e produtividade requer que se considerem o estresse térmico e a diminuição da disponibilidade de água no seu planejamento, visando garantir a ocorrência do menor nível de estresse possível (Burfeind et al., 2012). Assim, adaptações às rápidas mudanças climáticas são fundamentais para o setor pecuário, devido a demanda mundial por produtos de origem animal, que aumenta em taxas maiores do que as do crescimento da população humana.

A região sul da Índia, berço da raça Nelore, apresenta elevadas temperaturas ao longo de todo o ano, sendo seu clima semelhante ao de grande parte do Brasil, o que contribui para a rápida adaptação desses bovinos ao ambiente nacional. Especificamente no Brasil, a maioria das regiões que desenvolvem a atividade de pecuária estão localizadas perifericamente à linha do Equador, fazendo com que a influência do estresse térmico seja tópico de alta relevância na seleção e melhoramento de bovinos e quando não considerada, compromete a produtividade e o desempenho dos animais sob essas condições (Ayoade, 1991, Almeida, 2009).

Os zebuínos (*Bos indicus*) são mais termotolerantes que os taurinos (*Bos taurus*), devido às diferenças no processo evolutivo de seleção natural vivenciado por essas raças, que proporcionou a fixação de alelos ligados à termotolerância, com consequente maior habilidade termorregulatória em função da menor taxa metabólica e alta capacidade de perda de calor para o ambiente (Hansen, 2004).

Acredita-se que os sistemas fisiológicos dos bovinos zebuínos foram adaptados ao longo do processo evolutivo (seleção natural), permitindo sua sobrevivência e reprodução em climas quentes, tornando-os animais adaptados e rústicos (Gaughan et al., 2009).

Nesse sentido, a busca da compreensão dos mecanismos fisiológicos, genéticos e epigenéticos que controlam a termotolerância em bovinos faz-se extremamente oportuna e necessária para auxiliar no desenvolvimento da atividade pecuária bovina no Brasil. Para tanto, abordagens que envolvam a análise de dados de metilação e padrões de alterações epigenômicas são apropriadas para a melhor compreensão desse tema e proposição de soluções tecnológicas para o controle dos problemas relacionados a ele, sendo portanto o tema principal da presente tese.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### ***A dinâmica metabólica da tolerância ao calor em bovinos***

Atualmente, devido ao grande intercâmbio de germoplasma ao redor do mundo, uma mesma raça pode ser criada em ambientes com as mais variadas temperaturas médias, umidade e velocidade do ar, o que as força a se adaptar às condições ambientais momentâneas, demandando sensibilidade a ambientes que muitas vezes diferem daqueles onde elas foram originadas. Essa situação diminui potencialmente a eficiência da produção individual do animal e afeta no impacto do uso global de germoplasma animal (Young, 1983; Hahn, 1999).

Essencialmente qualquer variação ambiental pode influenciar o equilíbrio fisiológico de animais que realizam atividades metabólicas regulares sob uma determinada condição. Bovinos de leite e de corte criados a pasto podem estar mais expostos aos efeitos climáticos do que aqueles mantidos em condições ambientais controladas, estando sujeitos a maior interferência do ambiente na

saúde, fertilidade, no bem-estar e, em última análise, no desempenho econômico (St-Pierre; Cobanov; Schnitkey, 2003; Collier et al., 2012; Kim et al., 2018; Rahman et al., 2018).

O estresse térmico pode ser definido como a condição na qual o animal não consegue dissipar adequadamente o excesso de calor endógeno ou exógeno para manter a (homeostase) (Bernabucci et al., 2014). Em bovinos, o estresse térmico, ocasiona perdas econômicas relevantes devido à redução da produção e do desempenho reprodutivo (Aguilar et al., 2010; Nardone et al., 2010; Biffani et al. 2016).

Parâmetros fisiológicos específicos estão relacionados com a capacidade do animal em lidar com o estresse térmico, como por exemplo a temperatura corporal e a frequência respiratória, que aumentam quando os animais são expostos a ambiente com altas temperaturas (Perano et al., 2015; Dikmen et al., 2015).

A manifestação da resposta ao calor também está relacionada a fatores ambientais como, por exemplo, temperatura, umidade relativa do ar e radiação solar, que podem afetar a fisiologia, o comportamento, a reprodução e a produção animal (Bearden; Fuguay, 1980; West, 1999; Silva et al., 2002; Morais et al., 2003).

Quando o animal está em equilíbrio térmico, ou seja, quando todo o calor produzido pelo metabolismo (termogênese) é perdido para o meio ambiente (termólise), sem prejuízo relevante de seu rendimento metabólico, considera-se que o ambiente no qual o animal se encontra seja de conforto térmico. Quando o oposto ocorre, considera-se estresse térmico por calor, isto é, o animal começa a armazenar maior carga de calor do ambiente, dissipando pouco calor para o meio externo, fazendo-se necessário o uso de artifícios capazes de manter o equilíbrio térmico entre o animal e o ambiente (Pires; Campos, 2009).

O estresse térmico é fator crucial relacionado ao desempenho e produtividade no ambiente tropical brasileiro uma vez que pode afetar negativamente a fisiologia, saúde e comportamento animal (West, 2003; Hansen, 2004; Souza; Batista, 2012). Aproximadamente 93% do território brasileiro está localizado entre os trópicos de Câncer e de Capricórnio, na zona térmica tropical, onde há o predomínio de climas quentes e altos índices de radiação solar (Antunes, 1996). Dessa forma, o estresse térmico por calor é um



dos fatores limitantes da produção de animais nos trópicos, dificultando a exploração de raças especializadas tanto na produção de carne como de leite (Souza; Silva; Silva, 2011).

Neste contexto, para melhorar a eficiência dos animais domésticos criados em ambientes quentes, faz-se necessário entender a regulação genética, o metabolismo celular e endócrino da termólise por evaporação cutânea ou respiratória (Gebremedhin; Wu, 2002). Vários fatores podem influenciar o organismo a responder ao processo de desencadeamento do estresse pelo calor por meio do acionamento da maquinaria celular e metabólica, com o intuito de estabelecer a homeostasia do animal (Collier et al., 2008). Segundo Sonna et al. (2002) e Collier et al. (2006), a resposta ao estresse térmico é uma cascata altamente conservada de regulação de proteínas e alteração na expressão de genes em resposta aos estressores.

Em elevadas temperatura do ambiente, geralmente acima de 35°C, os sistemas celular, tecidual e metabólico começam a ser ativados na superfície da pele dos bovinos, para reduzir a produção interna de calor e dissipá-lo para o ambiente, por intermédio da evaporação. A exposição da célula ao aumento de temperatura induz uma série de alterações na função celular, as quais incluem: inibição na síntese de proteínas, defeitos na estrutura e função das proteínas, mudanças morfológicas (devidas ao rearranjo do citoesqueleto), mudanças no metabolismo, alterações em membranas celulares e diminuição na proliferação celular. Essas alterações envolvem mudanças na transcrição de genes em resposta ao estresse térmico levando a célula a entrar em apoptose ou aclimatação, na dependência do tipo celular e de tecido (Collier et al., 2008; Azevedo; Alves, 2009).

Para reduzir o efeito do estresse térmico sobre a produtividade de bovinos criados em climas quentes, é necessário que o animal dissipe eficientemente o calor para o ambiente e reduza o ganho de calor concomitantemente. De acordo com Baliscai (2012), mudanças na temperatura, incidência de radiação e umidade do ar estão diretamente relacionadas ao estresse térmico dos bovinos. Pires e Campos (2009) enfatizaram que as mudanças nos padrões de pastejo e ruminação e o deslocamento dos bovinos e ingestão frequente de água podem ser sinais de estresse por calor. De acordo com Rhoads et al. (2009), o estresse

térmico afeta direta e indiretamente os parâmetros produtivos, fisiológicos e comportamentais dos bovinos.

Os bovinos possuem glândulas sudoríparas denominadas apócrinas, que estão associadas com a fibra do pelo. Assim, a densidade do pelo afeta diretamente o número de glândulas sudoríparas e o diâmetro e o comprimento do pelo têm efeitos na perda de calor por evaporação cutânea (EVHL - *evaporative heat loss*), regulando o fluxo de ar na superfície da pele (Gebremedhin; Wu, 2002; Olson et al., 2003)

Tanto características físicas relacionadas ao ambiente quanto fenotípicas podem influenciar na forma de dissipação do calor quando armazenado em excesso, influenciando no controle da perda de calor por evaporação através da pele ou respiração. Segundo Da Silva et al. (2003), os fatores físicos que afetam a eficácia da EVHL a partir da superfície da pele são: a velocidade do vento, temperatura do ambiente, umidade relativa do ar e radiação solar, e os fatores relacionados aos animais são: superfície da pele, densidade, espessura, comprimento e cor do pelo, cor da pele e regulação ao suprimento vascular e epidérmico.

Adicionalmente, a carga de radiação térmica também corrobora para o desencadeamento do estresse pelo calor, sendo o principal fator limitante da produtividade dos bovinos por afetar a manutenção da temperatura corporal estável (Silva et al., 2002). Nesse contexto, abrigar os animais da radiação solar mediante o fornecimento de sombra pode ser uma das medidas para proporcionar o conforto térmico aos mesmos. Entretanto, essa medida não evita que os animais ainda recebam alguma parcela da incidência da radiação térmica mesmo estando na sombra, pois continuam expostos à radiação de forma indireta, ou seja, àquela que é refletida pelas nuvens e poeira no ar ou emitida através da pastagem, do solo, da vegetação, as quais inevitavelmente agirão sobre os animais (Berman, 2005).

Como a capacidade total de dissipação de calor de um animal homeotérmico é relativamente constante, o aumento da entrada de calor proveniente da radiação térmica do ambiente por meio da superfície de seu corpo aumenta a produção de calor metabólico, com impacto negativo na produtividade (Walsberg; Wolf, 1995). Em outras palavras, o animal absorve calor direta ou indiretamente da radiação solar, que é adicionado ao calor

produzido metabolicamente (calor metabólico), e ambos formam o ganho de calor do animal, que deve ser dissipado para manter a homeostase. Se esse animal for uma fêmea lactante exposta ao sol, por exemplo, a carga de calor radiante incidente sobre ela pode atingir três vezes a sua produção de calor metabólico (Da Silva et al., 2010).

Berman e Horovitz (2012) estimaram que temperaturas ambientais acima de 35°C ativam o sistema de resposta ao estresse pelo calor em vacas lactantes da raça Holandesa. Os autores avaliaram o impacto da temperatura da superfície da pele sobre a temperatura retal e a EVHL quando da exposição dos animais a três ambientes de ensaio: termoneutro, estresse pelo calor e estresse pelo calor com exposição à radiação solar. Os resultados desse estudo comprovaram que as vacas conseguiram manter a temperatura corporal na superfície da pele até os 35°C, mas que acima dessa temperatura ocorria o armazenamento do calor e aumento da temperatura retal, levando à condição de estresse térmico. O aumento da EVHL cutânea foi detectado quando as temperaturas estiveram acima de 35°C.

Várias reações metabólicas podem ocorrer em ruminantes em resposta ao estresse térmico, sendo uma das principais a acidose metabólica, que causa importantes perdas na produção (Porcionato et al., 2009). Mudanças nos padrões de fatores endócrinos e de sinalização durante o estresse térmico em vacas leiteiras têm impacto reconhecido na função do pâncreas e do tecido adiposo (Wheelock et al., 2010; O'Brien et al., 2010; Bernabucci et al., 2006).

### ***A dinâmica genética da tolerância ao calor em bovinos***

A característica tolerância ao calor é hereditária, havendo descrição de marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) em genes candidatos associados a regulação da temperatura corporal em bovinos (Dikmen et al., 2013; Dikmen et al., 2015). Entretanto, a seleção para adaptação ao estresse térmico com concomitante manutenção da produtividade é difícil e lenta, sendo que o emprego de informações genômicas precisas poderia acelerar o progresso genético no melhoramento para essa característica e reduzir os efeitos do estresse térmico na produção. Apenas alguns genes envolvidos na tolerância ao

calor em bovinos foram identificados e caracterizados até o momento (Collier et al., 2008). Trabalhos recentes que aplicaram Estudos de Associação Genômica Ampla – GWAS (do inglês *Genome Wide Association Study*) produziram resultados encorajadores. No entanto os fundamentos da biologia da adaptação ao calor ainda são poucos conhecidos e, muito menos ainda, aqueles afeitos à interação entre o genoma e o ambiente, em particular com relação aos mecanismos que medeiam as mudanças na expressão gênica e no metabolismo em animais submetidos ao estresse ambiental (Mehla et al., 2014, Macciotta et al., 2017).

As tecnologias desenvolvidas a partir do final do século XX que visaram sequenciar e caracterizar o genoma humano abriram o caminho para o sequenciamento dos genomas completos de todas as espécies importantes para a pecuária. Com o emprego de informações genômicas tem sido possível comparar e observar semelhanças e diferenças entre as espécies, raças, populações e indivíduos, identificando regiões variáveis ou conservadas, que codificam genes ou sequências reguladoras que, em última instância, controlam a expressão gênica. Nos animais de produção, consórcios entre instituições de pesquisa foram formados com o objetivo de investigar as variações existentes no genoma das espécies e desenvolver testes capazes de determinar o genótipo de milhares de marcadores SNP que puderam ser usados em processos de seleção genômica e na busca de variantes que influenciam características complexas através de GWAS (Bovine Hapmap Consortium, 2009; Minozzi et al., 2013). Graças aos “*SNP chips*”, diferenças na sequência de DNA do genoma, e também na sua organização e estrutura, puderam ser caracterizadas mais facilmente. Exemplos dessas diferenças são as variações do número de cópias (*copy number variation* – CNV), inserções e deleções, além de outros rearranjos que desempenham papel importante na expressão dos genes e conseqüentemente dos fenótipos a eles associados.

Modificações epigenéticas são influenciadas por condições ambientais e podem ser uma das razões fundamentais para a adaptação do indivíduo a estímulos externos do ambiente. Características de relevância para a produção pecuária têm sido comprovadas como dependentes do controle epigenético, como é o caso do IGF2 (do inglês: *Insulin Like Growth Factor 2*) que afeta o

crescimento em suínos (Van Laere et al., 2003) e do gene *Callipyge* que afeta o desenvolvimento corporal em ovinos (Georges et al 2003; Vuocolo et al., 2007), sendo identificados em ambos casos domínios cromossomais onde ocorre o *imprinting*. Indivíduos com os mesmos alelos em genes-chave podem apresentar fenótipos muito diferentes para as características controladas por eles, na dependência do alelo parental expresso. Evidências apontando para a importância das variações epigenéticas, em paralelo àquela atribuída às variações na sequência de DNA, tem sido recentemente comprovadas. O conhecimento da sequência e da estrutura do DNA de um indivíduo, associado às informações epigenéticas, permitirá a melhor predição dos fenótipos, com consequente aumento da eficiência da seleção animal, particularmente no que se refere a características importantes para a sustentabilidade pecuária e geração de produtos animais de melhor qualidade.

A exploração da relação entre fenótipos economicamente importantes na pecuária e as variações genéticas e epigenéticas ainda é limitada. Estudos recentes caracterizaram aspectos do metiloma do suíno e do frango (Li et al., 2012; Nätt et al., 2012). Um atlas do metiloma porcino para tecidos adiposos profundos e superficiais foi gerado como ferramenta para investigar a associação entre metilação e obesidade. Descobriu-se que regiões do DNA metiladas diferencialmente identificadas no estudo continham ao redor de 80% dos genes relacionados à obesidade humana já conhecidos ou candidatos, estando aproximadamente 72% deles localizados em regiões de QTL que afetam a gordura e a qualidade da carne suína (Li et al., 2012). Os padrões de metilação também foram estudados no genoma do frango, com o intuito de investigar a herdabilidade e o papel que a metilação pode desempenhar na adaptação e seleção da espécie. Nesse trabalho a sobre-representação de regiões metiladas diferencialmente entre indivíduos selvagens e domésticos, localizadas em regiões de varredura seletiva associadas à domesticação, sugeriram que novos padrões de metilação foram adquiridos por animais domésticos durante sua história de seleção (Nätt et al., 2012). Esses estudos destacaram o envolvimento de mecanismos epigenéticos relativos a características complexas e sua associação com marcadores SNP, implicando as variações epigenéticas nos mecanismos envolvidos na seleção e na domesticação das espécies.

A rede de genes presentes nas células e tecidos responde ao excesso de calor armazenado por meio de sinais intra e extracelulares que coordenam todo o metabolismo e aparato celular na biologia do animal (Collier et al., 2008). A regulação dessa rede de genes envolvidos na termorregulação é afetada de forma importante pela ação do Fator de Transcrição do Choque Térmico (HSF – *Heat Shock Factor*), o qual é expresso a partir do gene HSF1 (*Heat Shock Factor 1*), que é responsável por iniciar a resposta do organismo durante a elevação da temperatura celular, ou seja, quando se inicia o choque térmico (Pirkkala; Nykanen; Sistonen, 2001; Page et al., 2006). Outro gene importante envolvido nesse processo é o HSP70 (*Heat Shock Protein 70*), sendo responsável pela sinalização da termotolerância e pela ativação de genes associados com a apoptose celular (Collier et al., 2008).

As alterações metabólicas ocasionadas pela expressão desses genes incluem: a) ativação do Fator de Transcrição do Choque Térmico 1; b) aumento da expressão de proteínas do choque térmico; c) diminuição da expressão e síntese de outras proteínas; d) aumento de glicose e da oxidação de aminoácidos; e) redução no metabolismo dos ácidos graxos; f) ativação do sistema endócrino da resposta ao estresse e g) ativação do sistema imune via secreção extracelular das proteínas que respondem ao choque térmico (HSP - *Heat Shock Proteins*). Se o estresse persistir, as mudanças na expressão dos genes pode alterar o estado fisiológico referido como aclimatação. Portanto, a resposta ao estresse térmico está inteiramente integrada com a resposta fisiológica e com a rede de genes, as quais estão associadas a variedade de células e tecidos, com o intuito de minimizar os efeitos térmicos do ambiente sobre as funções celulares (Collier et al., 2008).

Howard et al. (2014) realizaram um estudo GWAS utilizando novilhos e novilhas mestiças, totalizando 239 animais com diferentes porcentagens de Angus, Simental e Piemontese, com o intuito de compreender a base genética da regulação da temperatura corporal desses animais. A mensuração da temperatura corporal foi adotada pela área sob a curva (AUC), ou seja, utilizando observações da temperatura corporal registradas a cada hora e somadas durante cinco dias sob condições de verão (AUCS5D) e inverno (AUCW5D).

A variância genética explicada pela janela de 1Mb no genoma desses animais, baseada na variância de SNP específicos, identificou as principais regiões associadas à susceptibilidade ao calor e ao frio. Os genes candidatos nessas regiões do genoma bovino incluíram aqueles envolvidos na resposta celular ao estresse (CCNH e TNRC6A), apoptose (FGD3, G2E3, RASA1, CSTB e DAPK1), transporte de íons (CACNG3, CLCN4, PRKCB e TRPC5) e geração de precursor de metabólitos de energia (COX4I1 e COX7C) para AUC5WD, e resposta celular ao estresse (STAC, WRNIP1, MLH1, RIPK1, SMC6 e GEN1), resposta ao calor (STAC), apoptose (MLH1, RIPK1 e SERPINB9), e transporte de íons (KCNS3, SLC22A23 e TRPC4) para AUCS5D. Em conclusão, diversas regiões genômicas que afetam a regulação da temperatura corporal durante o período de estresse térmico pelo calor e frio foram identificadas, as quais abrigam diversos genes candidatos com mutações de alto a baixo impacto (Howard et al., 2014).

Um exemplo clássico e bem conhecido da influência genética sobre o controle da temperatura em bovinos refere-se à mutação SLICK em bovinos, que foi primeiramente identificada nas raças Crioulas da América Central e determina alto nível de termotolerância para indivíduos portadores da mutação (Littlejohn et al., 2014; Huson et al., 2014). Essa mutação causa a presença de pelo curto e esparsos, além do aumento no número de glândulas sudoríparas por milímetro quadrado de pele, manifestando-se de modo dominante de herança genética. A mutação quebra a sequência codificadora do receptor de prolactina (PRLR) levando à síntese de proteínas anormais, o que causa importantes alterações nos mecanismos fisiológicos do termocontrole em bovinos (Littlejohn et al., 2014; Huson et al., 2014).

Mariasegaram et al. (2007) mapearam o *locus* do fenótipo SLICK na região 4,4 Mb no cromossomo 20 do bovino (BTA20), além de identificarem assinaturas de seleção derivadas de bovinos da raça Senepol. A presença do alelo SLICK tem papel relevante na tolerância térmica de algumas raças adaptadas a altas temperaturas e, conseqüentemente, no aumento da produtividade, sendo considerado produto da seleção natural e utilizado como um critério de seleção moderno para muitos criadores de raças de climas tropicais e subtropicais que o apresentam (Olson et al., 2003; Mariasegaram et al., 2007; Landaeta-Hernandez et al., 2011).

A diferença genética entre as subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus* (zebuína) é considerada responsável pelas diferenças na resposta ao estresse térmico, sendo as raças zebuínas mais resistentes a variações de temperatura e umidade ambiental do que a maioria das raças taurinas (Adeyemo et al., 1979; Bennett, et al., 1985; Madalena et al., 1990; Hammond et al., 1996; Hammond et al., 1998).

Nesse sentido, o melhoramento genético tem grande importância no processo de identificação e multiplicação de animais superiores para termotolerância, através da análise de marcadores moleculares do tipo SNP capazes de prever a capacidade de tolerância ao estresse térmico (Erbe et al., 2012; Garner et al., 2016). Entretanto, com os recentes avanços no conhecimento dos processos de controle da regulação da expressão gênica, particularmente daqueles mediados por alterações transientes que ocorrem ao longo da molécula de DNA dos cromossomos, denominadas de modificações epigenéticas, abriu-se um novo horizonte para o desenvolvimento da pesquisa científica, visando melhor entender o papel dessas alterações na fisiologia animal, em particular nos aspectos relacionados à termotolerância.

O termo epigenética foi usado pela primeira vez por em 1940, por Conrad Waddington para descrever as interações de genes com o meio ambiente e os caminhos que cada célula pode tomar durante o desenvolvimento. Epigenética significa “o que está acima” ou “em adição” à informação genética codificada no DNA, ou seja, é um ramo da genética que estuda os mecanismos que promovem a regulação da expressão de genes a nível da transcrição, por meio das alterações químicas no DNA e na cromatina (Feinberg; Tycko, 2004; Richards, 2006; Talbert; Henikoff, 2006). Essas alterações podem modificar ou não o fenótipo do animal, sem que ocorra alteração na sequência do código genético (Gibbs, 2007; Jirtle; Skinner, 2007; Waggoner, 2007). Segundo Peaston e Whitelaw (2006), a epigenética é definida como modificações químicas do DNA que não alteram a sua sequência nucleotídica, mas sim a probabilidade da transcrição dos genes, podendo ser transmitidas durante a divisão celular (mitose) e ao longo das gerações.

As alterações epigenéticas são adquiridas e estabelecidas ao longo da vida de um organismo e podem ser modificadas pelo ambiente. Experimentos recentes na área de epigenética sugerem que o meio ambiente em que um ser



vivo é inserido pode ser capaz de transmitir partículas elementares para a linha germinativa, sendo a metilação do DNA a forma mais comum desse tipo de modificação adquirida e transmissível (Tollefsbol et al., 2011).

As alterações epigenéticas podem ser herdadas de duas maneiras: 1) Transgeracionalmente, onde ocorre a influência na saúde das gerações celulares futuras (Jirtle; Skinner, 2007), 2) Mitoticamente em células somáticas, mecanismo pelo qual o ambiente afeta o epigenoma e pode produzir efeitos sobre a expressão dos genes por muito tempo (Murphy; Jirtle, 2003; Jirtle; Skinner, 2007).

A epigenética busca através da análise de fatores químicos externos ao DNA, explicar o aumento da variabilidade fenotípica existente nos animais, tornando-se importante ferramenta de estudo no que diz respeito a evolução das espécies, além de tentar explicar como o padrão de expressão gênica é transmitido para as próximas gerações e como os fatores ambientais podem mudar a maneira como os genes são expressos (Castro; Pereira, 2016).

O epigenoma refere-se ao processo dinâmico que envolve os padrões de alteração do DNA como um todo, dentro de uma mesma geração ou na transmissão desses padrões de uma geração para outra (Whitelaw e Whitelaw, 2006). Este varia de acordo com o ciclo celular, tipo celular, tecido e órgão, a idade do ser vivo, a espécie e os fatores ambientais (Dias Correia; Dias Correia, 2010) e está suscetível à desregulação influenciada por fatores ambientais durante a gestação, desenvolvimento neonatal, puberdade e idade adulta (Issa, 2000). Desse modo, os padrões epigenéticos são sensíveis a modificações ambientais que podem causar mudanças fenotípicas e podem ser transmitidas aos descendentes (Pray, 2004).

O epigenoma corresponde à cromatina, às proteínas associadas e aos padrões de modificações covalentes do DNA obtidos pela metilação, o que determina a organização e manutenção da expressão dos genes, além de permitir o conhecimento da funcionalidade desses genes (Muller; Prado, 2008; Dias Correia; Dias Correia, 2010). Desse modo, o epigenoma pode ser transmitido às células descendentes e manter um padrão epigenético específico dentro de linhagens celulares durante as gerações. Evidências de estudos em animais indicam que a exposição a fatores ambientais como radiação e agentes

químicos e físicos, durante os períodos pré e pós-natal, podem resultar numa programação epigenética alterada e, por consequência, o desenvolvimento de doenças (Jirtle; Skinner, 2007).

As modificações químicas no DNA são reversíveis, isto é, são constantemente feitas e desfeitas durante toda a vida do indivíduo, exceto para marcações químicas que são herdadas de geração para geração. Existem quatro tipos conhecidos de modificação epigenética: 1) mudanças na conformação ou acessibilidade da cromatina e posicionamento dos nucleossomos (proteínas chamadas histonas); 2) o silenciamento da expressão gênica mediado pelos RNAs não-codificadores e 3) a metilação do DNA (Rodenhiser; Mann, 2006; Moss; Wallrath, 2007; Sulewska et al., 2007), sendo essa última a mais conhecida e estudada em eucariotos como plantas, fungos, vertebrados e invertebrados (Kilgore, 2007; Zilberman, 2007) e 4) *Imprinting* genômico.

As principais modificações covalentes envolvidas no epigenoma são: metilações e acetilações das histonas, e metilações de citosinas do DNA. Essas alterações nos padrões epigenéticos de metilação do DNA podem eventualmente levar à reprogramação epigenética, o que resulta em marcas epigenéticas que serão transmitidas para as próximas gerações. Esse processo de reprogramação pode ocorrer na gametogênese, embriogênese, em indivíduos adultos e nos estágios iniciais da carcinogênese (Baylin; Herman, 2000; Bird, 2002; Herman; Baylin, 2003; Dias Correia; Dias Correia, 2010).

O mecanismo epigenético mais estudado e por isso melhor entendido são os padrões de metilação do DNA, cujo mecanismo é comum a todos os vertebrados e indispensável durante o desenvolvimento de um organismo vivo (Bock et al., 2012; Reik, 2007). Eles estão intimamente relacionados com a conformação da cromatina e expressão gênica. As regiões do genoma que são altamente metiladas estão associadas a conformação da cromatina no estado mais condensado, sendo denominada de heterocromatina. A heterocromatina geralmente aparece em maior quantidade em células menos ativas, sendo encontrada na zona geneticamente menos ativa, isto é, em locais onde há a interrupção ou o bloqueio da transcrição de genes (Javaid; Choi, 2017). Dessa forma, essas regiões do genoma altamente metiladas são responsáveis pelo silenciamento gênico, ou seja, pelo bloqueio da transcrição do DNA para RNA e consequentemente, a síntese de proteínas e expressão gênica.

Esta trata-se de uma modificação química na qual ocorre a adição covalente de um grupo metil à posição C5 do anel da citosina, por uma classe de enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b), usando S-adenosil-metionina (SAM) como um doador de metil (Miranda; Jones, 2007; Frattini et al., 2017) levando à formação de 5-metilcitosina (5-mC), que se encontra quase que exclusivamente nos genomas dos mamíferos, nos dinucleótidos CpG com ocorrência de 2 a 5%, sobretudo nas regiões 5' reguladoras dos genes. Os padrões de metilação são estabelecidos e mantidos nos dinucleotídeos CpG (pares de citosina-fosfato-guanina) por uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs). Essas, por sua vez, reconhecem os dinucleotídeos CpG hemimetilados, após a replicação do DNA (Feinberg, 2001; Caiafa; Zampieri, 2005; Klose; Bird, 2006; Fan et al., 2009).

O processo de metilação do DNA é mediado pela família das enzimas DNMTs, incluindo DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e sua isoforma DNMT3L (Klose; Bird, 2006; Kiefer, 2007; Fan et al., 2009), que catalizam e transferem o grupamento metil da S-adenosyl-L-metionina (doador de metil) para as bases de citosina ou adenina na molécula de DNA (Garinis et al., 2002; Dias Correia; Dias Correia, 2010).

A DNMT1 é a principal responsável pela manutenção dos padrões de metilação do DNA durante a mitose. Esta reconhece especificamente o DNA semi-metilado e metila a outra hélice do DNA. As DNMTs3 são responsáveis pela metilação das moléculas de DNA recém-sintetizadas, participando durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (Klose; Bird, 2006; Moss; Wallrath, 2007; Weidman et al., 2007). Algumas isoformas da DNMT3B, originadas por *splicing* alternativo, estão associadas a neoplasias relacionadas com o câncer de mama, de bexiga e carcinoma hepatocelular (Issa, 2000; Jaenisch; Bird, 2003; Luczak; Jagodzinski, 2006).

A metilação do DNA desempenha um papel importante na mediação de processos biológicos dos vertebrados, pois regula importantes funções celulares como a estabilidade do genoma, a determinação da plasticidade fenotípica em organismos, a inativação do cromossomo X, o *imprinting* genômico, a embriogênese, a reprogramação de genes não imprintados, além de atuar na

regulação gênica e na estabilidade cromossômica e crescimento e desenvolvimento em mamíferos (Bird, 2002; Tang; Ho, 2007; Costa; Pacheco, 2013; Lee et al., 2014; Couldrey et al., 2014).

A fusão do grupo metil na citosina tem a função de silenciar a expressão dos genes presentes nessa região do genoma. Sua ocorrência está por volta de 70% a 80% em regiões associadas aos promotores gênicos. Essas regiões são denominadas de Ilhas CpG, que tipicamente ocorrem em um contexto de dinucleotídeo CpG. As ilhas CpG são regiões do DNA onde o nucleotídeo chamado citosina é seguido pelo nucleotídeo guanina, em uma sequência linear de bases na direção da fita de DNA 5' para 3', sendo separados apenas por um grupo fosfato ( $5'-C-fosfato-G-3'$ ) (Bird, 2002, Goll; Bestor, 2005).

Adicionalmente, algumas regiões do DNA são ricas em sequências dinucleotídicas CpG e formam as ilhas CpG, as quais estão localizadas em sua maioria (cerca de 55%) nas regiões promotoras e contam com aproximadamente 40% dos genes presentes nos mamíferos. Essas ilhas CpGs possuem regiões genômicas com tamanho igual ou superior a 200 pares de bases (pb) de comprimento (Bird, 2002).

Essas ilhas CpG podem estar metiladas ou não. Geralmente elas são mantidas sem metilação, exceto nos casos da presença de genes *imprinting* ou situadas no cromossomo X inativo (Issa, 2000; Herman; Baylin, 2003), onde se tem a ligação de proteínas e enzimas que iniciam a transcrição. Em contrapartida, as ilhas CpG metiladas estão intimamente relacionadas ao silenciamento transcricional, ou seja, quando a transcrição é interrompida e em razão disso ocorre a inibição da expressão gênica (Egger et al., 2004; Howell et al., 2009). Isso pode ser devido à presença das regiões de domínios de ligação para a metilação (*Binding domains for methylation* – MBD), que podem bloquear as proteínas sensíveis à metilação (Rodenhiser; Mann, 2006). O MBD é o local de ligação das proteínas ligadoras de DNA metilado, que recruta as proteínas modificadoras de histonas para os genes metilados e inativa a configuração da cromatina ao redor do gene, desligando-o (Nan; Cross; Bird, 1998a; Nan et al., 1998b).

Frattini et al. (2017) estudaram os padrões de metilação de cabras da raça Saanen através do sequenciamento de domínio de ligação de metil-CpG (MBD-

seq) realizado em dois órgãos associados à reprodução (hipotálamo e ovário), o que gerou os mapas de metilação de DNA desses respectivos tecidos biológicos. A análise dos padrões de metilação do DNA indicou que a maioria dos picos de metilação foram encontrados em regiões de éxons e promotoras para ambos os órgãos. Apesar da alta densidade de metilação em éxons ter sido observada em cavalo, rato e humano (Lee et al., 2014; Laurent et al., 2010; Sati et al., 2012), os autores não esperavam esse resultado, pois está bem documentado que a maioria dos promotores tem um baixo nível de metilação e posteriormente facilitam a expressão gênica (Klose; Bird, 2006) e atribuem o resultado possivelmente ao tipo de tecido biológico estudado.

Baseado nesses achados, Liu et al. (2017) analisaram a variação de metilação dos genes candidatos, EEF1D e RPL8 (*60S ribosomal protein L8*), que foram identificados como fortemente associados às características de produção de leite em bovinos, além dos efeitos na expressão de proteínas e RNAm. Os perfis de metilação do DNA e os níveis de expressão gênica desses dois genes candidatos foram estudados em cinco tecidos diferentes (coração, fígado, glândula mamária, ovário e músculo) de vacas da raça *Chinese Holstein*. Nenhuma diferença no padrão de metilação do DNA dos cinco tecidos foi encontrada no gene RPL8. Em contrapartida, para o gene EEF1D, os níveis de metilação do DNA de sua primeira ilha CpG diferiram nos cinco tecidos e foram correlacionados negativamente com os níveis de expressão gênica.

A primeira investigação sobre a regulação da expressão de genes por metilação de DNA associada à regulação de microRNA (RNAmi) no nível pós-transcrição em todo o genoma foi realizada por Huang et al. (2014), que utilizaram recentes tecnologias de sequenciamento, tais como: *RNA sequencing* (RNA-Seq) e *Methylated DNA Immunoprecipitation Sequencing* (MeDIP) (MeDIP-Seq). Este estudo analisou amostras de tecido muscular de bovinos taurinos da raça chinesa Qinchuan na fase fetal e adulta. O perfil de metilação do DNA nas regiões do promotor e do gene propriamente dito foi comparado com os níveis de expressão gênica em seis níveis (mais baixo, baixo, menor, médio, alto, mais alto) observando correlação negativa, ou seja, tanto nas amostras do bovino fetal como nas do adulto, os promotores de genes altamente expressos tendem a exibir níveis baixos de metilação, enquanto que os promotores de genes com baixa expressão geralmente eram altamente metilados. Com base

nesses resultados, os autores concluíram que a atividade do RNAmi em genes alvo pode favorecer a metilação do gene, ou então, certos genes são tão importantes para reprimir desenvolvimento muscular que ambos os sistemas de metilação e RNAmi estão em vigor para manter a expressão totalmente desativada.

Uma vez que a metilação do DNA é uma das principais modificações epigenéticas no genoma eucariótico e desempenha papel na regulação específica do tipo celular da expressão gênica, metodologias de análises dessas modificações foram desenvolvidas para medir a metilação do DNA sobre os genomas de interesse. Nesse contexto, a detecção de 5-mC por conversão de bissulfato de sódio foi demonstrada pela primeira vez por Frommer et al. (1992) e Clark et al. (1994) e seu uso prático descrito pela primeira vez por Cokus et al. (2008) e depois por Lister et al. (2008).

Atualmente, as tecnologias de última geração estão disponíveis para estudar o genoma inteiro de qualquer indivíduo, o que permite a determinação de padrões de metilação do DNA. Para a realização das análises e interpretação de um conjunto de dados de metilação do DNA são normalmente seguidas as etapas: 1) Mapeamento das regiões metiladas do DNA do genoma, seja pelo sequenciamento de DNA através de método específico para detectar metilações ou através de *microarrays* específicos para essa finalidade, 2) Processamento e controle de qualidade dos dados genômicos (de sequência ou de genótipos) através da utilização de algoritmos e softwares específicos, 3) Visualização de dados e análise estatística para identificação de possíveis regiões metiladas diferencialmente (DMR) e 4) Interpretação biológica das DMR através de ferramentas computacionais (Bock, 2012).

Vários métodos experimentais foram desenvolvidos para a determinação de sítios de metilação do DNA ao longo de todo o genoma simultaneamente, sendo os mais utilizados: o sequenciamento de bissulfato de sódio, *microarrays* de bissulfato e métodos baseados em análises de enriquecimento. Essas três abordagens representam desafios computacionais distintos durante o processamento e controle de qualidade de dados (Beck, 2010; Laird, 2010; Robinson et al., 2010).

Para a realização do sequenciamento com bissulfato de sódio ( $\text{NaHSO}_3$ ), o DNA extraído de amostras biológicas é tratado com este composto químico

com a finalidade de converter as citosinas não metiladas em uracilas (Wojdacz; Hansen, 2006). Após o tratamento, a maioria das citosinas não metiladas aparecem como timinas nas sequências, enquanto as citosinas metiladas não sofrem essa conversão. Nesse contexto, os níveis de metilação do DNA a partir de dados de conversão com bissulfito são calculados quando as sequências são alinhadas às posições no genoma de referência. Em seguida o sequenciamento de última geração é realizado (Bock, 2012).

Tratamentos especiais de DNA (como bissulfito de sódio) acoplados a tecnologias de sequenciamento de última geração (NGS) fornecem a possibilidade de determinar com precisão os locais de metilação ao longo da molécula de DNA em uma ampla base genômica (Chung et al., 2010; Dinh et al., 2012; Su et al., 2012; Olova et al., 2018; Masser et al., 2015; Zhang; Jeltsch, 2010). Nesse sentido, o uso da abordagem de sequenciamento de bissulfito de representação reduzida (RRBS) permite a geração de perfis de sítios de metilação de maneira otimizada, uma vez que o sequenciamento abrange apenas regiões ricas em CpG do genoma. Este método é muito eficiente e tem um custo relativamente baixo, uma vez que combina a clivagem da enzima de restrição MspI, o tratamento do DNA com bissulfito de sódio e a NGS (Meissner et al., 2005; Soto et al., 2016). Embora o RRBS tenha demonstrado ser eficaz para gerar perfis de metilação do DNA em humanos, ratos e camundongos (Wang et al., 2013; Zhang et al., 2017; Matsushita et al., 2018) recentes estudos com equinos, bovinos, caprinos e suínos relataram o uso desse método para investigar padrões de metilação do DNA em diferentes situações (Semik et al., 2018; Zhou et al., 2016; Perrier et al., 2018; Zhang et al., 2017; Yuan et al., 2017; Luo et al., 2017).

Estudos utilizando a metodologia de sequenciamento genômico com bissulfito de sódio demonstraram a eficiência desta técnica, que pode ser utilizada para a identificação de genes candidatos em estudos clínicos, mas é especialmente usada na identificação e validação de regiões metiladas diferencialmente (Chen et al., 2017; Wreczycka et al., 2017). Portanto, a utilização dessa técnica na identificação das 5mC influencia diretamente na atividade do gene e nos níveis de transcrição (Li et al., 2013).

Chen et al. (2017) demonstraram que a utilização da técnica de sequenciamento com bissulfito permitiu a obtenção de dados de alta cobertura

de 5-metilcitosina e 5-hidroximetil citosina, apontando para a capacidade dessa metodologia em detectar todos os níveis de modificações da citosina em cobertura superior a 100 vezes o tamanho do genoma, em grandes conjuntos de amostras e a baixo custo.

Couldrey et al. (2014) descreveram a utilização do método de sequenciamento de bissulfito representação reduzida (RRBS) na identificação da metilação do DNA em amostras biológicas do músculo *Longissimus dorsi* de ovelhas da raça Poll Dorset. A alta concordância entre os níveis de metilação do DNA medidos pela análise RRBS indicou que essa técnica é capaz de fornecer uma avaliação precisa da metilação do DNA no nível de nucleotídeo único, tendo sido suficiente para permitir análises de alta resolução na comparação de diferentes fenótipos. A combinação de dados RRBS com dados mRNAseq permitiu que o metiloma do músculo *Longissimus dorsi* de ovelha fosse comparado com metilomas de outras espécies.

As semelhanças entre ovelhas e espécies mais comumente usadas para estudos epigenéticos, tais como humanos e ratos, podem permitir avanços no entendimento dos mecanismos envolvidos, visto que o conhecimento adquirido nessas espécies pode ser transferido para animais ruminantes. O trabalho também destacou a complexidade da regulação epigenética dos genes, mencionando parecer improvável que a regulação da expressão gênica seja inteiramente controlada por um processo epigenético particular. Em vez disso, é provável que a combinação de processos epigenéticos, juntamente com sítios presentes nas sequências genômicas subjacentes, ajam de forma sinérgica para assegurar a regulação do crescimento e desenvolvimento em mamíferos através da regulação da expressão gênica (Couldrey et al., 2014).

A capacidade de medir com precisão a metilação do DNA em animais ruminantes contribuirá com informações adicionais para as análises genéticas atualmente utilizadas nos programas de melhoramento, a fim de maximizar os ganhos de produção dessas espécies.

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do ambiente nos perfis de metilação do DNA de células nucleadas (leucócitos) do sangue de novilhos das raças Angus (*Bos taurus*) ou Nelore (*Bos indicus*), visando identificar genes regulados epigeneticamente que possam ajudar a esclarecer o mecanismo de controle da temperatura corporal em bovinos, bem como o processo de



termotolerância em bovinos, e permitir intervenções nos processos de manejo e seleção.

### **3. HIPÓTESE**

A raça e/ou estação (variação ambiental) podem exercer influência sobre os padrões de metilação do DNA em bovinos das raças Angus e Nelore submetidos ao estresse térmico e posterior retorno a condições térmicas não estressantes.

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar padrões de variação epigenética do tipo metilação do DNA que ocorrem nas células sanguíneas nucleadas (leucócitos) de bovinos das sub-espécies *Bos indicus* e *Bos taurus* quando submetidos ao estresse térmico.

#### **3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

Investigar o efeito do ambiente na raça (*B. taurus* ou *B. indicus* e clima quente e ameno) sobre os padrões epigenômicos de células nucleadas (leucócitos) do sangue de bovinos mantidos em dois períodos (desafio ao estresse térmico e subsequente retorno a condições não estressantes), visando identificar genes regulados epigeneticamente que possam auxiliar no esclarecimento do mecanismo de controle da temperatura corporal nessa espécie.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Cinco bovinos da raça Nelore (zebuínos, considerados tolerantes ao calor) e cinco da raça Angus (taurinos, susceptíveis ao calor) foram inicialmente selecionados para o experimento. Os animais (machos inteiros) eram filhos de um mesmo pai para cada raça, visando minimizar a variação genética entre os indivíduos, e apresentavam cerca de 15 meses de idade no momento da exposição ao estresse pelo calor. Os bovinos da raça Angus foram adquiridos com 7 meses de idade no município de Uruguaiana (RS) e chegaram ao setor experimental de zootecnia da UNESP Araçatuba em junho de 2015. Todos os animais da raça Nelore foram adquiridos com 7 meses de idade na cidade de Dourados (MS), e mantidos na fazenda Água Branca em Birigui - SP até os 10 meses de idade, quando foram transferidos para a UNESP em setembro de 2015. Os animais foram mantidos no setor experimental de zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Araçatuba durante todo o período experimental. Todos os animais foram identificados com brincos e marcação à fogo na parte inferior dos membros pélvicos, de modo a proporcionar identificação inequívoca.

Medidas quimioproláticas foram aplicadas para a prevenção de Anaplasmosose e Babesiose, doenças cujo vetor *Rhipicephalus microplus* apresenta ampla disseminação na região. Portanto, assim que os animais da raça Angus chegaram do Rio Grande do Sul, foram tratados com solução 7% de aceturato diminazeno (1ml/60kg) e oxitetraciclina 20% (1ml/30kg), além de serem vacinados para a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Diarréia Viral Bovina (BVDV), Leptospirose e Clostridiose. Em segundo momento, foi adotado o tratamento quimioprolático com repetições a cada 45 dias, que consistia em solução 7% de aceturato diminazeno (1ml/60kg), oxitetraciclina 20% (1ml/30kg), doramectina (1ml/50kg) e fluazuron 2,5% *pour on* (1ml/10kg). Em novembro de 2015, todos os animais foram vacinados contra a Febre Aftosa, segundo o calendário nacional de vacinação do Brasil.

#### **4.1.2 Dados fisiológicos dos animais**

Durante todo o período experimental, concomitantemente à coleta das amostras de sangue, foi realizado o acompanhamento do peso vivo dos animais. Além desse parâmetro, foi efetuado o acompanhamento diário da ruminação e movimentação por radiotelemetria em tempo real com o uso de colares com sensores (SCR®). Com esses sensores, o comportamento dos animais e as alterações da temperatura ruminal puderam ser monitorados durante todo o período de desafio ao estresse térmico pelo calor, permitindo que pequenos ajustes de manejo para a manutenção do mínimo bem estar dos animais e intervenções sempre que necessário. Os dados fisiológicos não são apresentados nessa tese e não foram analisados estatisticamente, uma vez que compunham outros trabalhos.

#### **4.2 Etapas Experimentais**

##### **4.2.1 Período de Adaptação (PRE)**

Desde a chegada ao recinto experimental em junho e setembro de 2015 até 02 de outubro de 2015, os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha*, com sombra disponível e acesso à água. Gradualmente foram adaptados para semi-confinamento e dieta à base de polpa cítrica, milho moído, farelo de soja e ureia, além de suplementação mineral, na proporção de 2,5% do peso vivo. Por fim, foram confinados em quatro lotes com acesso a sombra e receberam dieta baseada no bagaço de cana como forragem (Êxito Rural®) com relação de forragem: concentrado 55:45, administrado duas vezes ao dia, e água *ad libitum*. No dia 3 de outubro de 2015, os animais foram confinados em dois currais de 200 metros quadrados cada, com proteção (tela de sombreamento) contra os raios solares. Os animais permaneceram nessas condições até o dia 3 de dezembro de 2015 (60 dias).

Todos os animais Angus (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*), com idade de 12 meses (vinte e cinco de cada raça) foram naturalmente expostos à mudanças climáticas sazonais (do verão ao inverno) entre Dezembro de 2015 e Julho de 2016. Amostras de sangue foram coletadas para análise epigenômica, com o objetivo de identificar padrões associados à diferenças entre raças e/ou variação ambiental.

#### **4.2.2 Período de Desafio (EXP)**

A fase de desafio teve início em 4 de dezembro de 2015 com a retirada da tela de sombreamento dos piquetes com animais Nelore e de outro com animais Angus. Dessa forma, esses grupos foram mantidos sem sombra (grupos Nelore-sol e Angus-sol) até 3 de fevereiro de 2016 (56 dias). Devido às condições críticas de alguns animais, monitoradas pelo sistema de sensores existentes no colar, permitiu-se o acesso ao pastejo noturno para todos os lotes durante o período compreendido entre 25 de dezembro de 2015 a 10 de janeiro de 2016.

#### **4.2.3 Período de Recuperação (POST)**

No dia 4 de fevereiro de 2016 as coberturas foram recolocadas em todos os piquetes e os animais mantidos com acesso à sombra até o momento do abate em Julho de 2016.

#### **4.3 Dados Ambientais**

Os dados ambientais foram recuperados para o período compreendido entre 01 de Junho de 2015 e 31 de Outubro de 2016 à partir da estação meteorológica da CETESB localizada no Campus de Faculdade de Medicina

Veterinária (FMVA) da UNESP - Araçatuba. As variáveis experimentais coletadas foram temperatura ambiente (T em graus centígrados), umidade relativa do ar (H em porcentagem), radiação solar (R em W/m<sup>2</sup>) e velocidade do vento (W em m/s). As falhas nos dados foram presumidas utilizando a mediana entre os dados de -10/+ 10 dias do momento da falha.

#### **4.4 Análises epigenômicas**

Amostras de sangue de dez animais (cinco Angus e cinco Nelore) tiveram o DNA das células nucleadas do sangue extraído para posterior análise epigenômica. Todos os animais foram mantidos e manejados em grupos no setor experimental de zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araçatuba - Brasil. Para identificar as diferenças epigenéticas entre as raças (Angus e Nelore) e as estações (verão - desafio ao estresse térmico ao calor e outono - recuperação do estresse térmico pelo calor), os animais foram mantidos nos piquetes de confinamento, recebendo suplementação concentrada apenas com o objetivo de manter o escore corporal, simulando um ambiente de pecuária comercial. Amostras de sangue da veia jugular coletadas dos mesmos indivíduos nos períodos de fevereiro de 2016 (verão) e de junho 2016 (final do outono) foram separados do conjunto de dados e submetidos à extração de DNA. As amostras congeladas de sangue coletadas em fevereiro e junho de 2016 dos animais Angus (identificação única 08, 10, 19, 21 e 25) e Nelore (identificação única 03, 07, 13, 18 e 27) foram selecionadas do repositório de amostras e utilizadas para a extração do DNA.

Para identificar os locais do genoma onde ocorrem sítios de metilação, o DNA genômico foi tratado com bissulfito de sódio antes do sequenciamento genômico com o intuito de converter todas as citosinas não-metiladas (C) em uracilas (U), deixando as citosinas 5' metiladas inalteradas. Com o método RRBS foi possível a geração de dados robustos, de cobertura ampla do genoma e em sítios sabidamente metilados.

#### 4.4.1 Extração do DNA Genômico

As amostras de sangue foram coletadas em tubos revestidos com citrato de sódio e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento realizado no Laboratório de Bioquímica de Biologia Molecular da Universidade Estadual Paulista - UNESP. O DNA foi extraído de 200  $\mu\text{l}$  de sangue total usando o Kit QIAmap DNA Mini (QIAGEN<sup>®</sup>) e analisado quanto à pureza e quantidade usando o NanoDrop (ThermoFisher Scientific<sup>®</sup>). Eletroforese em gel de agarose foi utilizada para verificar eventual degradação do DNA. O rendimento da purificação de DNA variou de 3,5 a 6  $\mu\text{g}$ .

#### 4.4.2 Bibliotecas de Sequenciamento de Bissulfito de Representação Reduzida (RRBS)

Com o intuito de focalizar todos os potenciais locais de metilação relevantes ao longo do genoma, a complexidade do mesmo foi reduzida antes do tratamento com bissulfito e do sequenciamento através da clivagem do DNA com a enzima de restrição MspI previamente à amplificação. Esse procedimento visou conferir maior representação às regiões ricas em CG durante o sequenciamento do DNA. Com este propósito, 1  $\mu\text{g}$  de DNA genômico de cada amostra ( $n = 20$ ) foi digerido com MspI (NEB<sup>®</sup>) por incubação durante a noite a  $37^{\circ}\text{C}$ , seguindo as instruções do fabricante. As bibliotecas foram geradas usando o sistema de preparação de biblioteca de DNA livre de PCR TruSeq<sup>®</sup> (Illumina<sup>®</sup>) incluindo passo de tratamento com bissulfito. Após a ligação do adaptador, as amostras foram convertidas com o sistema EpiTect Bisulfite (QIAGEN<sup>®</sup>) e finalmente amplificadas por PCR com KAPA HiFi Uracil + (Kapa Biosystems<sup>®</sup>) para obter bibliotecas de RRBS. As vinte bibliotecas produzidas foram usadas para geração de clusters e subsequente sequenciamento em duas faixas no equipamento Illumina HiSeq2000, gerando sequências de 100 pares de bases cada.

Para a visualização dos dados foi utilizado o software FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Em seguida para o controle de qualidade das sequências de DNA visualizadas no fastqc foi

realizado com o software Trimmomatic, retirando das sequências os adaptadores, as bases desconhecidas ou de baixa qualidade nas extremidades da sequência. O software Bismark (versão 0.17.0) foi utilizado para alinhar cada sequência tratada com bissulfito ao genoma de referência bovino (UMD 3.1.1) com a opção -N1 (permitido um único erro de emparelhamento).

O genoma de referência foi inicialmente transformado em versão convertida em bissulfito (C-para-T) na cadeia original superior e (G-para-A) na cadeia inferior, e finalmente indexada usando o software Bowtie2. Após o tratamento com bissulfito, as sequências de DNA foram alinhadas à versão convertida do genoma. As sequências que produziram melhores alinhamentos exclusivos à partir dos dois processos de alinhamento (cadeia original superior e inferior) foram comparadas à sequência genômica normal para confirmar a presença de um C na sequência de referência. O estado de metilação de todas as posições de citosinas nas sequências foi inferido utilizando a função do Bismark “methylation\_extractor”. As sequências alinhadas às mesmas regiões do genoma foram consideradas sequências duplicadas.

As sequências de cada amostra foram alinhadas ao genoma bovino de referência (UMD 3.1.1). Cada C no genoma de referência corresponde a uma C na amostra, se a citosina da amostra for metilada, ou uma T se a citosina da amostra não for metilada.

Na prática, para facilitar a identificação das citosinas metiladas, as sequências tratadas com bissulfito foram alinhadas ao genoma de referência após a conversão total de bissulfito. Neste caso, toda a porção do genoma de referência que contém citosina foi transformada em timina e criando incompatibilidade clara com as citosinas metiladas nas sequências das amostras, que permanecem citosinas mesmo após a conversão de bissulfito. Em cada sítio (nucleotídeo), a taxa de metilação pode variar de 0% a 100%, pois a conversão de bissulfito pode ser incompleta e os tecidos frequentemente compreendem diferentes populações de células que podem transportar diferentes sinais de metilação.

As bibliotecas RRBS foram geradas e sequenciadas através do processo de sequenciamento de última geração (NGS), seguindo protocolo do fabricante de reagentes para esse tipo de sequenciamento (Illumina®).

#### 4.4.3 Identificação e caracterização de Regiões Metiladas Diferencialmente (DMR)

A identificação das Regiões Metiladas Diferencialmente (DMR) foi realizada utilizando a abordagem de janelas deslizantes da biblioteca methylKit do ambiente estatístico R no repositório Bioconductor (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/methylKit.html>). A janela foi definida para 1.000 pb e o tamanho do passo 500 pb. O teste exato de Fisher foi implementado para calcular os valores de P, que foram ajustados subsequentemente aos valores de Q usando o método SLIM (Wang et al., 2011). Uma determinada região foi definida como DMR quando o valor de p corrigido foi menor que 0,05 e a cobertura de sequências maior do que 10 vezes o tamanho do genoma em todas as amostras.

As representações gráficas das DMRs foram geradas utilizando o pacote RCircos do R (Krzyszowski et al., 2009; R Core Team, 2018).

#### 4.4.4 Análise das Interações Gênicas (redes gênicas)

A identificação das redes gênicas foi realizada utilizando o software STRING (<http://version10.stringdb.org/cgi/download.pl>). Os genes presentes dentro e próximos das coordenadas genômicas referentes às DMRs identificadas com o emprego da metodologia RRBS foram utilizados na análise pelo software STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*). Esse software permite a organização dos dados e disponibilização das predições da interação proteína-proteína, incluindo associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais) (Szklarczyk et al., 2015).

Os genes metilados diferencialmente com *ensemble id* presentes nas DMRs comuns entre os bovinos das raças Angus e Nelore foram selecionados, assim como o gene mais próximo nos casos em que o gene não era evidente, pressupondo que a diferença de padrão de metilação observada poderia estar em região controladora. Para isso foi utilizado o software *BedTools* com opção *closest*. Nenhum parâmetro foi especificado para o gene mais próximo,



simplesmente selecionou-se aquele mais próximo da região metilada diferencialmente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Dados Ambientais

As temperaturas ambientais observadas para cada período (PRE= adaptação, EXP= exposição ao calor e POST= recuperação do calor) variaram de 26,75°C, 26,53°C e 20,73°C, UR de 77,22%, 83,69% e 79,94%, ITU de 76,28, 77 e 67.37 e ITUc de 77,95, 79,2 e 69,6 (Tabela 1).

**Tabela 1.** Médias dos parâmetros ambientais durante o experimento.

MÉDIAS	PRE	EXP	POST
TA	26,75	26,53	20,73
UR	77.22	83.69	79.94
ITU	76,28	77	67.37
ITUC	77,95	79,2	69,6

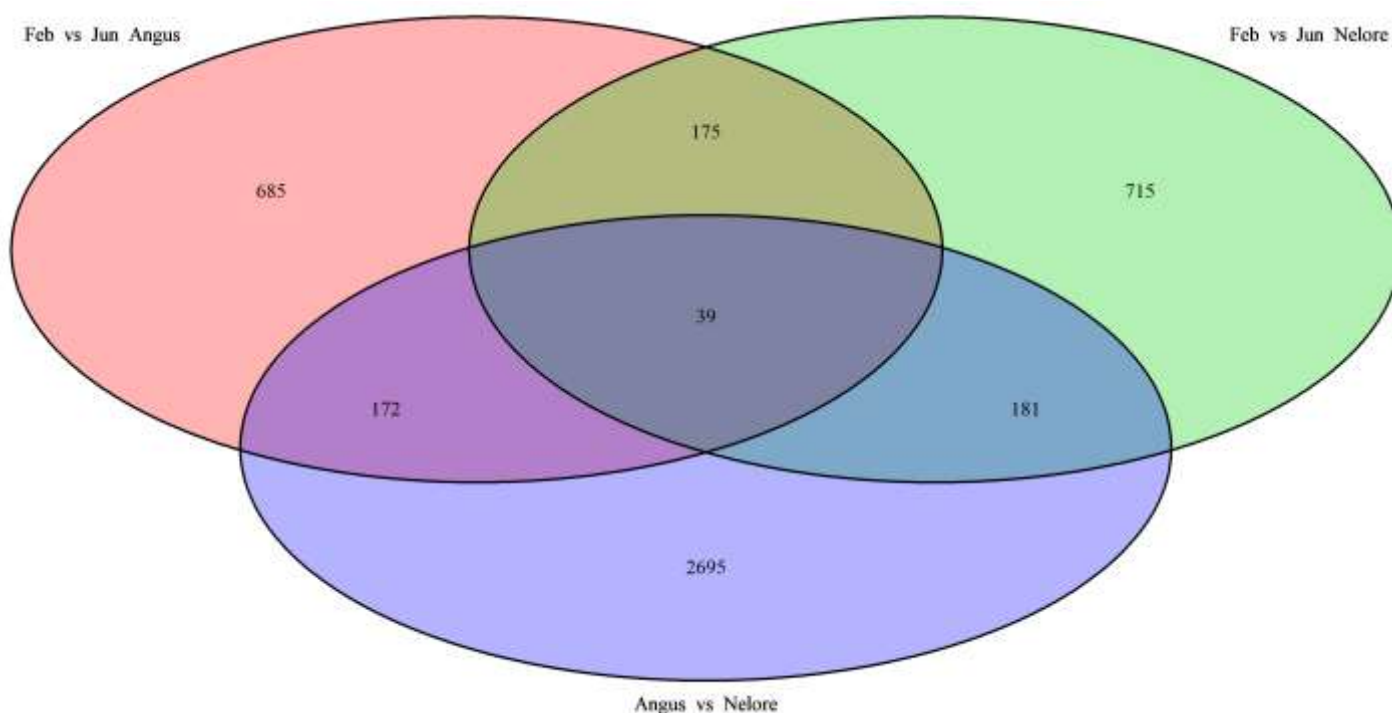
TA: Temperatura ambiente (°C), UR: Umidade relativa do ar (%), ITU: Índice de temperatura e umidade, ITUc: Índice de temperatura e umidade corrigida (Incluído também a velocidade do vento e a radiação solar na fórmula).

Verificou-se que a temperatura ambiente, umidade relativa do ar e os índices ambientais estudados, no período de exposição ao calor analisado ultrapassaram a zona termoneutra dos animais, que foram submetidos a níveis de moderados a graves de estresse térmico pelo calor, permitindo que as análises epigenômicas subsequentes pudessem ser conduzidas.

## 5.2 Análise epigenéticas

A análise das DMRs identificou um total de 4.662 janelas metiladas diferencialmente. A maioria destas (2.695) está relacionada apenas à diferenças entre as raças e não associadas à resposta ao calor uma vez que manifestam-se diferencialmente entre as raças porém de forma independente das variações ambientais, portanto não tendo sido consideradas nas análises e interpretações conduzidas no presente trabalho, uma vez que o objetivo foi verificar os efeitos do calor sobre os perfis epigenômicos considerando raça e estação conjuntamente. Por outro lado, 1.967 janelas foram metiladas diferencialmente durante o estresse por calor (fevereiro) e período de recuperação (junho) em Angus (857), Nelore (896) ou ambos (214) (Figura 1). Estas DMRs significativas foram posteriormente analisadas para identificar os genes anotados eventualmente sobrepostos a elas, assim como sua ontologia e função. Os sinais epigenéticos relacionados à resposta ao estresse térmico e à recuperação foram, em sua maioria, específicos da raça.

Além disso, entre as 214 janelas comuns, uma proporção relevante mostrou comportamento oposto nos dois grupos de genes metilados diferencialmente nas raças Angus e Nelore, revelando maior metilação no período de estresse térmico e menor no período de recuperação em uma raça (Angus) e o oposto na outra (Nelore).



**Figura 1.** Diagrama de Venn de janelas metiladas diferencialmente em diferentes raças (Angus e Nelore) e estações (fevereiro e junho).

No geral, 857 janelas identificadas em Angus se sobrepunham a 352 genes anotados e 896 janelas em Nelore coincidiram com 367 genes únicos. Das 214 janelas identificadas como metiladas diferencialmente, identificou-se 103 genes metilados diferencialmente comuns entre Angus e Nelore. Este conjunto de genes compreendem aqueles candidatos a desempenhar papéis de particular importância na resposta ao estresse térmico e recuperação em bovinos.

O uso da abordagem RRBS para identificar locais de metilação CpG em todo o genoma de células nucleadas de sangue bovino foi implementado com sucesso, devido ao alto nível de densidade de metilação (Figuras 2 e 3). Foi possível detectar pequenas diferenças nos padrões de metilação do DNA, o que esteve de acordo com relatos anteriores (Bock et al., 2010).

Resultados semelhantes de metilação do DNA foram observados no sangue e nas células-tronco da pele de ratos, mostrando em média 1,64 milhão de CpGs individuais em todo o genoma (Bock et al., 2012). No presente estudo, identificamos entre 3 e 8 milhões de CpGs individuais para cada animal, independentemente da raça ou condição do ambiente. Embora o método RRBS tenha sido previamente provado como eficaz para revelar padrões de metilação do DNA em ratos, camundongos e humanos, poucos estudos usaram esse método poderoso para investigar a metilação do DNA em animais domésticos.

Recentemente, Frattini et al. (2017) e Capra et al. (2017) destacaram a ocorrência de DMRs em dois órgãos (hipotálamo e ovário) em ovinos. Frattini et al. (2017) identificaram 4808 DMRs, dentre os quais, 1547 foram significativamente mais metiladas no hipotálamo e 3261 no ovário. 2651 DMRs foram localizadas dentro do corpo do gene, reunidas em 1264 genes diferencialmente metilados (DMGs) em ovários e 456 no hipotálamo. Além disso, 74 genes altamente metilados estavam em comum entre o hipotálamo e ovário, para um total de 1646 DMGs identificados. Capra et al., (2017) anotaram 4.554 DMRs que se sobrepunham a corpos de genes, correspondendo a 2.695 genes metilados diferencialmente (DMGs). Sendo que 535, 321 e 295 DMRs estavam localizadas perto de 5' UTR, 3' UTRs e CGIs, estavam próximos (~ 2 Kb) para 407, 284 e 90 DMGs respectivamente.

Os nucleotídeos CpG podem ser distribuídos através do genoma de forma agrupada, também chamada de ilhas CpG, ou espalhados ao longo dos cromossomos. Em geral essas regiões ou ilhas não são metiladas em genomas de vertebrados, estando associadas à mecanismos de repressão transcricional. Em oposição, os dinucleotídeos CpG individuais são geralmente metilados (Morgan et al., 2004; Grønbaek et al., 2007; Jones; Baylin, 2007; Deaton; Bird, 2011).

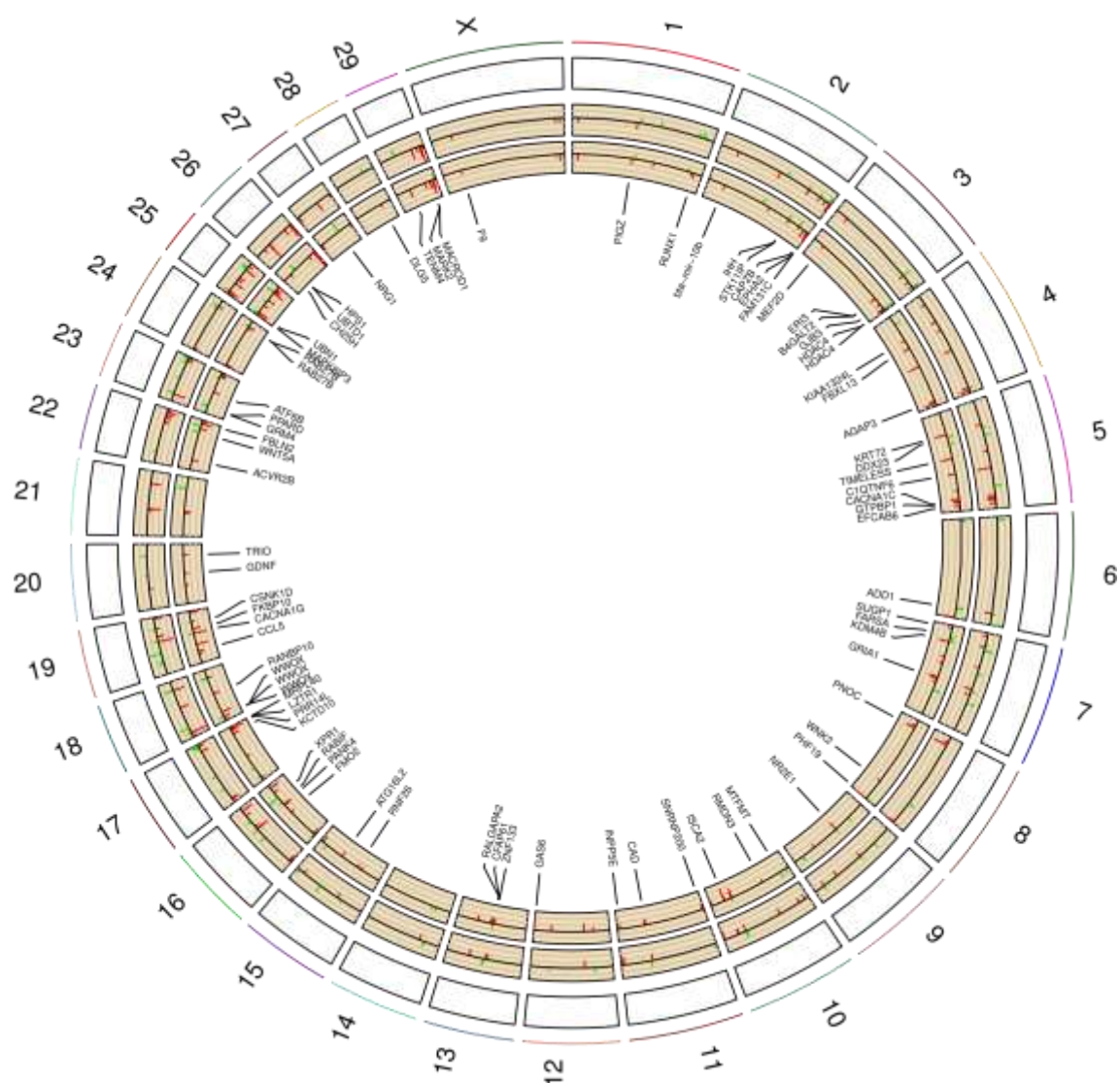
No entanto, descobertas recentes sugerem que níveis relativamente altos de metilação do DNA ocorrem em ilhas CpG, o que foi compatível com nossos achados os quais apontaram a maioria das citosinas metiladas localizadas nas ilhas CpG, apresentando maior densidade de metilação quando comparadas com estudos anteriores em humanos (Straussman et al., 2009; Panchin; Makeev;

Medvedeva, 2016). Além disso, Frattini et al. (2017) encontraram maior densidade de metilação no hipotálamo de cabra e nos tecidos do ovário, sugerindo que 50% da incidência de metilação estava nas ilhas CpG (Frattini et al., 2017). Anteriormente, Yang et al. (2016) observaram que a maioria das ilhas CpG em caprinos eram hipermetiladas quando comparadas com outras espécies. No entanto, publicações recentes envolvendo a análise de epigenoma em equinos, bovinos e galinhas mostraram entre 10 e 20% de ilhas CpG metilado nesses genomas (Su et al., 2014; Hu et al., 2013; Lee et al., 2014).

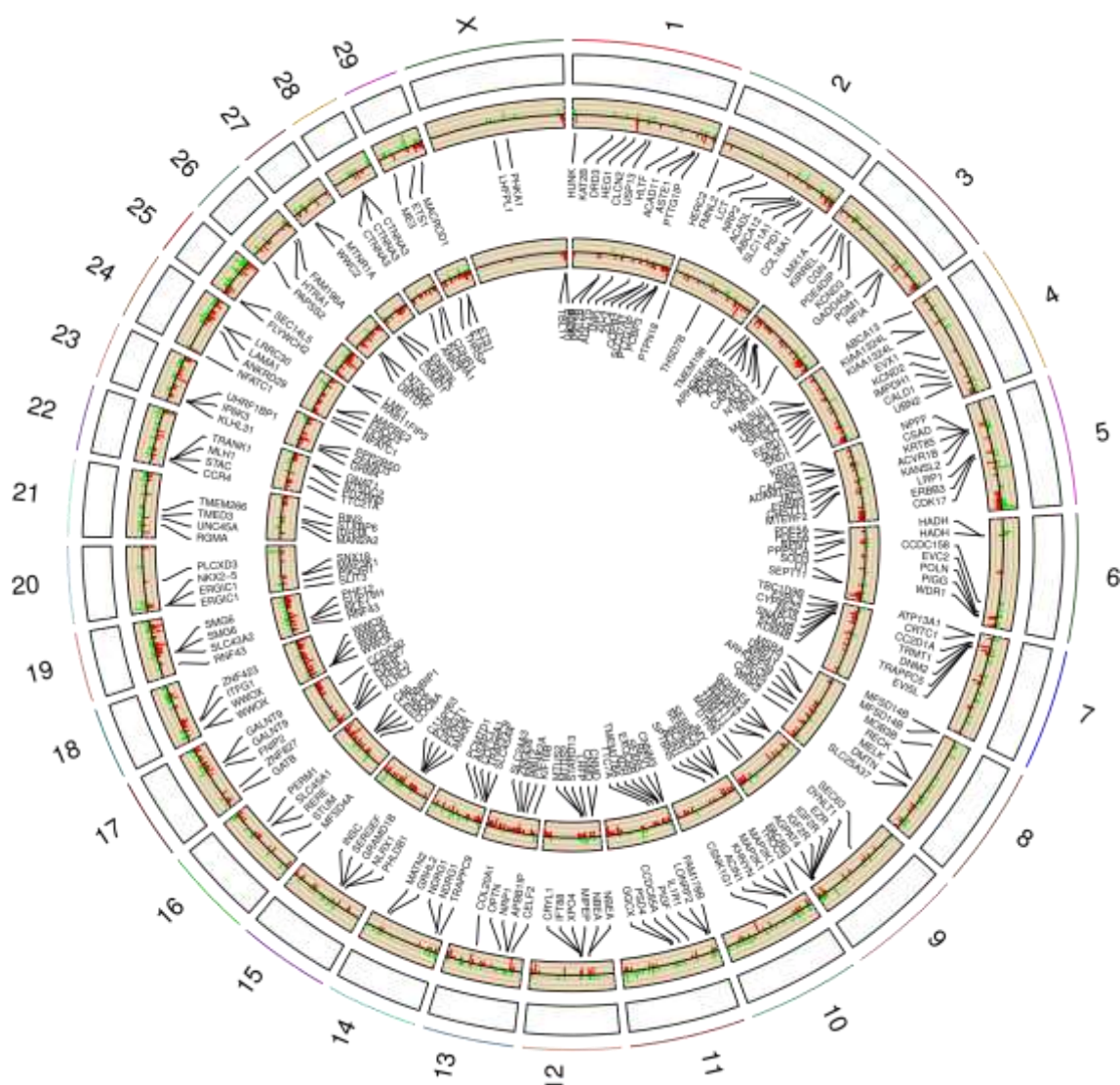
Embora não haja trabalho semelhante feito em bovinos até o momento, podemos ver alguma semelhança nas observações de Lee et al. (2014), que compararam regiões de DNA metiladas diferentemente em cavalos, encontrando 35.467 DMRs em quatro tecidos (músculo esquelético, coração, pulmão e cérebro) e identificando diferenças no perfil de metilação associadas a raças.

Estudo em equinos identificou 136 regiões metiladas diferencialmente de DNA na pele sarcóide e normal, com a maioria das DMRs localizadas em regiões intragênicas, postulando o papel das alterações epigenômicas na diferenciação tecidual para responder às mudanças ambientais (Semik et al., 2017).

A análise das Regiões Metiladas Diferencialmente (DMR) revelou diferenças entre as raças Angus e Nelore, que parecem estar relacionadas aos efeitos do estresse térmico e do processo de recuperação do período de estresse. Para melhor visualização da distribuição das DMRs ao longo dos cromossomos, gráficos em forma de círculo (Circos Plot) foram construídos (Figuras 5 e 6).



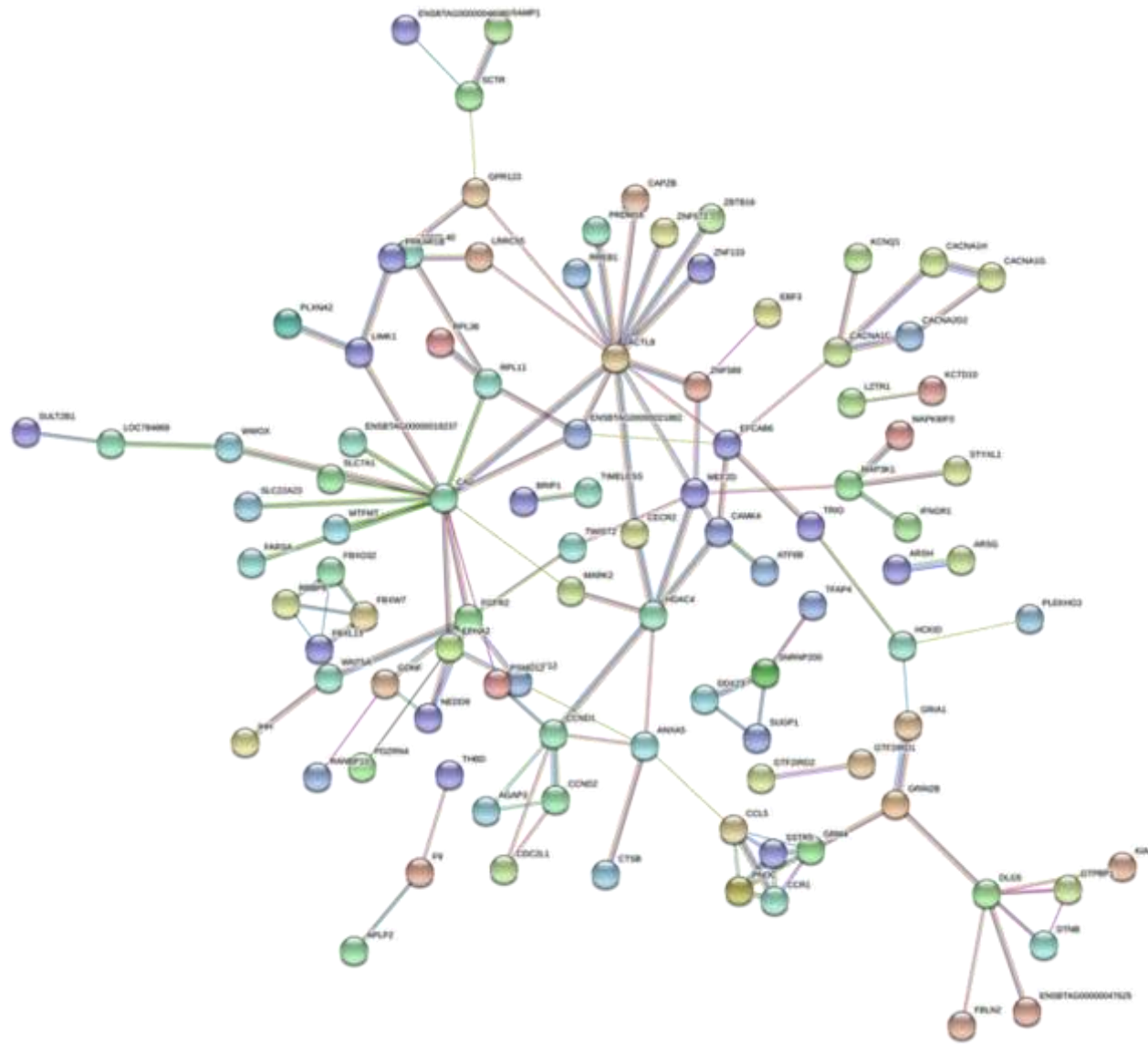
**Figura 2.** Representação circular (Circos Plot) da distribuição genômica de DMRs. O círculo externo exibe os cromossomos bovinos. O círculo concêntrico externo representa as DMRs em Angus e o interno representa as DMRs em Nelore. No total, são representadas graficamente as 214 DMRs comuns às duas raças e os 103 genes metilados diferencialmente. Barras vermelhas indicam maior metilação e barras verdes menor metilação (<https://pt.slideshare.net/LudmillaZavarez/tese-doutorado-figurasanexadas>).



**Figura 3.** Representação circular (Circos Plot) da distribuição genômica de DMRs. O círculo externo exibe os cromossomos bovinos. O círculo concêntrico externo representa as DMRs exclusivamente em Angus e o interno representa as DMRs exclusivamente em Nelore. No total, são representadas graficamente as 857 DMRs e os 352 genes metilados em Angus exclusivamente e as 896 DMRs e os 367 genes metilados em Nelore exclusivamente. Barras vermelhas indicam maior metilação e barras verdes menor metilação (<https://pt.slideshare.net/LudmillaZavarez/tese-doutorado-figurasanexadas>).

A análise de interação (rede gênica) utilizando o software STRING indicou forte ligação entre os genes conectados, além de revelar informações sobre genes candidatos a participar do mecanismo de controle da termotolerância em bovinos, que foram diferencialmente metilados entre as raças estudadas (Figura 4). Entre eles destacam-se o gene ACTL8 (*actin-like protein 8*) previamente relacionado com o estresse térmico em bovinos (Dado-Senn et al., 2018), o PNOC (*prepronociceptin*) que atua na termorregulação em bovinos (Baiula; Bedini; Spampinato, 2015) e o FGFR2 (*fibroblast growth factor receptor 2*) que é da mesma família que o gene FGFR3, o qual está fortemente relacionado à proteína de choque térmico (Hsp90). Estima-se que esses achados servirão como base para novas investigações futuras visando compreender a conexão entre esses genes e vias metabólicas relacionadas à manifestação da termotolerância em bovinos.





**Figura 4.** Representação gráfica de rede gênica onde os nós identificam os genes e em as arestas os níveis de interação entre eles (<https://pt.slideshare.net/LudmillaZavarez/tese-doutorado-figurasanexada>).

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho representa o primeiro relato de um conjunto de informações sobre padrões de metilação do DNA de células nucleadas do sangue (leucócitos) de bovinos das raças Angus e Nelore expostas a condições ambientais de estresse térmico e recuperação deste. As DMRs identificadas entre os grupos analisados sugerem a existência de especificidade racial e susceptibilidade a efeitos ambientais nas diferenças de padrões de metilação do DNA observadas. Genes e regiões genômicas candidatas a participar do controle desse mecanismo fisiológico, tais como: ACTL8, PNOC e FGFR2, devem servir como referência para estudos posteriores visando a melhor compreensão dos processos que ocasionam as mudanças nos perfis de metilação do DNA, podendo fornecer as bases para o desenvolvimento de novos diagnósticos e alternativas terapêuticas em animais, incluindo a resposta ao estresse térmico em bovinos.

## 7. REFERÊNCIAS

Adeyemo O., Heath E., Adadevoh B. K., Steinbach J., Olaloku E. A. (1979) Some physiological and behavioral responses in *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers acclimatized to the hot humid seasonal equatorial climate. **International Journal of Biometeorology**. 23: 231 - 241p.

Aguilar I., Misztal I., Tsuruta S. (2010) Short communication: genetic trends of milk yield under heat stress for US Holsteins. **J Dairy Sci**. 93(4):1754 - 8p.

Almeida, G. L. P. (2009) Climatização na pré-ordenha de vacas da raça Girolando e seus efeitos na produção e qualidade do leite e no comportamento animal. 134f. **Dissertação** de Mestrado (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Univ. Federal Rural de Pernambuco.

Antunes, Celso (1996). **Geografia e participação**: Regiões do Brasil. 2. São Paulo: Scipione.

Ayoade, J. O. (1991) Introdução à Climatologia para os Trópicos. Editora Bertrand Brasil, 3ª Edição.

Azevedo, A. M. M. R., Alves, A. A. (2009) Bioclimatologia aplicada à produção de bovinos leiteiros nos trópicos. Teresina: Embrapa Meio-Norte (Comunicado Técnico 188). 83p.

Baliscei M. A. (2012) Behavior of beef cattle and the microclimate with and without shade. **Acta Sci.** 34 (4), 409 - 415p.

Baylin S. B, Herman J. G. (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis epigenetics joins genetics. **Trends in Genetics**: TIG, Amsterdam, 16: 168 - 174p.

Bearden H. J, Fuquay J. (1980) Applied animal reproduction. **Reston**: Reston Publishing, 337p.

Beck, S. (2010) Taking the measure of the methylome. **Nature Biotech.** 28, 1026 - 1028p.

Bennett I. L., Finch V. A., Holmes C. R. (1985) Time spent in shade and its relationship with physiological factors of thermoregulation in three breeds of cattle. **Applied Animal Behaviour Science.** 13 (3): 227 - 236p.

Berman A. (2005) Estimates of heat stress relief needs for Holstein dairy cows. **J. Anim. Sci.** 83: 1377 - 1384p.

Berman A., Horovitz T. (2012) Radiant heat loss, an unexploited path for heat stress reduction in shaded cattle. **J. Dairy Sci.** 95: 3021 - 3031p.

Bernabucci U., Lacetera N., Basiricò L., Ronchi B., Morera P., Serene E., Nardone A. (2006) Hot season and BCS affect leptin secretion of periparturient dairy cows. In: **Journal of Animal Science**. Amer Soc Animal Science 1111 North Dunlap Ave, Savoy, IL 61874 USA, 348 - 349p.

Bernabucci U., Biffani S., Buggiotti L., Vitali A., Lacetera N., Nardone A. (2014) The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle. **J Dairy Sci.** 97(1):471 – 86p.

Biffani S., Bernabucci U., Vitali A., Lacetera N., Nardone A. (2016) Short communication: Effect of heat stress on nonreturn rate of Italian Holstein cows. **J Dairy Sci.** 99(7): 5837 - 5843p.

Bird Adrian. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development.** 16: 6 - 21p.

Bock C., Tomazou E. M., Brinkman A., Müller F., Simmer F., Gu H., Jäger N., Gnirke A., Stunnenberg H. G., Meissner A. (2010) Genome-wide mapping of DNA methylation: a quantitative technology comparison. **Nat Biotechnol.** October; 28(10): 1106 -1114p.

Bock C. (2012) Analysing and interpreting DNA methylation data. **Nature Reviews Genetics.** 13: 705 - 719p.

Bock Christoph, Beerman Isabel, Lien Wen-Hui, Smith Zachary D., Gu Hongcang, Boyle Patrick, Gnirke Andreas, Fuchs Elaine, Rossi Derrick J., Meissner Alexander. (2012) DNA Methylation Dynamics during In Vivo Differentiation of Blood and Skin Stem Cells. **Molecular Cell.** August, 47, 633 - 647p.

Bovine Hapmap Consortium, Gibbs R. A., Taylor J. F., Van Tassell C. P., Barendse W., Eversole K. A., Gill C. A., Green R. D., Hamernik D. L., Kappes S. M., et al. (2009) Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. **Science.** 324: 528 - 532p.

Burfeind O., Suthar V. S., Heuwieser W. (2012) Effect of heat stress on body temperature in healthy early postpartum dairy cows. **Theriogenology,** 78: 2031 - 2038p.

Caiafa P., Zampieri M. (2005) DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands. **Journal of Cellular Biochemistry,** New York, 94: 257-265p.

Capra E., Toschi P., Del Corvo M., Lazzari B., Scapolo P. A., Loi P., Williams J. L., Stella A., Marsan P. A. (2017) Genome-Wide Epigenetic Characterization of Tissues from Three Germ Layers Isolated from Sheep Fetuses. **Frontiers in Genetics**. September, 8: 115p.

Chen G. G., Gross J. A., Lutz P. E., Vaillancourt K., Maussion G., Bramouille A., Th  roux J. F., Gardini E. S., Ehlert U., Bourret G., Masurel A., Lepage P., Mechawar N., Turecki G., Ernst C. (2017) Medium throughput bisulfite sequencing for accurate detection of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. **BMC Genomics**, 18: 96p.

Chung C. A. B., Boyd V. L., McKernan K. J., Fu Y.; Monighetti, C., Peckham H. E., Barker M. (2010) Whole Methylome Analysis by Ultra-Deep Sequencing Using Two-Base Encoding. **PLOS ONE** 5(2): e9320p.

Clark S. J, Harrison J., Paul C. L., Frommer M. (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Res.** 22: 2990 - 2997p.

Cokus S. J., Feng S., Zhang X., Chen Z., Merriman B., et al. (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. **Nature**. 452: 215 - 219p.

Collier R. J., Stiening C. M., Pollard, B. C., Vanbaale, M. J., Baumgard L. H., Gentry P. C., Coussens P. M. (2006) Use of gene express microarrays for evaluating environmental stress tolerance at the cellular level in cattle. **J. Anim. Sci.** 84: E1 - E13p.

Collier R. J., Collier J. L., Rhoads, R. P., Baumgard L. H. (2008) Invited Review: Genes Involved in the Bovine Heat Stress Response. **J. Dairy Sci.** 91: 445 - 454p.

Collier R. J., Hall L. W., Rungruang S., Zimbleman R. B. (2012) Quantifying heat stress and its impact on metabolism and performance. In: Paper for the 23<sup>rd</sup> Annual Ruminant Nutrition **Symposium**, 74 - 83p.

Costa E. B. O., Pacheco C. (2013) Epigenética: regula  o da expressão gênica em nível transcricional e suas implica  es. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. Londrina, 34(2): 125 - 136p.

Couldrey C., Brauning R., Bracegirdle J., Maclean P., Henderson H. V., Mcewan J. C. (2014) Genome-Wide DNA Methylation Patterns and Transcription Analysis in Sheep Muscle. **PLOS ONE**. 9(7): e101853p.

Da Silva R. G., La Scala N. T. R., Tonhati H. (2003) Radiative properties of the skin and haircoat of cattle and other animals. **Trans. ASAE**. 46: 913 - 918p.

Da Silva R. G., Guilhermino M. M., Morais D. A. E. F. (2010) Thermal radiation absorbed by dairy cows in pasture. **Int. J. Biometeorol.** 54:5 - 11p.

Dikmen S., Cole J. B., Null D. J., Hansen P. J. (2013) Genome-wide association mapping for identification of quantitative trait loci for rectal temperature during heat stress in Holstein cattle. **PLOS ONE**. 23; 8(7): e69202p.

Dikmen S., Wang X. Z., Ortega M. S., Cole J. B., Null D. J., Hansen P. J. (2015) Single nucleotide polymorphisms associated with thermoregulation in lactating dairy cows exposed to heat stress. **J. Anim. Breed Genet.** 132(6):409 - 19p.

Dinh H.Q., Dubin M., Sedlazeck F. J., Lettner N., Mittelsten Scheid O., et al. (2012) Advanced Methylome Analysis after Bisulfite Deep Sequencing: An Example in Arabidopsis. **PLOS ONE**, 7(7): e41528p.

Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P. A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**. London, 429: 457 - 463p.

Erbe M., et al. (2012) Improving accuracy of genomic predictions within and between dairy cattle breeds with imputed high-density single nucleotide polymorphism panels. **J. Dairy Sci.** 95: 4114 - 4129p.

Fan H., Zhao Z. J., Cheng J., Su X. W., Wu Q. X., Shan Y. F. (2009) Overexpression of DNA methyltransferase 1 and its biological significance in primary hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, Beijing, 15(16): 2020 - 2026p.

Frattini S., Capra E., Lazzari B., McKay S. D., Coizet B., Talenti A., Groppetti D., Riccaboni P., Pecile A., Chessa S., Castiglioni B., Williams J., Pagnacco G., Stella A., Crepaldi P. (2017) Genome-wide analysis of DNA methylation in hypothalamus and ovary of *Capra hircus*. **BMC Genomics**. 18: 476p.

Frommer M., Mcdonald L. E., Millar D. S., Collis C. M., Watt F., Grigg G. W., Molloy P. L., Paul C. L. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proc Natl Acad Sci**, USA; 89:1827 - 1831p.

Garinis G. A., Patrinos G. P., Spanakis N. E., Menounos P. G. (2002) DNA hipermetilation: when tumour suppressor genes go silent. **Human Genetics**. 111(2): 115 - 127p.

Garner J. B., Douglas M. I., Williams S. R. O., Wales W. J., Marett L.C., Nguyen T. T. T., Reich C. M., Hayes B. J. (2016) Genomic Selection Improves Heat Tolerance in Dairy Cattle. **Scientific Reports**. 6: 34114p.

Gaughan J. B., Ebi K. L., Burton I., McGregor G.R. (2009) Response of domestic animals to climate challenges. **Biometrical Journal**, 131 - 170p.

Gebremedhin K. G., Wu B. (2002) Sensible and latent heat losses from wet-skin surface and fur layer. **Journal of Thermal Biology**. 27(4): 291 - 297p.

Georges M., Charlier C., Cockett N. (2003) The callipyge locus: evidence for the trans interaction of reciprocally imprinted genes. **Trends Genet**. 19(5): 248 - 52p.

Gibbs W. W. (2007) Além do DNA. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 16, Edição Especial, Genoma: o código da vida, 44 - 51p.

Goll M. G., Bestor T. H. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. **Annu. Rev. Biochem**. 74, 481 - 514p.

Grønbaek K., Hother C., Jones, P. A. (2007) Epigenetic changes in cancer. **APMIS**, 115(10): 1039 - 59p.

Hahn G. L. (1999) Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. **J. Anim. Sci**. 77:10 - 20p.

Hammond A. C., Olson T. A., Chase C. C. Jr., Bowers E. J., Randel R. D., Murphy C. N., Vogt D. W., Tewolde A. (1996) Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. **J. Anim. Sci**. 74: 295 - 303p.

Hammond A. C., Chase C. C. Jr., Bowers E. J., Olson T. A., Randel R. D. (1998) Heat tolerance in Tuli, Senepol, and Brahmansired F1 Angus heifers in Florida. **J. Anim. Sci.** 76: 1568 - 1577p.

Hansen P. J. (2004) Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science.** 82 - 83: 349 - 360p.

Howard J. T., Kachman, S. D., Snelling W. M., Pollak E. J., Ciobanu D. C., Kuehn L. A., Spangler M. L. (2014) Beef cattle body temperature during climatic stress: a genome-wide association study. **Int. J. Biometeorol.** 58: 1665 - 1672p.

Howell P. M. J. R., Liu S., Ren S., Behlen C., Fodstad O., Riker A. I. (2009) Epigenetics in human melanoma. **Cancer Control.** 16(6): 200 - 218p.

Hu Y., Xu H., Li Z., Zheng X., Jia X., Nie Q., et al. (2013) Comparison of the Genome-Wide DNA Methylation Profiles between Fast-Growing and Slow-Growing Broilers. **PLOS ONE.** E 8(2): e56411p.

Huang Y. Z., Sun J. J., Zhan L. Z., Li C. J., Womack J. E., Li Z. J., Lan Xian Y., Lei C. Z., Zhang C. L., Zhao X., Chen H. (2014) Genome-wide DNA Methylation Profiles and Their Relationships with mRNA and the microRNA Transcriptome in Bovine Muscle Tissue (*Bos taurine*). **Scientific Reports**, 4: 6546p.

Huson H. J., Eui-sookim, Godfrey R. W., Olson T. A., McClure M. C., Chase C. C., Rizzi R., O'brien A. M. P., Vantassell C. P., Garcia J. F., Sonstegard T. (2014) Genome-wide association study and ancestral origins of the slick-hair coat in tropically adapted cattle. **Frontiers in Genetics.** April, 5(101).

Jaenisch R., Bird A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals? **Nature Genetics**, New York, 33: 254 - 264p.

Javaid N., Choi S. (2017) Acetylation- and Methylation-Related Epigenetic Proteins in the Context of Their Targets. **Genes**, 8: 196p.

Jones, P. A., Baylin, S. B. (2007) The epigenomics of cancer. **Cell**, 128(4): 683 - 92p.



Kim, Won Seob, Lee Jae-Sung, Jeon Seung Woo, Peng Dong Qiao, Kim Young Shin, Bae Mun Hee, Jo Yong Ho, Lee Hong Gu. (2018) Correlation between blood, physiological and behavioral parameters in beef calves under heat stress. **Animal Behavior and Welfare**, Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS). 31(6): 919 - 925p.

Klose R. J., Bird A. P. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, 31: 89 - 97p.

Krzywinski Martin I, Schein Jacqueline E, Birol Inanc, Connors Joseph, Gascoyne Randy, Horsman Doug, Jones Steven J, Marra Marco A. (2009) Circos: An information aesthetic for comparative genomics. **Genome Research**. Sep;19(9):1639 - 45p.

Laird P. W. (2010) Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. **Nature Rev. Genet.** 11: 191 - 203p.

Landaeta-Hernandez A., Zambrano-Nava S., Hernandez-Fonseca J. P., Godoy R., Calles M., Iragorri J. L. (2011) Variability of hair coat and skin traits as related to adaptation in Criollo Limonero cattle. **Trop. Anim. Health Prod.** 43, 657 - 663p.

Laurent L., Wong E., Li G., Huynh T., Tsigos A., Ong C. T., et al. (2010) Dynamic changes in the human methylome during differentiation. **Genome Res.** 20: 320 - 31p.

Lee J. R., Hong C. P., Moon J. W., Jung Y. D., Kim D. S., Kim T. H., Gim J. A., Bae, J. H., Choi, Y., Eo J., et al. (2014) Genome-wide analysis of DNA methylation patterns in horse. **BMC Genomics.** 15: 598.

Li M., Wu H., Luo Z., et al. (2012) An atlas of DNA methylomes in porcine adipose and muscle tissues. **Nature communications.** 3:850p.

Li P., Demirci F., Mahalingam G., Demirci C., Nakano M., Meyers B. C. (2013) An Integrated Workflow for DNA Methylation Analysis. **Journal of Genetics and Genomics**, 40: 249e260p.

Lister R., et al. (2008) Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. **Cell**. 133, 523 - 536p.

Littlejohn M. D., Henty K. M., Tiplady K., Johnson T., Harland C., Lopdell T., et al. (2014). Functionally reciprocal mutations of the prolactin signalling pathway define hairy and slick cattle. **Nat. Commun.** 5: 5861p.

Liu X., Yang J., Zhang Q., Jiang L. (2017) Regulation of DNA methylation on EEF1D and RPL8 expression in cattle. **Genetica**, 145: 387 - 395p.

Luczak M. W., Jagodzinski P. P. (2006) The role of DNA methylation in cancer development. **Folia Histochemica Cytobiologica**, Warszawa, 44: 143 - 154p.

Luo L., Yao Z., Ye J., Tian Y., Yang C., Gao X., Song M., Liu Y., Zhang Y., Li Y., Zhang X., Fang F. (2017). Identification of differential genomic DNA Methylation in the hypothalamus of pubertal rat using reduced representation Bisulfite sequencing. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 15: 81p.

Macciotta N. P. P., Biffani S., Bernabucci U., Lacetera N., Vitali A., Ajmone-Marsan P., Nardone A. (2017) Derivation and genome-wide association study of a principal component-based measure of heat tolerance in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 100(6):4683 - 4697p.

Madalena F. E., Teodoro R. L., Lemos A. M., Monteiro J. B. N., Barbosa R. T. (1990) Evaluation of Strategies for Crossbreeding of Dairy Cattle in Brazil. **Journal of Dairy Science**, 73: 1887 - 1901p.

Mariasegaram M., Chase C. C. Jr., Chaparro J. X., Olson T. A., Brenneman R. A., Niedz R. P. (2007) The slick hair coat locus maps to chromosome 20 in Senepol-derived cattle. **Anim. Genet.** 38: 54 - 59p.

Masser D. R., Stanford D. R., Freeman W. M. (2015) Targeted DNA Methylation Analysis by Next-generation Sequencing. **J. Vis. Exp.** (96): e52488p.

Matsushita Junya, Okamura Kazuyuki, Nakabayashi Kazuhiko, Suzuki Takehiro, Horibe Yu, Kawai Tomoko, Sakurai Toshihiro, Yamashita Satoshi, Higami Yoshikazu; Gaku Ichihara, et al. (2018) The DNA methylation profile of liver

tumors in C3H mice and identification of differentially methylated regions involved in the regulation of tumorigenic genes. **BMC Cancer**. 18: 317p.

Meissner A., Gnirke A., Bell G. W., Ramsahoye B., Lander E. S., Jaenisch R. (2005) Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. **Nucleic. Acids Res**. 33: 5868 - 5877p.

Mehla K., Magotra A., Choudhary J., Singh A. K., Mohanty A. K., Upadhyay R. C., Srinivasan S., Gupta P., Choudhary N., Antony B., Khan F. (2014) Genome-wide analysis of the heat stress response in Zebu (Sahiwal) cattle. **Gene**. 10; 533(2): 500 - 7p.

Minozzi G., Nicolazzi E.L., Stella A., Biffani S., Negrini R., Lazzari B., Marsan P. A., Williams J.L. (2013) Genome Wide Analysis of Fertility and Production Traits in Italian Holstein Cattle. **PLOS ONE**. 2013; 8(11): e80219.

Miranda, T. B., Jones P. A. (2007) DNA methylation: the nuts and bolts of repression. **J. Cell. Physiol**. 213, 384 - 390p.

Morais D. A. E. F, Silva R. G., Maia A. S. C., Lima P. O., Guilhermino M. M. (2003) Níveis plasmáticos de hormônios tireoideanos de vacas leiteiras em ambiente quente e seco. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40, Santa Maria, RS. **Anais...** Viçosa, MG: SBZ, CD-ROM.

Morgan, H. D. et al. (2004) Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. **J Biol Chem**, 279(50): 52353 - 60p.

Moss T. J., Wallrath L. L. (2007) Connections between epigenetic gene silencing and human disease. **Mutation Research**, Amsterdam, 618: 163 - 174p.

Muller H. R., Prado K. B. (2008) Epigenética: um novo campo da genética. **RUBS**, 1:61 - 69p.

Murphy S. K, Jirtle R. L. (2003) Imprinting evolution and the price of silence. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, Cambridge, 25: 577- 588p.

Nan X., Cross S., Bird A. (1998a) Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. **Novartis Foundation Symposium**, 214: 6 - 16p.

Nan X., NQ H. H., Johnson C. A., Laherty C. D., Turner B. M., Eisenman R. N., Bird A. (1998b) Transcriptional repression by the methyl-CpGbinding protein MeCp2 involves a histone deacetylase complex. **Nature**, 393: 386 - 389p.

Nardone A., Ronchi B., Lacetera N., Ranieri M. S., Bernabucci U. (2010) Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. **Livestock Science**. 130(1): 57 - 69p.

Nätt, Daniel; Rubin, Carl-Johan; Wright, Dominic; Johnsson, Martin; Beltéky, Johan; Andersson, Leif; Jensen, Per (2012) Heritable genome-wide variation of gene expression and promoter methylation between wild and domesticated chickens. **BMC Genomics**, 13:59p.

O'Brien M. D., Rhoads R. P., Sanders S. R., Duff G. C., Baumgard L. H. (2010) Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. **Domest Anim Endocrinol**. 38(2): 86 - 94p.

Olova N., Krueger F., Andrews S., Oxley D., Berrens R. V., Branco M. R., Reik W. (2018) Comparison of whole-genome bisulfite sequencing library preparation strategies identifies sources of biases affecting DNA methylation data. **Genome Biology**. 19:33p.

Olson T. A., Lucena C., Chase J. R. C. C., Hammond A. C. (2003) Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in *Bos taurus* cattle. **J. Anim. Sci**. 81:80 - 90p.

Page T. L., Sikder S., Yang L., Pluta L., Wolfinger R. D., Kodade K. T., Thomas R. S. (2006) Genome-wide analysis of human HSF1 signaling reveals a transcriptional program linked to cellular adaptation and survival. **Mol. Biosyst**. 2: 627 - 639p.

Panchin A. Y., Makeev V. J., Medvedeva Y. A. Preservation of methylated CpG dinucleotides in human CpG islands. **Biol Direct**. 2016; 11:11p.

Peaston A. E. E., Whitelaw E. (2006) Epigenetics and phenotypic variation in mammals. **Mammalian Genome**, 17: 365 - 374p.

Perano K. M., Usack J. G., Angenot L. T., Gebremedhin K. G. (2015) Production and physiological responses of heat-stressed lactating dairy cattle to conductive cooling. **J. Dairy Sci.** 98(8): 5252 - 5261p.

Perrier Jean-Philippe, Sellem Eli, Prézélin Audrey, Gasselin Maxime, Jouneau Luc, Piumi François, Adhami Hala Al, Weber Michaël, Fritz Sébastien, Boichard Didier, et al. (2018) A multi-scale analysis of bull sperm methylome revealed both species peculiarities and conserved tissue-specific features. **BMC Genomics**, 19: 404p.

Pires M. F. A., Campos A. T. (2009) Relação dos dados climáticos com o desempenho animal. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/aunidade/artigos/>>. Acesso em: 02 set. 2016.

Pirkkala L., Nykansen P., Sistonen L. (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. **FASEB J.** 15: 1118 - 1131p.

Porcionato M. A. F., Fernandes A. M., Netto A. S., Santos M. V. (2009) Influência do Estresse Calórico na Produção e Qualidade do Leite. Influence of heat stress on milk yield and quality. **Rev. Acad.**, Ciênc. Agrár. Ambient. Curitiba, 7(4): 483 - 490p.

Pray L. A. (2004) Epigenetics: Genome Meet your environment. **The Scientist.** July 5:14 - 20p.

R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rahman M. B., Schellander K., Luceño N. L., Van Soom A. (2018) Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. **Theriogenology**. 113: 102 - 112p.

Reik W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**. 447, 425 - 432p.

Rhoads M. L., Rhoads R. P., Vanbaale M. J., Collier R. J., Sanders S. R., Weber W. J., Crooker B. A., Baumgard L. H. (2009) Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. **J. Dairy Sci.** 92: 1986 - 1997p.

Robinson M. D., Statham A. L., Speed T. P., Clark S. J. (2010) Protocol matters: which methylome are you actually studying? **Epigenomics** 2: 587 - 598p.

Rodenhiser D., Mann M. (2006) Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ: Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, 174: 341 - 248p.

Sati S., Tanwar V. S., Kumar K. A., Patowary A., Jain V., Ghosh S., et al. (2012) High resolution methylome map of rat indicates role of intragenic DNA methylation in identification of coding region. **PLOS ONE**, 7: 1 - 12p.

Semik E., Ząbek T., Gurgul A., Fornal A., Szmatoła T., Pawlina K., Wnuk M., Klukowska-Rötzler J., Koch C., Mählmann K., Bugno-Poniewierska M. (2018). Comparative analysis of DNA methylation patterns of equine sarcoid and healthy skin samples. **Vet Comp Oncol**. 16: 37 - 46p.

Silva I. J. O., Pandorfi H., Acararo J. R. I., Piedade S. M. S., Moura D. J. (2002) Efeitos da climatização do curral de espera na produção de leite de vacas holandesas, **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31(5): 2036 - 2042p.

Sonna L. A., Fujita J., Gaffin S. L., Lilly C. M. (2002) Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **J. Appl. Physiol**. 92: 1725 - 1742p.

Soto J., Antolin C. R., Vallespin E., Carpeno J. C., Caceres I. I. (2016). Review Article. The impact of next-generation sequencing on the DNA methylation-based translational cancer research. **Translational Research**. 169, 1 - 18.e1p.

Souza B. B., Silva G. A., Silva E. M. N. (2011) Termografia: avaliação a adaptação de caprinos leiteiros e conforto térmico das instalações. **Farmpoint**, 1 - 4p.

St-Pierre N., Cobanov B., Schnitkey G. (2003) Economic losses from heat stress by US livestock industries. **J Dairy Sci.** 86: E52 - E77p.

Straussman R., Nejman D., Roberts D., Steinfeld I., Blum B., Benvenisty N., et al. (2009) Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. **Nat Struct Mol Biol.** 16:564 - 71p.

Su J., Huang D., Yan H., Liu H., Zhang Y. (2012) Advances in Bioinformatics Tools for High-Throughput Sequencing Data of DNA Methylation. **Hereditary Genet.** 1:107p.

Su J., Wang Y., Xing X., Liu J., Zhang Y. (2014) Genome-wide analysis of DNA methylation in bovine placentas. **BMC Genomics.** 15:12p.

Sulewska A., Niklinska W., Kozłowski M., Minarowski L., Naumnik W., Niklinski J., Dabrowska K., Chyczewski L. (2007) DNA methylation in states of cell physiology and pathology. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, Warszawa, 45: 149 - 158p.

Szklarczyk, D. et al. (2015) STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, 43(D1): D447 - D452p.

Tollefsbol TO. (2011) Advances in Epigenetic Technology. **Methods Mol Biol.**; 791: 1 - 10p.

Van Laere AS, Nguyen M, Braunschweig M, Nezer C, Collette C, Moreau L, Archibald AL, Haley CS, Buys N, Tally M, Andersson G, Georges M, Andersson L. (2003) A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. **Nature.** 23; 425(6960): 832 - 6p.

Vuocolo T., Byrne K., White J., McWilliam S., Reverter A., Cockett N. E., Tellam R. L. (2007). Identification of a gene network contributing to hypertrophy in callipyge skeletal muscle. **Physiol. Genomics.** 28, 253 - 272p.

Walsberg GE, Wolf BO. (1995) Effects of solar radiation and wind speed on metabolic heat production by two mammals with contrasting coat colours. **J. Exp. Biol.** 198:1499 - 1507p.

Wang HQ, Tuominen LK, Tsai CJ. SLIM: a sliding linear model for estimating the proportion of true null hypotheses in datasets with dependence structures. (2011) **Bioinformatics**. 15; 27(2): 225 - 31p.

Wang, T.; Liu, Q.; Li, X.; Wang, X.; Li, J.; Zhu, X.; Sun, Z. S.; Wu, J. (2013) RRBS-Analyser: A Comprehensive Web Server for Reduced Representation Bisulfite Sequencing Data Analysis. **Wiley Periodicals, INC**. 34(12): 1606 - 1610p.

Weidman JR, Dolinoy DC, Murphy SK, Jirtle RL. (2007) Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. **The Cancer Journal**, Philadelphia, 13(1): 9 - 16p.

Wheelock JB, Rhoads RP, VanBaale MJ, Sanders SR, Baumgard LH (2010) Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. **J Dairy Sci**. 93(2): 644 – 655p.

Whitelaw NC, Withelaw E. (2006) How lifetimes shape epigenotype with and across generations. **Human Molecular Genetics**. 15 (2). R131 - R137p.

Wojdacz TK, Hansen LL. (2006) Techniques used in studies of age-related DNA methylation changes. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. 1067: 479 - 487p.

Wreczycka K, Gosdschana A, Yusufa D, Grüning B, Assenov Y, Akalina A. (2017) Strategies for analyzing bisulfite sequencing data. **Journal of Biotechnology**, Nov 10; 261: 105 - 115p.

Yang C, Ye J, Li X, Gao X, Zhang K, Luo L, et al. (2016) DNA Methylation Patterns in the Hypothalamus of Female Pubertal Goats. **PLOS ONE**.11: e0165327p.

Young B. A. (1983) Cold stress as it affects animal production. **J. Anim. Sci**. 52: 154 - 163p.

Yuan, Xiao-Long; Zhang, Zhe; Pan, Rong-Yang; Gao, Ning; Deng, Xi; Li, Bin; Zhang, Hao; Sangild, Per Torp; and Li, Jia-Qi. (2017). Performances of Different Fragment Sizes for Reduced Representation Bisulfite Sequencing in Pigs. **Biological Procedures Online**, 19: 5p.



Zhang, Yingying; Jeltsch, Albert. (2010). The Application of Next Generation Sequencing in DNA Methylation Analysis. **Genes**, 1, 85 - 101p.

Zhang, Xiaoyan; Zhang, Sihuan; Ma, Lin; Jiang, Enhui; Xu, Han; Chen, Rui; Yang, Qing; Chen, Hong; Li, Zhuanjian; Lan, Xianyong. (2017) Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) of dairy goat mammary glands reveals DNA methylation profiles of integrated genome-wide and critical milk-related genes. **Oncotarget**. 8(70): 115326 -115344p.

Zhou, Yang; Xu, Lingyang; Bickhart, Derek M.; Hay, El Hamidi Abdel; Schroeder, Steven G.; Connor, Erin E.; Alexander, Leeson J; Sonstegard, Tad S.; Van Tassell, Curtis P; Chen, Hong; Liu, George E. (2016) Reduced representation bisulphite sequencing of ten bovine somatic tissues reveals DNA methylation patterns and their impacts on gene expression. **BMC Genomics**. 17: 779p.

Zilberman D. (2007) Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. **Nature Reviews: Genetics**, London, 39: 61 - 69p.