

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**

**METILAÇÃO GLOBAL GENÔMICA RELACIONADA À**  
**RESISTÊNCIA PARASITÁRIA EM BOVINOS**

**Juliana Alencar Gonçalves**

Engenheira Agrônoma

**Dracena - SP**

**2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**

**METILAÇÃO GLOBAL GENÔMICA RELACIONADA À**  
**RESISTÊNCIA PARASITÁRIA EM BOVINOS**

**Juliana Alencar Gonçalves**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Velludo Gomes de Soutello**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp, ao Câmpus de Dracena como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal

**Dracena - SP**

**2020**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação  
Campus de Dracena

G586m

Gonçalves, Juliana Alencar.

Metilação global genômica relacionada à resistência  
parasitária em bovinos. / Juliana Alencar Gonçalves. --  
Dracena: [s.n.], 2020.

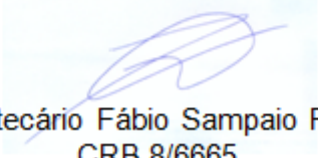
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
(Unesp). Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de  
Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2020.

Orientador: Ricardo Velludo Gomes de Soutello

Co-orientadora: Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues

1. Angus. 2. Epigenética. 3. Helmintos. 4. Mosca-dos-  
chifres. 5. Carrapato. I. Título.



Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas  
CRB 8/6665

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Investigação do perfil de metilação genômico em bovinos relacionado à resistência parasitária

AUTORA: JULIANA ALENCAR GONÇALVES

ORIENTADOR: RICARDO VELLUDO GOMES DE SOUTELLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. RICARDO VELLUDO GOMES DE SOUTELLO  
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

  
Profa. Dra. PRISCILLA APARECIDA TARTARI PEREIRA  
Departamento de Pesquisa / UNIFADRA

  
Prof. Dr. BRUNO ETTORE PAVAN  
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Ilha Solteira/SP

Dracena, 26 de fevereiro de 2020

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Juliana Alencar Gonçalves, nascida em 05 de julho de 1995, na cidade de Junqueirópolis/SP, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Câmpus de Dracena, em março de 2013, graduando-se em dezembro de 2017. Em fevereiro de 2018 ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, na FCAT/UNESP – Câmpus de Dracena.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais Wagner e Marluce e ao meu irmão Hélio  
que sempre me deram apoio para a minha formação e conclusão do  
mestrado

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por sempre estar ao meu lado me guiando e me dando forças em todos os momentos.

Agradeço a minha família, meu pai Wagner e Marluce e meu irmão Hélio por sempre estarem ao meu lado e me apoiarem em todas as escolhas. Amo muito vocês.

Agradeço ao meu orientador, professor Ricardo, pela oportunidade de realizar o mestrado e por sua orientação, ensinamentos, paciência e confiança ao longo do mestrado, sempre me dando apoio, mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço a professora Maria Gabriela por toda ajuda,apoio e ensinamentos durante meu mestrado.

Agradeço a todos que me ajudaram nas atividades experimentais e outras atividades durante o mestrado, Clara, João Vitor, Giulia, Beatriz, Lívia, Hornblenda, Rúbio, Vinicius, Arthur, Amábile e a todos do grupo EEPPA que me apoiaram nessa caminhada.

Agradeço especialmente a Clara, que foi um presente que Deus me enviou e sempre me apoiou e me aconselhou, mesmo nos momentos de desespero. Você é uma das minhas melhores amigas e, assim como a Bianca, Loyara e Emanuele, se tornou uma irmã para mim.

Agradeço aos funcionários da fazenda Santa Luzia e Córrego Seco pela ajuda em outro experimento realizado durante o mestrado, e ao seu Manoel e dona Margot por sempre nos recepcionar e acolher.

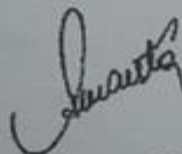
Agradeço aos demais professores e funcionários da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT – UNESP, Dracena) e a todos que direta ou indiretamente ajudaram até o momento.

## Comissão de Ética no Uso de Animais

# Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "**Influência do sombreamento na ocorrência de endo e ecto parasitas em novilhas ½ Angus x ½ Nelore no sistema silvipastoril**" (Influence of shading on the occurrence of endo and ect parasites in fleets ½ Angus x ½ Nelore in the silvipastoril system), registrada com o nº 13/2017.R1 - CEUA, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Ricardo Velludo Gomes de Soutello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em reunião de 22/06/2017.

Dracena, 22 de junho de 2017.



**Profa. Dra. Sirlei Aparecida Maestá**  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

**Resumo-** O objetivo do trabalho foi caracterizar um rebanho de 72 novilhas  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore, identificando os animais resistentes, resilientes e suscetíveis a endo e ectoparasitas, correlacionando a metilação global do DNA desses animais e o grau de parasitismo, que foi avaliado a partir da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), moscas-dos-chifres e carrapatos. Essas contagens foram submetidas a análise de variância (ANOVA) para agrupamento em resistentes, resilientes e suscetíveis pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) no programa SISVAR e agrupamento hierárquico no programa GENES. O conteúdo de metilação foi analisado a partir do DNA extraído do sangue das novilhas, por meio de kit de metilação, e a quantificação feita por leitora de microplacas. Os valores absolutos médios de absorbância dos três grupos foram submetidos à ANOVA e análises pelo Tukey ( $p < 0,05$ ). Observou-se 36,11% de animais resistentes, 52,78% resilientes e 11,11% suscetíveis a infecção por helmintos gastrintestinais, com contagens de 86, 392 e 1087 OPG, e 0,238, 0,225 e 0,197 do DNA metilado, respectivamente. Para a infestação por carrapatos, 26,39% dos animais foram classificados como resistentes, 59,72% resilientes e 13,98% suscetíveis, com contagens de 3, 8 e 19 carrapatos e 0,295, 0,216 e 0,151 do DNA metilado, respectivamente. E para a infestação por mosca-dos-chifres observou-se 54,17% de novilhas resistentes e 45,83% suscetíveis, com contagens de 17 e 32 moscas e 0,245 e 0,205 do DNA metilado, respectivamente. Na classificação pelo programa GENES, 33,33% dos animais foram classificados como resistentes, 51,39% como resilientes e 15,28% como suscetíveis a parasitas, com contagens de: 307, 205 e 988 OPG; 3, 10,4 e 10,2 carrapatos; 19, 26 e 24 moscas; e 0,247, 0,227 e 0,185 do DNA metilado. Observou-se uma ligação entre a resistência à parasitas e o conteúdo da metilação do DNA nas duas classificações. Assim, as metodologias utilizadas possibilitaram a identificação das 72 novilhas quanto ao grau de infecção por helmintos gastrintestinais e infestação por carrapatos e mosca-dos-chifres, sendo possível relacionar o grau de resistência dos bovinos à parasitas com a quantidade de metilação global do DNA.

**Palavras chave:** Angus; epigenética; helmintos; mosca-dos-chifres; carrapato

**Abstract-** The objective of the work was to characterize a herd of 72 heifers  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nellore, identifying the resistant, resilient and susceptible animals to endo and ectoparasites, correlating the overall DNA methylation of these animals and the degree of parasitism, which was evaluated from the egg count per gram of feces, horn flies and ticks. These counts were submitted to analysis of variance ANOVA for grouping in resistant, resilient and susceptible by the Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ) in SISVAR and hierarchical grouping in the GENES program. The methylation content was analyzed from the DNA extracted from the blood of the heifers, using a methylation kit and quantification by a microplate reader. The mean absolute values of absorbance of the three groups were submitted to ANOVA and analysis by Tukey ( $p < 0.05$ ). There were 36.11% of resistant animals, 52.78% resilient and 11.11% susceptible to gastrointestinal helminth infection, with counts of 86, 392 and 1087 OPG, and 0.238, 0.225 and 0.197 of methylated DNA, respectively. For tick infestation, 26.39% of the animals were classified as resistant, 59.72% resilient and 13.98% susceptible, with counts of 3, 8 and 19 ticks and 0.295, 0.216 and 0.151 of methylated DNA, respectively. And for the horn fly infestation, 54.17% of resistant and 45.83% susceptible heifers were observed, with counts of 17 and 32 flies and 0.245 and 0.205 of methylated DNA, respectively. In the second classification, 33.33% of the animals were classified as resistant, 51.39% as resilient and 15.28% as susceptible to parasites, with counts of: 307, 205 and 988 OPG; 3, 10.4 and 10.2 ticks; 19, 26 and 24 flies; and 0.247, 0.227 and 0.185 of methylated DNA. A link was observed between resistance to parasites and the content of DNA methylation in the two classifications. Thus, the methodologies used enabled the identification of 72 heifers as to the degree of infection by gastrointestinal helminths and infestation by ticks and horn flies, making it possible to relate the degree of resistance of cattle to parasites with the amount of overall DNA methylation.

**Keywords:** Angus x Nelore; epigenetics; helminths; flies; ticks.

## SUMÁRIO

Página

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais.....                                                        | 9  |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                            | 9  |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                 | 12 |
| 2.1 Panorama da Bovinocultura.....                                                            | 12 |
| 2.2 Parasitismo .....                                                                         | 12 |
| 2.2.1 Helmintos gastrintestinais .....                                                        | 13 |
| 2.2.2 Mosca-dos-chifres .....                                                                 | 15 |
| 2.2.3 Carrapatos .....                                                                        | 17 |
| 2.3 Controle e Resistência Antiparasitária .....                                              | 19 |
| 2.4 Resistência à Parasitas e Epigenética .....                                               | 21 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                             | 24 |
| CAPÍTULO 2 - Metilação global genômica relacionada à resistência parasitária em bovinos ..... | 36 |
| Resumo .....                                                                                  | 37 |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                            | 39 |
| 2 OBJETIVO .....                                                                              | 41 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                     | 41 |
| 3.1 Classificação dos Animais Mediante o Grau de Parasitismo .....                            | 43 |
| 3.2 Metilação do DNA.....                                                                     | 44 |
| 3.2.1 Extração do DNA.....                                                                    | 44 |
| 3.2.2 Metilação global .....                                                                  | 45 |
| 3.2.3 Análise estatística.....                                                                | 46 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                | 46 |
| 5 CONCLUSÃO .....                                                                             | 64 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                            | 64 |

## CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

### 1 INTRODUÇÃO

As parasitoses, ocasionadas por endo e ectoparasitas, são uma das principais causas de redução da produtividade dos ruminantes. (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Os endoparasitas são responsáveis por reduzir o desempenho produtivo e econômico na produção de bovinos (CARREIRA, 2013), sendo a helmintose um dos principais fatores que pode interferir na produção dos mesmos (GRAEF; CLAEREBOU; GELDHOF, 2013). A doença é caracterizada como uma perturbação limitante causada pelos nematódeos, que leva a quadros de perda de peso, redução da conversão alimentar, performance reprodutiva, qualidade de carcaça e alterações no sistema imunológico (VENTURINI; MENEZES, 2016) logo é responsável por grande parte do prejuízo na atividade pecuária (ANUALPEC, 2015).

Quanto aos ectoparasitas, a mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) e o carrapato (*Rhipicephalus microplus*) são os mais importantes para a pecuária no Brasil (SILVA *et al.*, 2010a), pois causam grandes prejuízos para a atividade (GRISI *et al.*, 2014). A mosca-dos-chifres é um pequeno díptero hematófago que parasita o hospedeiro dia e noite, abandonando-o apenas no momento da oviposição, e está relacionado com a transmissão de patógenos e ao estresse do animal, que se debate muito na tentativa de se livrar das mesmas, gastando energia e diminuindo o tempo de pastejo e ingestão de água (BIANCHIN; ALVES, 2002). O carrapato também é um ectoparasita hematófago que, segundo Andreotti (2010), leva a perdas na produção de leite e carne, danos no couro e transmite doenças, como a Tristeza Parasitária Bovina.

A forma mais utilizada para controlar o parasitismo é por meio de produtos químicos, porém o uso excessivo e irracional dos antiparasitários pode levar a ineficácia dos medicamentos (KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012), por conta do sério problema de resistência dos parasitas aos fármacos (FREITAS *et al.*, 2005; ROCHA; OLIVEIRA, 2006; BARROS; GOMES; KOLLER, 2007; FARIAS; LOPES RUAS; BETTIN DOS SANTOS, 2008; SALGADO; SANTOS, 2016). Sendo assim, há uma busca crescente de alternativas para o controle de parasitas (LI *et al.*, 2012)

ediminuição do uso de antiparasitários, como, por exemplo, a utilização de animais resistentes aos parasitas e pela diversidade do genoma do hospedeiro (SONSTERGARD; GASBARRE, 2001). Contudo, os mecanismos envolvidos no processo de resistência dos animais aos parasitas não são muito claros (SANTOS *et al.*, 2015), principalmente por depender de uma grande quantidade de anticorpos, citocinas, células e genes (TIZARD, 2009).

Sabe-se que, provavelmente, a resistência está ligada a herança de genes ou locos genômicos que têm papel na expressão de moléculas que regulam a imunidade do hospedeiro com o objetivo de limitar e controlar a patologia (LI *et al.*, 2012). Dessa forma, a seleção de animais resistentes pode ser altamente eficiente (BIEGELMEYER *et al.*, 2012), já que a resistência é uma característica herdável (AMARANTE, 2004) e, há uma expressiva diminuição dos picos sazonais na carga parasitária e no número de larvas no pasto após a seleção (PACHECO, 2015).

Por muitos anos os genes foram considerados os únicos responsáveis pela passagem das características biológicas de uma geração à outra, porém variações epigenéticas, também podem ser passadas aos seus descendentes (FANTAPPIE, 2013). Essas variações são definidas como modificações no genoma que não alteram a sequência de DNA (BAKUSIC *et al.*, 2017) e são hereditárias e reversíveis (TSAI; BAYLIN, 2011), por meio da memória celular. Logo, representa um conjunto de eventos moleculares que modulam a expressão dos genes (BIRD, 2007).

Essas modificações incluem o aparecimento de metilação do DNA, modificações das histonas e outros mecanismos como a inativação da cromatina (BRÄUTIGAM; CRONK, 2018). A metilação do DNA é um dos mecanismos mais estudados dentre os mecanismos epigenéticos, consistindo basicamente na adição de um radical metil à uma base nitrogenada (COSTA, 2008; PORTELA; ESTELLER, 2010). Normalmente ocorre em uma ilha CpG, que é um sítio dinucleotídeo (PORTEN, 2018), mais especificamente, na posição carbono-5 no anel de citosina, 5mC (TCHURIKOV, 2005).

A adição de um grupo metila a uma molécula de DNA pode levar ao silenciamento de diversos genes ou a sua superexpressão, fazendo parte da evolução de um animal, sendo que a alteração do padrão da metilação do DNA leva a criação de um novo perfil que pode ativar genes que deveriam permanecer

silenciados e ter um efeito significativo na vida e na saúde de um organismo (FANTAPPIE, 2013).

Tendo em vista a importância do controle dos parasitas em bovinos, se faz necessário a busca por alternativas como o uso de animais resistentes aos mesmos e o estudo da diversidade genética do genoma do hospedeiro. Dessa forma, as pesquisas sobre mecanismos epigenéticos podem ser utilizadas como uma ferramenta para a identificação e possível seleção de animais resistentes. Apesar de não haver ainda estudos nesta área que envolvam a metilação global do DNA de bovinos e o grau de parasitismo a helmintos, carrapatos e moscas.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar um rebanho de 72 novilhas  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore, identificando os animais resistentes e suscetíveis a endo e ectoparasitas, correlacionando a metilação global do DNA desses animais e o grau de parasitismo avaliado durante o período de um ano, sem tratamento antiparasitário.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Panorama da Bovinocultura**

Atualmente, o principal desafio da humanidade é a produção de alimentos para suprir as necessidades da população mundial e os animais ruminantes têm papel importante nesse desafio, pois transformam produtos ricos em celulose que não são utilizados pelo homem em proteína de alta qualidade, vitaminas, minerais e energia (SILVA *et al.*, 2010b).

No Brasil, a pecuária bovina é uma atividade de grande importância socioeconômica (ALVES; SANTILIANO; ALMEIDA, 2012; HEINZEN *et al.*, 2012), por possuir o maior rebanho comercial do mundo (ALVES; SANTILIANO; ALMEIDA, 2012) e o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com 214, 9 milhões de cabeças (IBGE, 2017). Dessa forma, há uma busca por maior produtividade, tornando o rebanho mais efetivo por meio de índices ideais, como idade ao primeiro parto em torno de 24 meses, período de serviço ou número de dias em aberto pós-parto por volta dos 90 dias, intervalo entre partos próximos aos 12 meses e desmame de bezerros saudáveis e pesados com 7 a 8 meses de idade (VENTURINI; MENEZES, 2016).

Por essa razão é de extrema importância a busca por tecnologias que proporcionem esse sucesso da exploração de gado de corte, como: cruzamentos industriais, exigências nutricionais e alimentação mais adequada às realidades de campo, e a uma condição sanitária satisfatória do rebanho (BASTOS *et al.*, 2018).

### **2.2 Parasitismo**

O crescimento na exploração mais intensiva da pecuária bovina ocasiona o aumento na lotação das pastagens, juntamente com o manejo adotado de pastejo contínuo, acarretando, assim, no aumento dos problemas sanitários, como as diversas parasitoses, causadas por endoparasitas e ectoparasitas (VENTURINI; MENEZES, 2016).

As doenças parasitárias são uma das principais causas da redução de produtividade dos ruminantes (OLIVEIRA *et al.*, 2017) e representam um impacto negativo em potencial para a atividade pecuária, comprometendo o capital investido em insumos e genética do rebanho, reduzindo o desempenho produtivo e reprodutivo dos animais, e podendo levar a morte e ao descarte involuntário dos mesmos (STOTZER *et al.*, 2014). Além das perdas qualitativas como: aumento da idade ao primeiro parto, perda de qualidade de carcaça, queda na qualidade do couro e comprometimento de produtos cárneos pela presença de lesões ou parasitas nos tecidos (STOTZER *et al.*, 2014).

Oliveira *et al.* (2017), analisando as principais doenças parasitárias que ocorreram na região sul do Rio Grande do Sul em ruminantes, observaram que de janeiro de 1970 a dezembro de 2014, 10,1% (595) dos 5.887 materiais de bovinos (exames coproparasitológicos, esfregaço sanguíneo, impressão de órgãos e raspado de pele) recebidos pelo Laboratório Regional de Diagnósticos da UFPel se tratavam de parasitoses e que 22,35% dessas parasitoses se tratavam de nematódeos gastrintestinais.

No Brasil, a ocorrência desses parasitas internos e externos em bovinos é favorecida pela predominância de climas tropicais e subtropicais (GRISI *et al.*, 2014), dessa forma, o controle de parasitas em bovinos é de fundamental importância para a pecuária bovina, uma vez que causam grandes perdas econômicas devido ao menor ganho de peso, menor rendimento de carcaça, gastos com antiparasitários e mão de obra, transmissão de patógenos, queda na produtividade e até mortalidade (DELGADO *et al.*, 2009; HEINZEN *et al.*, 2012)

### **2.2.1 Helmintos gastrintestinais**

Os nematódeos, principalmente os gastrintestinais, ocupam um papel de destaque dentre os helmintos, causando grandes perdas econômicas por conta da queda na produção animal e mortalidade em casos mais graves (SANTOS, 1973; SOUTELLO, 2001; GRAEF; CLAEREBOU; GELDHOF, 2013; BASTOS *et al.*, 2018). As espécies de nematódeos gastrintestinais e suas prevalências, são muito variáveis, pois dependem dos fatores topográficos, temperatura, precipitação

pluviométrica, pastagem e outros (UENO; GONÇALVES, 1998). Os ruminantes, de forma geral, são parasitados por inúmeras espécies do Filo Nematoda (VENTURINI; MENEZES, 2016), mais especificamente da ordem Strongylida (SEQUEIRA; AMARANTE, 2001). Essa ordem é composta por quatro superfamílias e a superfamília Trichostrongyloidea apresenta os nematódeos mais comuns e patogênicos para ruminantes mantidos a pasto, encontrados principalmente no abomaso e no intestino delgado desses animais, compreendendo os seguintes gêneros: *Trichostrongylus*, *Haemonchus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Dictyocaulus*, *Ostertagia*, *Oesophagostomum* e *Hyostrogylus* (BOWMAN, 2010). No Brasil, diversos estudos realizados com bovinos apontam que os principais gêneros encontrados no país são *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp., *Oesophagostomum* spp. e *Trichostrongylus* spp. (GUIMARÃES, 1977; LIMA; GUIMARÃES; LEITE, 1985; ARAÚJO *et al.*, 1992; LIMA, 1998; GUIMARÃES *et al.*, 2000; SOUTELLO *et al.*, 2007; FACHIOILLI *et al.*, 2017; SOUTELLO *et al.*, 2018), sendo as infecções causadas pelas espécies de *Haemonchus* consideradas as mais patogênicas, pois são parasitas hematófagos que causam debilidade no animal (BALIC; BOWLES; MEEUSEN, 2002).

Esses parasitas estão inevitavelmente associados com animais a pasto (ANZIANI; FIEL, 2005), pois as condições climáticas e edáficas de alta temperatura e umidade das pastagens brasileiras são propícias ao parasitismo pelos mesmos (MENDONÇA *et al.*, 2014), favorecendo, portanto, que a maioria dos bovinos seja parasitada durante todo o ano por helmintos gastrintestinais (VENTURINI; MENEZES, 2016). As pastagens também fornecem a ligação entre as fases de vida livre e parasitária dos parasitas gastrointestinais dos animais em pastejo (WALLER, 2006). O ciclo de vida dos nematódeos é marcado por mudas de cutícula antes da fase adulta, sendo elas os estádios L1, L2, L3, L4, e finalmente o verme adulto imaturo (URQUHART *et al.*, 1996). É dividido em ciclo de vida direto, ou seja, uma fase interna no hospedeiro, e outra externa no ambiente, ou seja, nas áreas fecais e forragem (FIEL *et al.*, 2012). E tem início pela ingestão do parasita (L3 ou forma infectante) ou pela pele, sendo que esses endoparasitas chegam ao meio exterior pelas fezes, urina e até expectoração brônquica em alguns animais, e a

eclosão pode ocorrer no ambiente ou após a ingestão pelo hospedeiro (SEQUEIRA; AMARANTE, 2001).

As endoparasitoses causam alterações metabólicas que podem prejudicar o desempenho do hospedeiro (SYKES; COOP, 1979), comprometendo o crescimento ósseo por conta da perda de minerais (cálcio, fósforo e magnésio, por exemplo) na matéria fecal e urina (PEREIRA; LEITE; BIANCHIN, 2004); reduzindo a ingestão voluntária, digestão e absorção, consequentemente na disponibilidade de nutrientes para os animais; inibindo o apetite dos mesmos, ocasionando infecção do trato digestivo e comprometendo a absorção dos alimentos pelos bovinos; e pela perda de proteínas endógenas no trato gastrointestinal, responsáveis pelas atividades do sistema imune e reparação tecidual (VENTURINI; MENEZES, 2016). Logo, os bovinos que apresentam infecções por parasitas têm um retardo no crescimento, queda na produção de carne e leite, além da redução no desempenho reprodutivo, e como consequência causam prejuízos aos produtores (STROMBERG *et al.*, 2012), por conta do menor ganho de peso, menor rendimento de carcaça (HEINZEN *et al.*, 2012), morbidade, mortalidade, custos com profilaxia e/ou tratamento e redução da produtividade em interação com estresse nutricional, ambiente, manejo e outros aspectos sanitários (LIMA, 2004).

Santos (1973), avaliando os prejuízos causados pelas helmintoses em bovinos de duas propriedades com criação extensiva em zona de Depressão Central (estabelecimentos na área geoeducacional da Universidade Federal de Santa Maria), observaram que uma perda de 36,7kg de peso vivo nos animais parasitados, portanto a incidência de helmintos ocasionou a perda de 32% sobre o ganho total. Grisi *et al.* (2014) estimaram que as altas perdas devido a nematódeos gastrointestinais em bovinos chegaram ao US\$7.107,97 milhões, logo esse parasitismo representa um importante problema econômico no Brasil. Dessa forma, o controle das helmintoses é um importante fator para o sucesso da pecuária bovina.

### **2.2.2 Mosca-dos-chifres**

A eficiência da exploração comercial bovina em regiões tropicais depende do potencial de produção dos animais e da capacidade de adaptação ao ambiente,

contudo, a ocorrência de infestações parasitárias nos trópicos tem acarretado quedas consideráveis nos índices de produção (FRAGA *et al.*, 2003).

O impacto econômico de parasitas externos no gado está associado principalmente a infestações por carrapato (*Rhipicephalus microplus*) e pela mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) (GRISI *et al.*, 2014), sendo os ectoparasitas mais importantes para a pecuária do Brasil (SILVA *et al.*, 2010a).

A mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*), descrita por Linnaeus em 1758, foi reconhecida como praga em 1830, na França (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990; BRITO *et al.*, 2005; JORGE; ROSA; SANTOS, 2016), sendo introduzida acidentalmente em países onde a bovinocultura encontrava-se em expansão (BRITO *et al.*, 2005). Segundo Valério e Guimarães (1982), ela é conhecida no Brasil desde de 1980, quando técnicos do Centro Nacional de Pesquisas do Gado de Corte – Embrapa já observavam o ataque das mesmas no gado bovino em propriedades rurais e abatedouros no município de Boa Vista – Roraima. Os autores foram os responsáveis pelo primeiro registro desse parasita no País, tendo aparecido na maioria dos estados brasileiros em 1991 (BIANCHIN; ALVES, 2002). Essa expansão ocorreu de forma lenta e a ocupação no território nacional ocorreu principalmente por conta de movimentos de bovinos ou veículos sujos com fezes infestadas (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990). Hoje encontra-se distribuída por todo o Brasil (FILHO *et al.*, 2010).

A *H. irritans* é uma pequena mosca hematófaga da família Muscidae que mede de 2 a 3 mm, tem preferência quase exclusivamente por sangue bovino (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990; FILHO *et al.*, 2010) e é considerada uma praga em vários países (BIANCHIN; ALVES, 2002).

Esse ectoparasita possui a metade do tamanho da mosca-dos-estábulo, coloração castanha e as seguintes características: pousa no hospedeiro com a cabeça para baixo e asas parcialmente abertas (“asa delta” -  $\pm 60^\circ$ ) para se alimentar, voa em grupos (“nuvens”) quando muda de um lugar para outro no animal, a presença do homem não a perturba (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990) e se concentram nas partes do animal que ficam fora do alcance dos movimentos da cauda e cabeça, como o cupim, costas, barriga e pernas (BIANCHIN; ALVES, 2002). Contudo, a principal característica desse díptero hematófago é sua permanência no

animal, constantemente sugando sangue de seu hospedeiro e o abandonando apenas na fase de postura, em curtos intervalos de tempo, para depositar seus ovos em fezes frescas (VENTURINI; MENEZES, 2016) e iniciar seu ciclo de vida, que pode durar 10 dias (fase de ovo a adulto) nos ambientes quente e úmidos e pode chegar até 50 dias em períodos frios e secos (SILVA; RUE; GRAÇA, 2002). As fêmeas ovipositam durante 10 a 15 minutos após o animal ter defecado, passado este período as fezes perdem atratividade (BIANCHIN; ALVES, 2002).

Tendo em vista a constante permanência da mosca no animal, em altas infestações, o hospedeiro pode apresentar lesões cutâneas que o predispõem ao desenvolvimento de infecções bacterianas (SILVA; RUE; GRAÇA, 2002). Além das infecções, o parasitismo causado pelas moscas-dos-chifres favorece a transmissão de patógenos (carbúnculo hemático, leucose, anaplasmoze, doença causada pelo helminto *Stephanofilaria sp.* e também miíases) e gera estresse ao animal (JORGE; ROSA; SANTOS, 2016) por conta das picadas dolorosas, repetidas muitas vezes por dia, que deixam os animais nervosos e irritados, prejudicando seu crescimento, desempenho e atividade reprodutiva (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990). Segundo Bianchin e Alves (2002), os hospedeiros gastam muita energia tentando se livrar das moscas e com isso diminuem o tempo de pastejo e a ingestão de água.

Maciel *et al.* (2015), estudando os efeitos das infestações por *H. irritans* no ganho de peso de bezerros Nelore, observaram que a infestação pela mosca-dos-chifres leva a uma diminuição no ganho de peso de 20kg por animal, além da irritabilidade dos animais, que apresentavam comportamento constantemente, como usar a cabeça para evitar as moscas ou formar grupos com outros animais do mesmo piquete, na tentativa de se defender contra esse ectoparasita.

Além dos prejuízos no desempenho e produtividade dos animais, também há o prejuízo econômico. De acordo com Grisi *et al.* (2014), considerando as populações em risco e os valores de mercado, o parasitismo causado pelas moscas-dos-chifres no Brasil leva a perdas de US\$ 2.558,32 milhões.

### **2.2.3 Carrapatos**

O carrapato mais comum encontrado parasitando bovinos no Brasil é o *Rhipicephalus microplus*, denominado de carrapato-do-boi (GOMES, 2000; VERÍSSIMO, 2015; VENTURINI; MENEZES, 2016). Esse ectoparasita é originário da Ásia, notadamente da Índia e Ilhas de Java e sua expansão ocorreu em virtude das Expedições Exploradoras com a transferência de animais e mercadorias, vindo para o Brasil com bovinos comprados no Chile, no início do século XVII, e entrando no país pelo estado do Rio Grande do Sul (KESSLER; SCHENK, 1998). Hoje, esse carrapato encontra-se amplamente disseminado e é encontrado em quase todo o território brasileiro (BILHASSI, 2016), principalmente devido às condições climáticas do país que favorecem o seu desenvolvimento (VENTURINI; MENEZES, 2016).

O *Rhipicephalus microplus* é um parasita da família Ixodidae que acomete apenas um hospedeiro durante seu ciclo evolutivo e apresenta duas fases, sendo a primeira fase de vida livre, que tem início com a fêmea fecundada e ingurgitada (teleógina) se desprendendo do hospedeiro e caindo no solo para realizar a postura (KESSLER; SCHENK, 1998; GOMES, 2000). Essa fase dura em torno de 15 a 18 dias e durante esse período as teleóginas buscam um lugar úmido e protegido da luz solar direta para iniciar a postura, sendo que as mesmas ingerem em torno de três mililitros de sangue, transformam cerca de 60% de sua biomassa em ovos e apresentam potencial para produzir de 2000 a 3000 ovos (GOMES, 2015). Contudo, essa fase pode terminar em uma das seguintes situações: a) as teleóginas morrem sem efetuar a oviposição, b) as teleóginas produzem ovos inférteis, c) as larvas morrem sem alcançar um hospedeiro adequado, ou d) as larvas conseguem alcançar um hospedeiro suscetível (KESSLER; SCHENK, 1998). A segunda fase tem duração média de 23 dias e tem início com a fixação das larvas no hospedeiro suscetível e término com a queda dos adultos (teleóginas fecundadas e alimentadas) desse hospedeiro, ou seja, é o período que o carrapato parasita o animal (GOMES, 2000).

As infestações pelo carrapato-do-boi ocorrem em todas as regiões intertropicais e causa perdas econômicas em muitos países (HIGA *et al.*, 2016), além de se destacarem como aquelas que mais afetam a produção animal nos trópicos, juntamente com as infecções causadas por hemoparasitas da espécie *Babesia* spp. (BILHASSI, 2016). Os prejuízos causados por esse

ectoparasita ocorrem devido as ações espoliadora, mecânica e tóxica que exercem sobre os hospedeiros (FRAGA *et al.*, 2003) e são evidenciados pelo: a) seu hábito hematófago, b) pela inoculação de toxina nos hospedeiros, promovendo alterações e consequências fisiológicas, como a inapetência alimentar, c) pela redução da qualidade do couro, que são desclassificados por conta das cicatrizes irreversíveis ocasionadas durante a alimentação do carrapato (GOMES, 2000), e pela transmissão de agentes infecciosos, como a *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*, responsáveis pela Babesiose bovina e complexo de Anaplasmosis (ANDREOTTI *et al.*, 2011; BILHASSE, 2016; HIGA *et al.*, 2016).

Logo, é evidente que esse parasita sugador de sangue que infesta o gado, em grandes quantidades, afeta o apetite, a digestão e o metabolismo do animal, causando debilitação, anemia, perda de peso e morte (JONSSON, 2006). Segundo Grisi *et al.* (2014), considerando todo o rebanho brasileiro (cerca de 11% *B. taurus* e 89% *B. indicus* e híbridos), a perda econômica total causada por conta do *R. microplus* no rebanho bovino brasileiro pode se aproximar de US\$ 3.236,35 milhões.

### 2.3 Controle e Resistência Antiparasitária

O método de controle mais utilizado é o emprego de produtos químicos (FRAGA *et al.*, 2003), sendo o controle dos helmintos gastrointestinais realizado pelo uso de drogas anti-helmínticas (ANZIANI; FIEL, 2005; GRAEF *et al.*, 2013) com formulações de várias bases de princípio ativo (BASTOS *et al.*, 2018), o controle do *R. (B.) microplus* realizado pelo uso de acaricidas, mais especificamente, carrapaticidas (GOMES, 2015; HIGA *et al.*, 2016) como uma estratégia eficaz para mitigar o impacto econômico desse ectoparasita na indústria pecuária (ANDREOTTI *et al.*, 2011), e o controle da *Haematobia irritans* realizada pelo uso de inseticidas (CAMPOS *et al.*, 2008).

Contudo, o uso desses produtos químicos, além dos altos custos e da possível ocorrência de resíduos na carne, também pode prejudicar o controle futuro desses parasitas por conta do uso em grande escala que leva ao desenvolvimento da resistência aos princípios ativos utilizados (FRAGA *et al.*, 2003).

Logo, a resistência antiparasitária e seu mecanismo de instalação ocorrem pelo uso frequente de uma mesma base farmacológica (BASTOS *et al.*, 2018), sendo caracterizada pela sobrevivência dos parasitas que normalmente seriam eliminados pelo medicamento (GRAEF *et al.*, 2013). Outro fato importante é que a resistência é hereditária, avançando por conta da pressão de seleção e da possibilidade de indivíduos resistentes se reproduzirem e gerarem indivíduos naturalmente resistentes (SOUTELLO *et al.*, 2018).

A resistência de helmintos de bovinos a anti-helmínticos não é tão frequente como ocorre com outros ruminantes, como ovinos e caprinos (SOUZA *et al.*, 2008), contudo, no Brasil, vários estudos relatam a presença da resistência às drogas anti-helmínticas (PINHEIRO; ECHEVARRIA. 1990; PAIVA *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2004; RANGEL *et al.*, 2005; SOUTELLO; SENO; SOUZA *et al.*, 2008; BORGES *et al.*, 2013).

Quanto a resistência do carrapato, os primeiros registros no país datam de 1953 (FREIRE, 1953). Após essa data, vários estudos relataram a resistência desse ectoparasita aos principais medicamentos utilizados (ARANTES; MARQUES; HONER, 1995; FURLONG, 1999; MARTINS *et al.*, 2003; KLAFKE *et al.*, 2006; ANDREOTTI *et al.*, 2011; JANER *et al.*, 2012; HIGA *et al.*, 2016).

O primeiro relato de resistência de mosca-dos-chifres à inseticidas foi para os organofosfatos no início dos anos 60 (BURNS; WILSON, 1963), seguido pelo tetraclorvinfos na década de 70 (SHEPPARD, 1983; HARVEY; BRETHOUR; BROCE, 1984). No Brasil a resistência de *Haematobia irritans* foi relatada a piretróides nos estados do sul (GUGLIELMONE *et al.*, 2001) e do norte (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Costa *et al.* (2016), diagnosticando as práticas de manejo para o controle de *Haematobia irritans* em rebanhos bovinos no Norte de Minas Gerais, concluíram que na maioria das fazendas avaliadas o controle desses ectoparasitas é inadequado e o uso de inseticidas é indiscriminado e sem nenhum critério técnico-científico, favorecendo a seleção de moscas resistentes.

Além da resistência antiparasitária, há o alto custo dos programas de controle e insumos que diminuem a eficiência e a lucratividade do produtor (OLIVEIRA; ALENCAR, 1990; GASBARRE; LEIGHTON; SONSTERGARD, 2001) e a presença

de resíduos que são um problema para a saúde pública e meio ambiente (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Dessa forma, a busca por novas alternativas no controle de endo e ectoparasitas é de extrema importância. No Brasil, há um crescente interesse pelo uso de animais resistentes aos parasitas e melhor adaptados às nossas condições tropicais, portanto uma estratégia de controle é a seleção de animais geneticamente resistentes, que pode auxiliar na redução do uso de antiparasitários (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

## 2.4 Resistência à Parasitas e Epigenética

A resistência é definida como a habilidade de suprimir o estabelecimento e/ou desenvolvimento da infecção causada por helmintos (SUAREZ; Buseti; LORENZO, 1995; GASBARRE; LEIGHTON; SONSTERGERD, 2001) e/ou a infestação causada por ectoparasitas (*Rhipicephalus microplus* e *Haematobia irritans*)(UTECH; WHARTON; KERR, 1978).

Essa resistência aos parasitas pode ser influenciada por diversos fatores como: condições climáticas, raça, idade, sexo, características da pelagem; imunidade e genética dos animais (BURROW; SEIFERT; HETZEL, 1991; STEELMAN *et al.* 1991; LIMA; PRADO; PERRI, 2002; ALENCAR; FRAGA; SILVA, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009; PRAYAGA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010a; OLIVEIRA *et al.*, 2013; PACHECO, 2015; PASSAFARO *et al.*, 2015; NEVES *et al.*, 2016). Contudo, os mecanismos envolvidos nesse processo são complexos e ainda pouco compreendidos (BIEGELMEYER *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2015) pois dependem de uma grande quantidade de anticorpos, citocinas, células e genes (TIZARD, 2009).

Sabe-se que a resistência é uma característica herdável (GASBARRE; LEIGHTON; SONSTEGARD, 2001; FRAGA *et al.*, 2003; SHYMA; GUPTA; SINGH, 2015), mediada por grande quantidade de genes (LASELY, 1978) que possuem papel direto ou indireto na expressão de moléculas que regulam a imunidade do hospedeiro (LI *et al.*, 2012).

Essa imunidade pode ser inata, ou seja, já presente nos animais nunca antes expostos aos parasitas, ou adquirida, que se torna evidente após a exposição repetida dos mesmos (RIEK, 1962) e envolve a imunidade humoral e a celular (WIKEL, 1996), mediadas pelas imunoglobulinas e linfócitos T, respectivamente (TIZARD, 2008).

A resposta imunológica tem início quando há um estímulo por antígenos específicos encontrados nos parasitas, que levam ao agrupamento, direcionamento e ativação de leucócitos, principalmente eosinófilos, combinados a sinalização de citocinas (moléculas mediadoras) e produção de anticorpos (BROSSARD; WIKEL, 2004; SYKES, 2008), sendo os leucócitos (eosinófilos) indicadores de resistência que podem ser encontrados em amostras de sangue (ASSENZA, 2014). Os mediadores imunológicos, como por exemplo a bradicinina e histamina (CLARK, 1979), induzidos por antígenos também contribuem para a sensação de coceira, que estimula o processo de autolimpeza dos bovinos (SHYMA; GUPTA; SINGH, 2015).

Contudo, os genes não são os únicos responsáveis pela passagem de características de uma geração a outra (FANTAPPIE, 2013). Além da genética, há a chamada epigenética, que estuda processos também herdáveis, mas que não dependem estritamente da sequência do DNA (LIEB *et al.*, 2006), além de serem processos reversíveis (BLOMEN; BOONSTRA, 2011).

Historicamente, a palavra “epigenética” foi usada para descrever eventos que não poderiam ser explicados por princípios genéticos, sendo que, ao longo dos anos, os fenômenos biológicos considerados bizarros e inexplicáveis foram agrupados na categoria de epigenética (GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007). Contudo o termo “epigenética” tem origem do grego, onde “epi” significa “acima, perto, a seguir”, sendo definida como modificações do genoma que não alteram a sequência do DNA (ácido desoxirribonucleico) (FANTAPPIE, 2013). Logo, são mecanismos responsáveis pelo controle da expressão gênica, além da diferenciação celular e tecidual (MORAES, 2019), do reparo do DNA e da recombinação (FINGERMAN *et al.*, 2013).

É por conta desses mecanismos que as células podem se diferenciar e dar origem aos mais diversos órgãos e tecidos, mesmo que todas elas apresentem a mesma informação genética (MORAES, 2019). Essas modificações podem ser

desencadeadas no genoma de um indivíduo em qualquer momento de sua vida (COSTA; PACHECO, 2013), e são influenciadas pelo tipo da célula ou tecido, idade, exposição a estímulos ambientais ou inúmeros outros fatores (FINGERMAN *et al.*, 2013).

Esses eventos podem ser RNAs não-codificantes, modificações de histonas, remodelação da cromatina e posicionamento dos nucleossomos, metilação do DNA ou metilação da citosina e fatores de transcrição, tanto *enhancers* como repressores (JONES; SUNG, 2014; SOUSA, 2017; BRÄUTIGAM; CRONK, 2018).

Observa-se que o campo da epigenética está ganhando cada vez mais interesse dentro da comunidade científica (FINGERMAN *et al.*, 2013), sendo a metilação do DNA ou metilação da citosina um dos mecanismos mais estudados por (NICIURA *et al.*, 2018) desempenhar papel importante na herança epigenética (BLOMEN; BLOONSTRA, 2011). A metilação consiste basicamente na adição de um radical metil (-CH<sub>3</sub>) à uma base nitrogenada (PORTELA; ESTELLER, 2010), normalmente em resíduos de citosina de dinucleotídeos CpG (GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007), mais especificamente na posição carbono-5 do anel pirimídico de uma citosina, transformando-a em 5-metil-citosina (5mC), por meio da ação das metiltransferases de DNA (DNMTs) (MORAES, 2019).

As ilhas CpG possuem um papel importante nas regiões promotoras dos genes, onde a metilação das mesmas pode levar ao silenciamento de diversos genes e subsequente inibição da transcrição gênica (REIS, 2015). Já a desmetilação pode tornar as regiões promotoras ativas, permitindo a interação com vários fatores de transcrição que controlam a ativação gênica (REIS, 2015). A metilação também pode levar a uma superexpressão do gene (FANTAPPIE, 2013) quando ocorre nas regiões codificadoras dos genes (éxons) (YANG *et al.*, 2014), além de também participar da estabilidade cromossômica e funcionar como um sinal epigenético de memória transmitido durante a replicação do DNA (BLOMEN; BLOONSTRA, 2011).

Como pode ser observado, a genética clássica por si só não pode explicar a diversidade de fenótipos dentro de uma população, nem como os animais podem apresentar diferentes sensibilidades à determinada doença (ARAÚJO, 2015), logo, a compreensão da expressão dos genes poderia esclarecer os mecanismos de resistência (BIEGELMEYER *et al.*, 2012).

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, M. M.; FRAGA, A. B.; SILVA, A. M. Adaptação de genótipos a ambientes tropicais: resistência à mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*, Linnaeus) e ao carrapato (*Boophilus microplus*, Canestrini) em diferentes genótipos bovinos. **Agrociência**, v. 9, n. 1–2, p. 579-585, 2005.
- ALVES, D.P.; SANTILIANO, F.C.; ALMEIDA, B.R. Epidemiologia das helmintoses gastrointestinais em bovinos. **PUBVET**, v. 6, n. 25, p. 1-23, 2012.
- AMARANTE, A. F. T. Resistência genética a helmintos gastrintestinais. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 2004, 5, Pirassununga – SP. **Anais [...]**. Pirassununga - SP, 2004. p. 1-10.
- ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2010. p. 36. (Documentos / Embrapa Gado de Corte, 180)
- ANDREOTTI, R.; GUERRERO, F. D.; SOARES, M. A.; BARROS, J. C.; MILLER, R. J.; LÉON, A. P. De. Resistência acaricida de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 127–133, 2011.
- ANUALPEC 2015. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: FNP - Consultoria e Comercio, 1994. Anual.
- ANZIANI, O.; FIEL, C. Resistencia de los nemátodos gastrointestinales a los antihelmínticos: Un problema emergente y relevante para la producción bovina nacional. **Estudio de la Resistencia A Los Antiparasitarios en Argentina**, p. 40–49, 2004.
- ARANTES, G. J.; MARQUES, A. O.; HONER, M. R. O carrapato do bovino, *Boophilus microplus*, no município de Uberlândia, MG: análise da sua resistência contra carrapaticidas comerciais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 89–93, 1995.
- ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; LIMA, P. A. S.; LIMA, W. S. Avaliação de tratamentos anti-helmínticos em bezerros de bacia leiteira de Muriaé, MG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 7–14, 1992.
- ARAÚJO, N. B. **Análise do perfil de metilação do DNA em pacientes com câncer de mama**. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada à Saúde) - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- ASSENZA, M. F. **Modelling Genetic Selection for Gastrointestinal Parasites Resistance in Small Ruminants**. 2014. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências

Ecológicas, Veterinárias, Agrícolas e de Bioengenharia - SEVAB) - INP Toulouse, Université de Toulouse, Toulouse, França, 2014.

BAKUSIC, J.; SCHAUFELI, W.; CLES, S.; GODDERIS, L. Stress, burnout and depression: A systematic review on DNA methylation mechanisms. **Journal of Psychosomatic Research**, v.92, p. 34-44, jan. 2017.

BALIC, A.; BOWLES, V. M.; MEEUSEN, E. N. T. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 24, p. 39- 46, 2002.

BARROS, A. T. M.; GOMES, A.; KOLLER, W. W. Inseticide susceptibility of horn flies, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.3, p.145-151, 2007.

BASTOS, J. A. R.; PINTO, R.; FAUSTO, G. C.; PONTES, K. C. S.; NONATO, I. A.; CARVALHO, C. A. De. Tratamento antiparasitário em bovinos com erva de macaé (*Leonurussibiricus*) e pau jacaré (*Piptadeniagonoacantha*): uma alternativa terapêutica. **Revista Científica UniScientiae**, v. 1, n. 2, 2018.

BIANCHIN, I.; ALVES, R. G. O. Mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*: comportamento e danos em vacas e bezerros Nelore antes da desmama. **Pesq. Vet. Bras.**, v.22, p. 109-113, jul./set. 2002.

BIEGELMEYER, P.; NIZOLI, L. Q.; CARDOSO, F. F.; DIONELLO, N. J. Aspectos da resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Archivos de Zootecnia**, [s. l.], v. 61, n. 237, p. 1–11, 2012.

BILHASSI, T. B. **Estudo do nível de infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça Canchim naturalmente infestados com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2016. 116 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal)–Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, p. 396-398, maio 2007.

BLOMEN, V. A.; BOONSTRA, J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 1, p. 27–44, 2011.

BORGES, F. A.; ALMEIDA, G.D.; HECKLER, R. P.; LEMES, R. T.; ONIZUKA, M. K. V.; BORGES, D. G. L. Anthelmintic resistance impacto on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves. **Trop. Anim. Health Prod.**, v.45, p. 723-727, 2013.

BOWMAN, D. D. **GeorgisParasitologiaVeterinária**. Tradução Adriana PittellaSudré. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

BRÄUTIGAM, K.; CRONK, Q. DNA Methylation and the Evolution of Developmental Complexity in Plants. **DNA Methylation and Development**, v. 9, n. 1447, p. 1-14, out. 2018.

BRITO, L. G.; BORJA, G. E. M.; OLIVEIRA, M. C. S.; NETTO, F. G. S. **Mosca-dos-chifres: aspectos bio-ecológicos, importância econômica, interações parasito-hospedeiro e controle**. Porto Velho: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. (Comunicado Técnico, 302).

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S161–S176, 2004.

BURNS, E. C.; WILSON, B. H. Field resistance of horn flies to the organic phosphate insecticide ronnel. **Journal of Economic Entomology**, v. 56, n. 5, 1963.

BURROW, H. M.; SEIFERT, G. W.; HETZEL, D. J. S. Consequences of selection for weaning weight in Zebu, *Bos taurus* and Zebu · *Bos taurus* cattle in the tropics. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 42, p. 295–307, 1991.

CAMPOS, C. P.; SOUZA, G. D. P.; TOLEDO, E. A.; LOT, R. F. E. Métodos de controle químico da mosca-dos-chifres. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. 1–8, 2008.

CARREIRA, J. P. B. **Parâmetros genéticos para resistência aos carrapatos, helmintos gastrointestinais e *Eimeriaspp.* e perspectivas do uso de seleção em bovinos da raça Nelore**. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

CLARK, W. G. Kinins and the peripheral and central nervous systems. In: HANDBOOK of Experimental Pharmacology. v. 25. [S.l.: s.n.], 1979. p. 311-356.

COSTA, A. J.; OLIVEIRA, G. P.; ARANTES, T. P.; BORGES, F. A.; MENDONÇA, R. P.; SANTANA, L. F.; SAKAMOTO, C. A. M. Avaliação comparativa da ação anti-helmíntica e do desenvolvimento ponderal de bezerros tratados com diferentes avermectinas de longa ação. **A Hora Veterinária**, v.24, n.139, p.31-34, 2004.

COSTA, E. G. L.; CARNEIRO, J. C.; BASTOS, G. A.; VASCONCELOS, V. de O.; SOUZA, R. M. De; ALMEIDA, A. C. De; DUARTE, E. R. Controle de *Haematobia irritans* no Semiárido de Minas Gerais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 01–10, 2016.

COSTA, E.B. O.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 125, 2013.

COSTA, F.F. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. **Gene**, v. 410, n.1, p. 9-17, fev. 2008.

DELGADO, F. E. F.; LIMA, W.S.; CUNHA, A. P.; BELLO, A. C. P. P.; DOMINGUES, L. N.; WANDERLEY, R. P. B.; LEITE, P. V. B.; LEITE, R. C. Vermínoses dos

bovinos: percepção de pecuaristas em Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 29–33, 2009.

FACHIOLLI, D. F.; SAES, I. L.; DELLAQUA, J. V. T.; SOUSA, O. A.; PINTO, L. D.; SANTI, P. F.; YAMADA, P. H.; TARDIVO, R.; AMARANTE, A. F. T.; SOUTELLO, R.V.G. Anthelmintic treatment and supplementation in Nellore calves performance in the post-weaning period. **Semina: Ciências Agrárias**, v.38, n.3, p.1551-1560, 2017.

FANTAPPIE, M. Epigenética e memória celular. **Revista Carbono**, n. 3, 2013.

FARIAS, N. A.; LOPES RUAS, J.; BETTIN DOS SANTOS, T. R. Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato *Boophilus microplus*, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p.1700-1704, 2008.

FIEL, C. A.; FERNÁNDEZ, A. S.; RODRÍGUEZ, E. M.; FUSÉ, L. A.; STEFFAN, P. E. Observations on the free-living stages of cattle gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 187, n. 1–2, p. 217–226, 2012.

FILHO, W. V. V.; SENO, M. C. Z.; BASSO, F. C.; ALMEIDA, F. A. De. Population dynamics of the horn fly (*Haematobia irritans*) on Guzera cattle breed and crossbred in Selvíria, MS. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 157–162, 2010.

FINGERMAN, I. M.; ZHANG, X.; RATZAT, W.; HUSAIN, N.; COHEN, R. F.; SCHULER, G. D. NCBI Epigenomics: What's new for 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D221–D225, 2013.

FRAGA, A. B.; ALENCAR, M. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J.N.S.G. [UNESP]. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 1578-1586, 2003.

FREIRE, J. J. Arseno e cloro resistência e emprego de tiofosfato de dietilparanitrofenila (Parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Boletim da Diretoria de Produção Animal**, v.9, n.17, p. 3-21, 1953.

FREITAS, D. R. J.; POHL, P. C.; VAZ JUNIOR, I. S. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. **Acta Scientia e Veterinaria**, v. 33, n. 2, p. 109-117, 2005.

FURLONG, J. Diagnosis of the susceptibility of the cattle tick, *Boophilus microplus*, to acaricides in Minas Gerais state, Brazil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, 4., 1999, Puerto Vallarta, México. **Proceedings** [...]. Puerto Vallarta: CONASAG, 1999. p. 41–46.

GASBARRE, L. C.; LEIGHTON, E. A.; SONSTEGARD, T. Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 98, p. 51–64, jul. 2001.

GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 635–638, 2007.

GOMES, A. **Carrapato-de-boi: prejuízos e controle**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000. Disponível em:

<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/325246>. Acesso em: 8 set. 2019.

GOMES, L. V. C. **Dinâmica populacional de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) em bovinos mestiços mantidos em pastagens de *Brachiariadecumbens* no município de Formiga, Minas Gerais**. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

GRAEF, J.; CLAEREBOU, E.; GELDHOF, P. Anthelmintic resistance of gastrointestinal cattle nematodes. **Vlaams Diergeneesk Tijdschr.** v. 82, p. 113–123, 2013.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S.; GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

GUGLIELMONE, A. A.; CASTELLI, M. E.; VOLPOGNI, M. M.; MEDUS, P. D.; MARTINS, J. R.; SUÁREZ, V. H.; ANZIANI, O. S.; MANGOLD, A. J. Toxicity of cypermethrin and diazinon to *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in its American southern range. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 67–73, 2001.

GUIMARÃES, M. P. **Desenvolvimento das helmintoses gastrintestinais em bovino de corte em pastagem no cerrado**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, p. 81, 1977.

GUIMARÃES, M. P.; RIBEIRO, M. F. B.; FACURI-FILHO, E. J.; LIMA, W. S. Strategic control of gastrointestinal nematodes in dairy calves in Florestal, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 24, n. 1, p. 31-38, 2000.

HARVEY, T. L.; BRETHOUR, J. R.; BROCE, A. B. Loss in Effectiveness of Insecticide Ear Tags for Horn Fly (Diptera: Muscidae) Control. **Journal of the Kansas Entomological Society**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 715–717, 1984.

HEINZEN, E. L.; PEIXOTO, E. C. T. M.; JARDIM, J. G.; GARCIA, R. C.; OLIVEIRA, N. T. E.; ORSI, R. O. Extrato de própolis no controle de helmintoses em bezerros. **Acta Veterinaria Brasilica**, p. 40–44, 2012.

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R.; HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 163–171, 2016.

HONER, M.R.; BIANCHIN, I.; GOMES, A. **Mosca-dos-chifres**: histórico, biologia e controle. Campos Grande, MS: Embrapa, CNPGC, 1990. (Embrapa – CNPGC. Documentos, 45).

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**. 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>. Acesso em: 26 ago. 2019.

JANER, E. C.; SCHUMAKER, T. T. S.; KLAFKE, G. M.; RIFRAN, L.; GONZÁLEZ, P.; NIELL, C.; NAMINDOME, A.; GIL, A.; PIAGGIO, J.; MARTINS, J. R.; MENDES, M. C.; MILLER, R. J. **Garapata**: resistencia a Fipronil e Ivermectina en rodeos vacunos de Uruguay y Brasil. Montevideo - Uruguay: Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA (Eleonor Castro Janer), 2012. 69 p.

JONES, A.L.; SUNG, S. Mechanisms underlying epigenetic regulation in *Arabidopsis thaliana*. **Inegr Comp Biol**, v.54, n.1, p.61-67, 2014.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1–10, 2006.

JORGE, M. A.; ROSA, C.; SANTOS, G. D. Impacto econômico da mosca dos chifres em bovinos de corte. **Revista Peccege**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 27–39, 2016.

KAPLAN, R.M.; VIDYASHANKAR, A.N. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 70-78, mai. 2012.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. **Carrapato, tristeza parasitaria e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande: EMBRAPA - CNPGC, 1998.

KLAFKE, G. M.; SABATINI, G. A.; ALBUQUERQUE, T. A. de; MARTINS, J. R.; KEMP, D. H.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. T. S. Larval Immersion Tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 386-390, Dec. 2006.

LASELY, J. F. Genetics of livestock improvement. prentice hall inc. **Englewood cliff, New Jersey**, v. 7932, p. 492, 1978.

LI, R. W.; CHOUDHARY, R. K.; CAPUCO, A. V.; URBAN JR, J. F. Exploring the host transcriptome for mechanisms underlying protective immunity and resistance to nematode infections in ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 1-11, nov. 2012.

LIEB, J. D.; BECK, S.; BULYK, M. L.; FARNHAM, P.; HATTORI, N.; HENIKOFF, S.; LIU, X. S.; OKUMURA, K.; SHIOTA, K.; USHIJIMA, T.; GREALLY, J. M. Applying whole-genome studies of epigenetic regulation to study human disease. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 114, n. 1, p. 1–15, 2006.

LIMA, L. G. F.; PRADO, Â. P.; PERRI, S. H. V. Localização preferencial e índices diferenciados de infestação da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) em bovinos da raça Nelore. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 25–32, 2002.

LIMA, W. S. Seasonal infection pattern of gastrointestinal nematodes of beef cattle in Minas Gerais State – Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 203–214, 1998.

LIMA, W. S.; GUIMARÃES, M. P.; LEITE, A. C. R. Custo benefício de diferentes dosificações anti-helmínticas em relação ao ganho de peso de bezerros de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n. 11, p. 1333–1335, 1985.

LIMA, W.S.Os inimigos ocultos da Pecuária. **DBO: Saúde Animal**, v. 816, 2004.

MACIEL, W.; LOPES, W. D. Z.; CRUZ, B.; TEIXEIRA, W.; FELIPPELLI, G.; SAKAMOTO, C. A.; FÁVERO, F. C.; BUZZULINI, C.; SOARES, V.; GOMES, L. V.; BICHUETTE, M.; COSTA, A. J. Da. Effects of *Haematobia irritans* infestation on weight gain of Nelore calves assessed with different antiparasitic treatment schemes. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 118, n. 1, p. 182–186, 2015.

MARTINS, T.; OCHOU, O. G.; VAISSAYRE, M.; FOURNIER, D. Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hubner) to triazophos in West Africa. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 883–887, Sept. 2003.

MENDONÇA, R. M. A.; LEITE, R. C.; LANA, A. M. Q.; COSTA, J. O.; TOTH, G. Parasitic helminth infection in young cattle raised on silvopasture and open-pasture in Southeastern Brazil. **Agroforestry Systems**, v. 88, n. 1, p. 53–62, 2014.

MORAES, C. V. **Investigação da ocorrência de eventos epigenéticos em *Haemonchus contortus* e sua relação com a resistência ao anti-helmíntico monopantel**. 2019. 109 f. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular)–Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

NEVES, J. H.; COSTA, R. L. D.; MARINI, A.; SOUTELLO, R. V. G.; BARRETO, T. N. Performance of heifers from different genetic groups without anthelmintic treatment. **Veterinária e Zootecnia**, v. 23, n. 4, p. 688–695, 2016.

NICIURA, S. C. M.; MORAES, C. V.; CRUVINEL, G. G.; GAINZA, Y. A.; ALBUQUERQUE, A. C. A. De; SANTANA, R. C. M.; THOLON, P.; TIZIOTO, P. C.; CHAGAS, A. C. S.; ESTEVES, S. N.; BENAVIDES, M. V.; AMARANTE, A. F. T. Do. **Análise genômica da resistência ao monepantel e investigação epigenética em *Haemonchus contortus***. 1. ed. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2018. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 43).

OLIVEIRA, A.; AZEVEDO, H.; AZEVEDO, C.; MELO, C.; ANTÔNIO; BARROS, A. T. Suscetibilidade da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) a inseticidas nos tabuleiros costeiros de Alagoas, Bahia e Sergipe. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 65–70, 2006.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*Dermatobia hominis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 127–135, 1990.

OLIVEIRA, M. C. S.; ALENCAR, M. M.; CHAGAS, A. C. S.; BERALDO, M. C. D.; GIGLIOTI, R. **Estudo da resistência aos ectoparasitas e aos nematódeos gastrintestinais em bovinos da raça Nelore e cruzados**. 1. ed. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2012. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 32).

OLIVEIRA, M. C. S.; ALENCAR, M. M.; CHAGAS, A. C. S.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H. N. Gastrointestinal nematode infection in beef cattle of different genetic groups in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 3, p. 249–254, 2009.

OLIVEIRA, M. C. S.; ALENCAR, M. M.; GIGLIOTI, R.; BERALDO, M. C. D.; ANÍBAL, F. F.; CORREIA, R. O.; BOSCHINI, L.; CHAGAS, A. C. S.; BILHASSI, T. B.; OLIVEIRA, H. N. Resistance of beef cattle of two genetic groups to ectoparasites and gastrointestinal nematodes in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 1, p. 168–175, 2013.

OLIVEIRA, P. A.; RUAS, J. L.; RIET-CORREA, F.; COELHO, A. C. B.; SANTOS, B. L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E. S. V.; SCHILD, A. L.; OLIVEIRA, P. A.; RUAS, J. L.; RIET-CORREA, F.; COELHO, A. C. B.; SANTOS, B. L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E. S. V.; SCHILD, A. L. Doenças parasitárias em bovinos e ovinos no sul do Brasil: frequência e estimativa de perdas econômicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 8, p. 797–801, 2017.

PACHECO, T. M. **Avaliação do desempenho e características relacionadas ao grau de infecção por helmintos de bovinos da raça nelore**. 2015. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena, Universidade Estadual Paulista, Dracena. 2015.

PAIVA, F.; SATO, M.Q.; ACUÑA, A.H.; JENSEN, J.R.; BRESSAN, M.C.R.V. Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. **A Hora Veterinária**, v.20, n.120, p.29-32, 2001.

PASSAFARO, T. L.; CARRERA, J. P. B.; SANTOS, L. L.; RAIDAN, F. S. S.; SANTOS, D. C. C.; CARDOSO, E. P.; LEITE, R. C.; TORAL, F. L. B. Genetic analysis of resistance to ticks, gastrointestinal nematodes and *Eimeria* spp. in Nelore cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 3, p. 224–234, 2015.

PEREIRA, A., B.; LEITE, R. C.; BIANCHIN, I. Verminose Dos Bovinos. **Gestão Pecuária**, São Paulo, v. 31, p. 26-34, 2004.

PINHEIRO, A.C.; ECHEVARRIA, F.A.M. Susceptibilidade de *Haemonchusspp* em bovinos ao tratamento anti-helmíntico com albendazole e oxfendazole. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.10, n.1/2, p.19-21, 1990.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature biotechnology**, v. 18; n. 10, p. 1057-68, out. 2010.

PORTEN, S.P. Epigenetic Alterations in Bladder Cancer. **Curr. Urol. Rep.**, v. 19, p. 102, 2018.

PRAYAGA, K. C.; CORBET, N. J.; JOHNSTON, D. J.; WOLCOTT, M. L.; FORDYCE, G.; BURROW, H. M. Genetics of adaptive traits in heifers and their relationship to growth, pubertal and carcass traits in two tropical beef cattle genotypes. **Animal Production Science**, v. 49, n. 6, p. 413–425, 2009.

RANGEL, V.B.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R.; SANTOS Jr, E.J. Resistência de *Cooperia* spp e *Haemonchus* spp as avermectinas em bovinos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.186- 190, 2005.

REIS, A. P. Epigenética da asma: revisão. **Brazilian Journal Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 13–18, 2015.

RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. VI. Resistance of cattle to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 3, p. 532–550, 1962.

ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, P. D. Percepção dos produtores de leite do município de Passos, MG, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), 2001. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.36, n.4, p.1235-1242, jul./ago. 2006.

SALGADO, J.A.; SANTOS, C.P. Over view of Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n.1, p. 3-17, mar. 2016.

SANTOS, P.R.; BAPTISTA, A.; LEAL, L.; MOLETTA, J.; ROCHA, R. Nematódeos gastrintestinais de bovinos – Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v.14, n.24, p. 1-15, jan. 2015.

SANTOS, V. T. Avaliação dos prejuízos causados pelas helmintoses em bovinos de criação extensiva em zona rural da depressão central. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v. 3, n. 1, 1973.

SEQUEIRA, T.C.G.O.; AMARANTE, A.F.T. **Parasitologia animal**: animais de produção. 1 ed. Rio de Janeiro: Publicações Biométricas LTDA – EPUB, 2001. 158 p. Helminologia, p. 75-114.

SHEPPARD, C. Stirofos resistance in a population of horn flies. **Journal of the Georgia Entomological Society**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 370–376, 1983.

SHYMA, K. P.; GUPTA, J. P.; SINGH, V. Breeding strategies for tick resistance in tropical cattle: a sustainable approach for tick control. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 39, n. 1, p. 1–6, 2015.

SILVA, A.M.; ALENCAR, M.M.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.7, p.1477-1482, 2010a.

SILVA, J. J.; CARVALHO, D. M. G.; GOMES, R. A. B.; RODRIGUES, A. B. C. Produção de leite de animais criados em pastos no Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 26–36, 2010b.

SILVA, L. V.; RUE, M. L. D.; GRAÇA, D. L. Lesions of the horn fly (*Haematobia irritans* Linnaeus, 1758) on the bovine skin and their impact in leather industry). **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 1039–1043, 2002.

SONSTERGARD, T. S., GASBARRE, L.C. Genomic tools to improve parasite resistance. **Veterinar Parasitology**, v.101, p. 387-403, nov. 2001.

SOUSA, I. L. **Adenosina quitinase regula a metilação do DNA de genes envolvidos no neurodesenvolvimento**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Médias, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

SOUTELLO, R. V. G. ; BELLO, H. J. S.; GONÇALVES, J. A.; SANCHEZ, C. A.; PIROLA, J. V. F.; TEIZEIRA, G. S. Resistência anti-helmíntica em bovinos, ovinos e equinos criados no Brasil. *In*: POLYCARPO, G. V.; BILLER, J. D.; FERRARI, S.; ROSAS, F. S.; MEMBRIVE, C. M. B.; VIANA, R. da S.; TOMAZ, R. S. (Eds.). **IMAST 2018 - Atualidades nas ciências agrárias: mudanças, tendências e impactos**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2018.

SOUTELLO, R. V. G. **Influência do parasitismo e da suplementação no desenvolvimento ponderal de novilhos mestiços Angus-Nelore e da raça Guzará**. 2001. 61 f. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção Animal) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2001.

SOUTELLO, R. V. G.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3/4, p. 360-364, 2007.

SOUZA, A. P.; RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; SCHELBAUER, C. A. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1363-1367, ago. 2008.

STEELMAN, C. D.; BROWN JUNIOR, A. H.; GBUR, E. E.; TOLLEY, G. Interactive response of the horn fly (Diptera: Muscidae) and selected breeds of beef cattle. **J. Econ. Entomol.**, v. 84, p.1275-1282, 1991.

STOTZER, E. S.; LOPES, L. B.; ECKSTEIN, C.; MORAES, M. C. M. M.; RODRIGUES, D. S.; BASTIANETTO, E. Impacto econômico das doenças parasitárias na pecuária. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 3, p. 198-221–221, 2014.

STROMBERG, B. E.; GASBARRE, L. C.; WAITE, A.; BECHTOL, D. T.; BROWN, M. S.; ROBINSON, N. A.; OLSON, E. J.; NEWCOMB, H. *Cooperia punctata*: Effect on cattle productivity? **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 183, n. 3, p. 284–291, 2012.

SUAREZ, V. H.; BUSETTI, M. R.; LORENZO, R. M. Comparative effects of nematode infection on *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred calves grazing on Argentina's Western Pampas. **Veterinary Parasitology**, v. 58, n. 3, p. 263–271, 1995.

SYKES, A. R.; COOP, R. L. Effects of Parasitism on Host Metabolism. In: The management and Disease Control of Sheep. **British Council and Commonwealth Agricultural Bureaux**, p. 345–57, 1979.

SYKES, A. R. Manipulating host immunity to improve nematode parasite control: Quo vadit. **Parasite Immunology**, v. 30, p. 71–77, 2008.

TCHURIKOV, N. Molecular mechanisms of epigenetics. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 4, p. 406–423, abr. 2005.

TIZARD, I. R., **Imunologia veterinária**. 5. ed. São Paulo: Elsevier, 2008. 587 p.

TIZARD, I.R. **Introducción a la inmunología Veterinaria**. 8. ed. Barcelona: Elsevier Saunders, 2009.

TSAI H, BAYLIN S. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. **Cell Res.**, v. 21, p. 502–517, mar. 2011.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokyo, Japan: Japan International Cooperation Agency, 1998.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.; JENNINGS, F. **Parasitologia Veterinária: Helmintologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 223 p.

UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H.; KERR, J. D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, n. 4, p. 885–895, 1978.

VALÉRIO, J. R.; GUIMARÃES, J. H. Sobre a ocorrência de uma nova praga, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae), no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 417–418, 1982.

VENTURINI, T.; MENEZES, L. F. G. Parasitismo na bovinocultura de corte. In: PAULUS, Dalva; PARIS, Wagner. (org.) **Técnicas de manejo agropecuário sustentável**. 23. ed. Curitiba, PR: Ed. UTFPR, 2016. p. 117–138.

VERÍSSIMO, C. J. **Controle de carrapatos nas pastagens**. 2. ed. rev. e ampl. ed. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2015. 106 p.

WALLER, P. J. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. **Animal Feed Science and Technology: Feed and Animal Health.**, v. 126, n. 3, p. 277–289, 2006.

WIKEL, S. K. Host Immunity to Ticks. **Annual Review of Entomology**, v. 41, n. 1, p. 1–22, 1996.

YANG, X.; HAN, H.; DE CARVALHO, D. D.; LAY, F. D.; JONES, P. A.; LIANG, G. Gene Body Methylation Can Alter Gene Expression and Is a Therapeutic Target in Cancer. **Cancer Cell**, v. 26, n. 4, p. 577–590, 2014.

## **CAPÍTULO 2 - Metilação global genômica relacionada à resistência parasitária em bovinos**

## METILAÇÃO GLOBAL GENÔMICA RELACIONADA À RESISTÊNCIA PARASITÁRIA EM BOVINOS

**Resumo** - O objetivo do trabalho foi caracterizar um rebanho de 72 novilhas  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore, identificando os animais resistentes, resilientes e suscetíveis a endo e ectoparasitas, correlacionando a metilação global do DNA desses animais e o grau de parasitismo, que foi avaliado a partir da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), moscas-dos-chifres e carrapatos. Essas contagens foram submetidas a análise de variância (ANOVA) para agrupamento em resistentes, resilientes e suscetíveis pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) no programa SISVAR e agrupamento hierárquico no programa GENES. O conteúdo de metilação foi analisado a partir do DNA extraído do sangue das novilhas, por meio de kit de metilação, e a quantificação feita por leitora de microplacas. Os valores absolutos médios de absorbância dos três grupos foram submetidos à ANOVA e análises pelo Tukey ( $p < 0,05$ ). Observou-se 36,11% de animais resistentes, 52,78% resilientes e 11,11% suscetíveis a infecção por helmintos gastrintestinais, com contagens de 86, 392 e 1087 OPG, e 0,238, 0,225 e 0,197 do DNA metilado, respectivamente. Para a infestação por carrapatos, 26,39% dos animais foram classificados como resistentes, 59,72% resilientes e 13,98% suscetíveis, com contagens de 3, 8 e 19 carrapatos e 0,295, 0,216 e 0,151 do DNA metilado, respectivamente. E para a infestação por mosca-dos-chifres observou-se 54,17% de novilhas resistentes e 45,83% suscetíveis, com contagens de 17 e 32 moscas e 0,245 e 0,205 do DNA metilado, respectivamente. Na classificação pelo programa GENES, 33,33% dos animais foram classificados como resistentes, 51,39% como resilientes e 15,28% como suscetíveis a parasitas, com contagens de: 307, 205 e 988 OPG; 3, 10,4 e 10,2 carrapatos; 19, 26 e 24 moscas; e 0,247, 0,227 e 0,185 do DNA metilado. Observou-se uma ligação entre a resistência à parasitas e o conteúdo da metilação do DNA nas duas classificações. Assim, as metodologias utilizadas possibilitaram a identificação das 72 novilhas quanto ao grau de infecção por helmintos gastrintestinais e infestação por carrapatos e mosca-dos-chifres, sendo possível relacionar o grau de resistência dos bovinos à parasitas com a quantidade de metilação global do DNA.

**Palavras chave:** Angus; epigenética; helmintos; mosca-dos-chifres; carrapato

## GENOMIC GLOBAL METHYLATION RELATED TO PARASITIC RESISTANCE IN CATTLE

**Abstract-** The objective of the work was to characterize a herd of 72 heifers  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore, identifying the resistant, resilient and susceptible animals to endo and ectoparasites, correlating the overall DNA methylation of these animals and the degree of parasitism, which was evaluated from the egg count per gram of feces, horn flies and ticks. These counts were submitted to analysis of variance ANOVA for grouping in resistant, resilient and susceptible by the Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ) in SISVAR and hierarchical grouping in the GENES program. The methylation content was analyzed from the DNA extracted from the blood of the heifers, using a methylation kit and quantification by a microplate reader. The mean absolute values of absorbance of the three groups were submitted to ANOVA and analysis by Tukey ( $p < 0.05$ ). There were 36.11% of resistant animals, 52.78% resilient and 11.11% susceptible to gastrointestinal helminth infection, with counts of 86, 392 and 1087 OPG, and 0.238, 0.225 and 0.197 of methylated DNA, respectively. For tick infestation, 26.39% of the animals were classified as resistant, 59.72% resilient and 13.98% susceptible, with counts of 3, 8 and 19 ticks and 0.295, 0.216 and 0.151 of methylated DNA, respectively. And for the horn fly infestation, 54.17% of resistant and 45.83% susceptible heifers were observed, with counts of 17 and 32 flies and 0.245 and 0.205 of methylated DNA, respectively. In the second classification, 33.33% of the animals were classified as resistant, 51.39% as resilient and 15.28% as susceptible to parasites, with counts of: 307, 205 and 988 OPG; 3, 10.4 and 10.2 ticks; 19, 26 and 24 flies; and 0.247, 0.227 and 0.185 of methylated DNA. A link was observed between resistance to parasites and the content of DNA methylation in the two classifications. Thus, the methodologies used enabled the identification of 72 heifers as to the degree of infection by gastrointestinal helminths and infestation by ticks and horn flies, making it possible to relate the degree of resistance of cattle to parasites with the amount of overall DNA methylation..

**Keywords:** Angus x Nelore; epigenetics; helminths; flies; ticks.

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias são uma das principais causas da redução de produtividade dos ruminantes (OLIVEIRA *et al.*, 2017) e representam um impacto negativo em potencial para a atividade pecuária (STOTZER *et al.*, 2014), sendo os ectoparasitas (*Rhipicephalus microplus* e *Haematobia irritans*) e endoparasitas (helmintos gastrintestinais) as principais parasitoses (VENTURINI; MENEZES, 2016).

Os helmintos gastrintestinais causam alterações metabólicas que podem prejudicar o desempenho do hospedeiro (SYKES; COOP, 1979) e estão intimamente relacionados a redução do bem-estar e desenvolvimento dos animais afetados (RAMOS, 2019). Soutello *et al.* (2002) estimaram perdas de 30 a 70kg por ano em bovinos não tratados com anti-helmínticos, e Grisi *et al.* (2014) estimam que as perdas econômicas devido a esses parasitas chegam a US\$7.107,97 milhões.

Quanto aos ectoparasitas, a mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) e o carrapato bovino (*Rhipicephalus microplus*) são os mais importantes para a pecuária no Brasil (SILVA *et al.*, 2010). Ambos são parasitas hematófagos (VENTURINI; MENEZES, 2016) que causam lesões cutâneas, estresse e podem transmitir patógenos (SILVA; RUE; GRAÇA, 2002; JORGE; ROSA; SANTOS, 2016; HIGA *et al.*, 2016), levando a perdas econômicas de US\$2.558,32 (GRISI *et al.*, 2014) e US\$22 a 30 bilhões (LEW-TABOR; RODRIGUEZ VALLE, 2016), respectivamente. Portanto, o controle dessas parasitoses, tanto de endo como de ecto parasitas, é muito importante para o sucesso da atividade pecuária no país.

O uso de antiparasitários (anti-helmínticos, acaricidas e inseticidas) é a forma predominante de controlar as infecções por helmintos e infestações por carrapatos e moscas (SOUTELLO *et al.*, 2018; BRAGA *et al.*, 2019; BRITO *et al.*, 2019). Contudo, o uso indiscriminado e frequente de uma mesma base farmacológica leva ao aparecimento da resistência nas populações de parasitas (BASTOS *et al.*, 2018), além dos custos e da contaminação no ambiente e de produtos de origem animal (OLIVEIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2018). Dessa forma, a busca por alternativas no controle dessas parasitoses é de extrema importância, como o uso de animais resistentes a helmintos, carrapatos e moscas.

A resistência é definida como a habilidade de suprimir o estabelecimento e/ou desenvolvimento da infecção causada pelos parasitas (UTECH; WHARTON; KERR, 1978; SUAREZ; BUSETTI; LORENZO, 1995; GASBARRE; LEIGHTON; SONSTERGERD, 2001), sendo os mecanismos envolvidos nesse processo complexos e ainda pouco compreendidos (BIEGELMEYER *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2015). Sabe-se que a resistência depende de uma grande quantidade de anticorpos, citocinas, células e genes (TIZARD, 2009) e que é uma característica herdável (GASBARRE; LEIGHTON; SONSTEGARD, 2001; FRAGA *et al.*, 2003; SHYMA; GUPTA; SINGH, 2015).

No entanto, além da genética há também a epigenética, definida como o estudo de todas as vias moleculares que modulam a expressão dos genes para resultarem em um determinado fenótipo (RIVAS; TEIXEIRA; KREPISCHI, 2019), sendo as alterações epigenéticas herdáveis e reversíveis (BLOMEN; BLOONTRA, 2011; ARAÚJO, 2015).

A metilação do DNA é um dos mecanismos mais estudados e consiste na adição de um radical metil (-CH<sub>3</sub>) (NICIURA *et al.*, 2018) na posição carbono-5 do anel pirimídico de uma citosina (MORAES, 2019), transformando-a em 5-metilcitosina (5mC) por meio das enzimas DNA-metiltransferases (DNMT) (RIVAS; TEIXEIRA; KREPISCHI, 2019). Normalmente essa metilação ocorre nas ilhas CpG, que são sequências de DNA que possuem uma densidade muito mais alta de bases citosinas e guaninas (PAIVA *et al.*, 2019), sendo que a localização que o mecanismo ocorre no gene influencia o controle de sua expressão, podendo ser silenciado, ativado ou superexpresso (FANTAPPIE, 2013; REIS, 2015; RIVAS; TEIXEIRA; KREPISCHI, 2019). Além da expressão gênica, a metilação também participa da estabilidade cromossômica e funciona como um sinal epigenético de memória transmitido durante a replicação do DNA (BLOMEN; BLOONSTRA, 2011).

Tendo em vista a importância do controle dos parasitas em bovinos, se faz necessário a busca por alternativas como o uso de animais resistentes aos mesmos e o estudo da diversidade genética do genoma do hospedeiro. Dessa forma, as pesquisas sobre mecanismos epigenéticos podem ser utilizadas como uma ferramenta para a identificação e possível seleção de animais resistentes, não

havendo ainda estudos nesta área que correlacionem o teor de metilação do DNA de bovinos e o parasitismo.

## **2 OBJETIVO**

Diante o exposto, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar um rebanho de 72 novilhas  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore, identificando os animais resistentes, resilientes e suscetíveis a endo e ectoparasitas, relacionando a metilação global do DNA desses animais e o grau de parasitismo, avaliado durante o período de um ano, sem tratamento antiparasitário.

Tendo como objetivos específicos:

- Avaliar o grau de parasitismo, individualmente, de cada animal a partir dos dados obtidos em avaliações, no período de um ano, sem tratamento antiparasitário, por meio da quantificação de ovos de helmintos gastrintestinais por gramas de fezes (OPG), carrapatos e mosca-dos-chifres;
- Realizar e analisar a determinação quantitativa da metilação global do DNA das 72 novilhas e a relação entre o DNA metilado e os grupos de animais conforme o grau de parasitismo a endo e ectoparasitas.
- Verificar a viabilidade da técnica utilizada para sua aplicação em análises futuras em seleção de genes candidatos à resistência parasitária dos animais.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado de acordo com os parâmetros éticos para experimentação em animais do Comitê de Ética e Bem-Estar animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Unesp de Dracena (FCAT/UNESP), aprovado sobre registro 13/2017.

Foram utilizadas 72 novilhas  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore, nascidas no mesmo mês, oriundas de um mesmo rebanho homogêneo de vacas nelores inseminadas artificialmente em tempo fixo (IATF), utilizando sêmen de um único touro. Os animais apenas receberam tratamento antiparasitário dois meses antes do início das

avaliações, com Levamisol 18,8% (Ripercol®, Zoetis) na dose de 4,7 mg/kg de peso corporal para o controle de helmintos gastrintestinais e cipermitrina (7mg/kg, Colosso®, Ourofino), aplicada na linha dorsal, para o controle de ectoparasitas, e depois permaneceram sem tratamento antiparasitário por um ano.

As avaliações das novilhas foram realizadas na Agência Paulista de Tecnologia – APTA de Andradina (20° 53' 46" de latitude sul, 51° 22' 46" de longitude oeste e 405 m de altitude), parceria feita pela Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP (Câmpus de Dracena), durante o período de maio de 2017 a abril de 2018. O clima predominante na região é o Aw e se caracteriza como tropical chuvoso com inverno seco (KÖPPEN; GEIGER, 1928).

Avaliou-se o grau de parasitismo dos animais por meio de coletas de fezes, contagem de moscas-dos-chifres e carrapatos, realizadas a cada 28 dias. As fezes foram coletadas diretamente do reto dos animais para a realização de exames coprológicos, no Laboratório de Parasitologia e Sanidade Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, por meio da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) utilizando-se câmara de McMaster (GORDON; WHITLOCK, 1939). Também foi realizado cultivo das fezes e extração das larvas pelo método de Roberts e O'Sullivan (1950) para posterior identificação dos gêneros presentes pela chave de Keith (1953).

Para a contagem das moscas-dos-chifres, as novilhas foram conduzidas ao curral e a quantificação realizada sobre a região cervico-dorso-lombar das mesmas, nos períodos mais amenos do dia (de manhã), seguindo a técnica proposta por Almeida *et al.* (2005). E para avaliação de carrapatos, foram quantificadas as teleóginas com tamanho igual ou superior a 4,5mm, em um dos lados do animal, sendo os dados coletados multiplicados por dois, de acordo com a técnica de Wharton e Utech (1970).

A coleta de sangue foi realizada individualmente, utilizando agulhas e seringas descartáveis previamente identificadas. Foram coletados 5ml de sangue por flebotomia diretamente da veia jugular para posterior extração do DNA dos animais e análise de metilação. Após a coleta, o material foi acondicionado em geladeira de transporte (Mini Fridge) a 4°C até chegar ao laboratório de Parasitologia e Sanidade Animal (FCAT), sendo armazenado em freezer (-20°C).

### 3.1 Classificação dos Animais Mediante o Grau de Parasitismo

A distribuição das contagens de OPG, carrapato e mosca-dos-chifres foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk por meio do programa SISVAR 5.4 (FERREIRA, 2014) e os dados transformados em  $\sqrt[2]{n + 0,5}$ , em que o n é a contagem de OPG, carrapato ou mosca-dos-chifres do animal. A transformação em  $\sqrt[2]{n + 0,5}$  foi utilizada uma vez que as variáveis se tratam de contagens, anulando assim a interferência de valores iguais ou menores a zero na análise estatística.

A partir dos dados obtidos de contagens de OPG, carrapatos e moscas-dos-chifres, em delineamento inteiramente casualizado, contendo 72 tratamentos e 11 repetições referentes à cada coleta, as médias de cada variável foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e posterior análise estatística de agrupamento pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, pelo programa computacional SISVAR versão 5.4 (FERREIRA, 2014), já que o procedimento Scott e Knott (1974) utiliza o teste da razão de verossimilhança para agrupar n tratamentos em k grupos.

Assim, os animais do rebanho foram, de acordo com o grau de parasitismo, agrupados em três grupos, sendo eles, resistentes, resilientes e suscetíveis. Após a classificação, a contagem média dos animais de cada grupo também foi submetida a análise de variância (ANOVA), sendo considerado três tratamentos (classificação de acordo com a resistência) e 72 repetições (cada animal sendo considerado uma repetição), e posterior análise estatística pelo programa computacional SISVAR 5.4 (FERREIRA, 2014), pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Um segundo agrupamento foi realizado por meio do programa GENES, e posteriormente feito um dendrograma pelo método de aglomeração hierárquica (método de Ward) das 72 novilhas considerando as três variáveis simultaneamente (contagem de OPG, carrapatos e mosca-dos-chifres). Para isso utilizou-se distâncias genéticas calculadas pelo método de Mahalanobis, pois determina a semelhança entre duas variáveis multidimensionais (PORTILLO; MENDONZA, 2008). Dessa forma, os animais foram classificados também em três grupos: resistentes, resilientes e suscetíveis, e as contagens médias das três variáveis foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e posterior análise estatística pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, pelo programa SISVAR 5.4 (FERREIRA, 2014).

## 3.2 Metilação do DNA

### 3.2.1 Extração do DNA

A extração de DNA total genômico foi realizada por meio do *EasyPureBlood® GenomicDNA Kit* (Transgen). Foi adicionado 250µL de sangue, 20µL de proteinase K e 500µL de BB3 (*Binding Buffer3*) em um tubo de microcentrifuga, sendo misturado por 15 segundos e, em seguida, incubado em temperatura ambiente por 10 minutos.

Após o preparo do material, o tubo foi brevemente centrifugado, sendo o lisado transferido para uma coluna de centrifugação, a 12.000xg durante um minuto com descarte do sobrenadante. Ao final da centrifugação foi adicionado 500µL de CB3 (*Clean Buffer3*) e o material foi novamente centrifugado a 12.000xg durante 30 segundos, também com descarte de sobrenadante. Na etapa seguinte, que ocorreu duas vezes, foi adicionado 500µL de WB3 (*Wash Buffer 3*), e novamente o material foi centrifugado a 12.000xg durante 30 segundos, descartando o sobrenadante. Ao final, a coluna foi centrifugada a velocidade de 12 000xg durante 2 minutos para remoção do WB3 residual.

Posteriormente, a coluna de centrifugação foi colocada em um tubo de microcentrifuga (eppendorf) de 1,5mL e adicionou-se 100µL de Tampão de Eluição à matriz da coluna. Após essa etapa, o material foi centrifugado a 12.000xg por um minuto para eluir o DNA genômico isolado. Esse DNA eluído foi armazenado a -20°C.

A quantificação e a qualidade das amostras foram realizadas com o espectrofotômetro (NanoDrop2000 – ThermoScientific), sendo medido a absorbância de cada amostra em contraste com uma amostra de tampão, nos comprimentos de onda de 260 e 280nm (SAMBROOK *et al.*, 1989). A razão entre 1,8 e 2,0 é considerada ideal, sendo que valores inferiores a 1,8 indicam excesso de proteínas e valores superiores a 2,0 indica excesso de solventes orgânicos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

### 3.2.2 Metilação global

A análise da metilação foi realizada por meio do *Imprint DNA MethylationQuantificationkit* (Sigma), usando tiras com poços pré tratados com reagente ligante de DNA metilado, e utilizando anticorpo de captura sensível a metilação do DNA e um anticorpo de detecção, permitindo a detecção colorimétrica da quantidade relativa de metilação do DNA em relação ao controle positivo, que apresenta um DNA 100% metilado.

Em cada poço da placa do kit utilizou-se 180ng de DNA diluídos de cada animal para um total de 30µL em solução fixadora de DNA metilado (*BindingSolution*). Para o controle negativo utilizou-se água ultrapura e para o controle positivo, DNA 100% metilado fornecido no kit. Após 60 minutos de incubação a 37°C foi adicionado 150µL de solução bloqueadora (*BlockSolution*) e os poços foram incubados por mais 30 minutos a mesma temperatura. Ao final, as soluções, juntamente com o DNA, foram removidas e cada poço foi lavado três vezes com solução de lavagem diluída com água ultrapura (*Wash Buffer 10x*) para 1X.

Cada poço então, recebeu 50µl de anticorpo de captura, diluído em uma concentração de 1:1000, ficando incubados por 60 minutos a temperatura ambiente (25°C). Após a incubação, o anticorpo de captura foi removido, cada poço foi lavado com 150µl de solução de lavagem diluída, por quatro vezes, e adicionou-se 50µl de anticorpo de detecção, diluído em uma concentração de 1:1000, incubando-se novamente à temperatura ambiente, por 30 minutos em ambiente escuro. Após esse período o anticorpo de detecção foi removido, e cada poço lavado, novamente por cinco vezes. Posteriormente, no escuro, cada poço recebeu 100µl de solução reveladora, ficando incubado por 1-10 minutos, antes de adicionar 50µl da solução de parada (*Stop solution*).

A absorbância da solução contida nos poços, ou seja, a leitura dos valores, foi realizada em um comprimento de onda de 450nm em uma leitora de microplacas DR-200BS-NM-BI, sendo a fórmula utilizada para obtenção dos valores absolutos: (A450 Amostra - A450 Branco).

Para a análise de metilação global, em delineamento inteiramente casualizado, foram utilizados os valores de absorbância corrigidos individualmente

para cada animal, anteriormente classificados de acordo com os três grupos definidos conforme o grau de parasitismo.

### 3.2.3 Análise estatística

As médias das diferenças de metilação global dos DNAs entre os animais foram transformadas em  $\sqrt[2]{n + 0,5}$  e foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA), pelo programa computacional SISVAR, versão 5.4 (FERREIRA, 2014), a fim de se verificar a significância estatística entre os diferentes valores dos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis a helmintos gastrintestinais, carrapatos e mosca-dos-chifres pelo teste Tukey a 95% de confiabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentadas as médias das contagens de ovos por grama de fezes (OPG), o conteúdo de metilação global do DNA (valor absoluto de absorbância) e a quantidade de animais por grupo das 72 novilhas classificadas em resistentes, resilientes e suscetíveis.

**Tabela 1** - Média de ovos por grama de fezes (OPG), conteúdo de metilação global do DNA (valor absoluto de absorbância) e quantidade de animais por grupo (N) das novilhas, distribuídas nos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis.

| <b>Classificação</b> | <b>N</b> | <b>OPG</b> | <b>Metilação do DNA</b> |
|----------------------|----------|------------|-------------------------|
| <b>Resistentes</b>   | 26       | 86 a       | 0,238                   |
| <b>Resilientes</b>   | 38       | 392 b      | 0,225                   |
| <b>Suscetíveis</b>   | 8        | 1087 c     | 0,197                   |
| <b>Média</b>         |          | 359        | 0,227                   |
| <b>CV (%)</b>        |          | 15,19      | 9,32                    |
| <b>p-valor</b>       |          | <0,001     | 0,468                   |

Letras distintas na coluna apotam significância pelo teste Tukey (p<0,05) entre os grupos. Fonte: Elaborado pela autora.

Observou-se diferença significativa (p<0,001) entre os animais dos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis a infecções por helmintos, que apresentaram

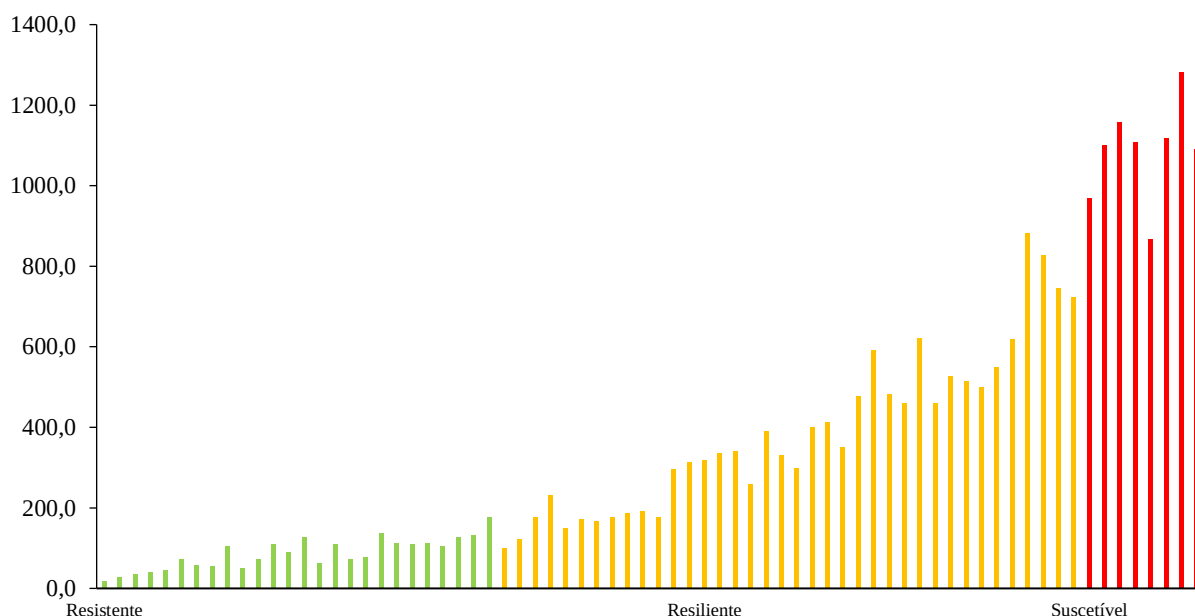
contagens médias típicas das infecções por nematódeos gastrintestinais, de acordo com o padrão proposto por Ueno e Gonçalves (1998), que consideram contagens médias menores que 200 OPG como grau leve de infecção, entre 200 e 700 OPG como grau moderado e acima de 700 OPG como grau alto de infecção. Pode-se observar também que a contagem média de OPG dos animais resistentes ficou próxima do observado na literatura para animais da raça Nelore, como relatado por Bricarello *et al.* (2007), que observaram contagens de OPG inferiores a 50 para animais resistentes. Já a contagem dos animais suscetíveis foi maior da encontrado pelos autores, que relataram contagens superiores a 400 OPG para animais sensíveis a helmintos gastrintestinais.

Essa variação pode ocorrer tanto pela influência das variações ambientais no desenvolvimento, sobrevivência, distribuição e migração larval dos nematódeos gastrintestinais (STRONGBERG, 1997; OLIVEIRA *et al.* (2009), como pela própria genética de cada animal (PASSAFARO *et al.*, 2015).

A contagem média geral de OPG (359) para as 72 novilhas (Tabela 1) foi próxima da encontrada por Soutello *et al.* (2001a), na mesma região, para novilhos, relatando contagem média de 314 OPG nos animais não suplementados e sem tratamento anti-helmíntico. Já Oliveira *et al.* (2009) relataram contagem média de 85 OPG para animais do mesmo grupo genético ( $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore). Essa diferença pode estar relacionada com genética (LEIGHTON; MURRELL; GASBARRE, 1989) e com o desafio proporcionado pelo ambiente e condições climáticas (PIMENTEL NETO; FONSECA, 2002; ARAUJO; LIMA, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009), ou seja, as diferenças do local de estudo. Os gêneros de helmintos encontrados por meio das coproculturas para as 72 novilhas estudadas apresentaram maior prevalência de *Haemonchus* spp. (44,47%) e *Cooperia* spp. (30,17%), seguidos de *Oesophagostomum* spp. (15,5%) e *Trichostrongylus* spp. (9,86%).

A partir dos resultados obtidos, observou-se que 26 novilhas foram classificadas como resistentes, 38 como resilientes e 8 como suscetíveis a helmintos gastrintestinais, havendo diferença significativa entre a contagem média de OPG individual das mesmas (Figura 1). Dessa forma, a proporção de animais resistentes, resilientes e suscetíveis dentro do rebanho estudado foi de 36,11%, 52,78% e 11,11%, respectivamente, sendo a maior parcela constituída de animais resilientes.

**Figura 1** - Contagem média individual de ovos por grama de fezes (OPG) das 72 novilhas classificadas nos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis.

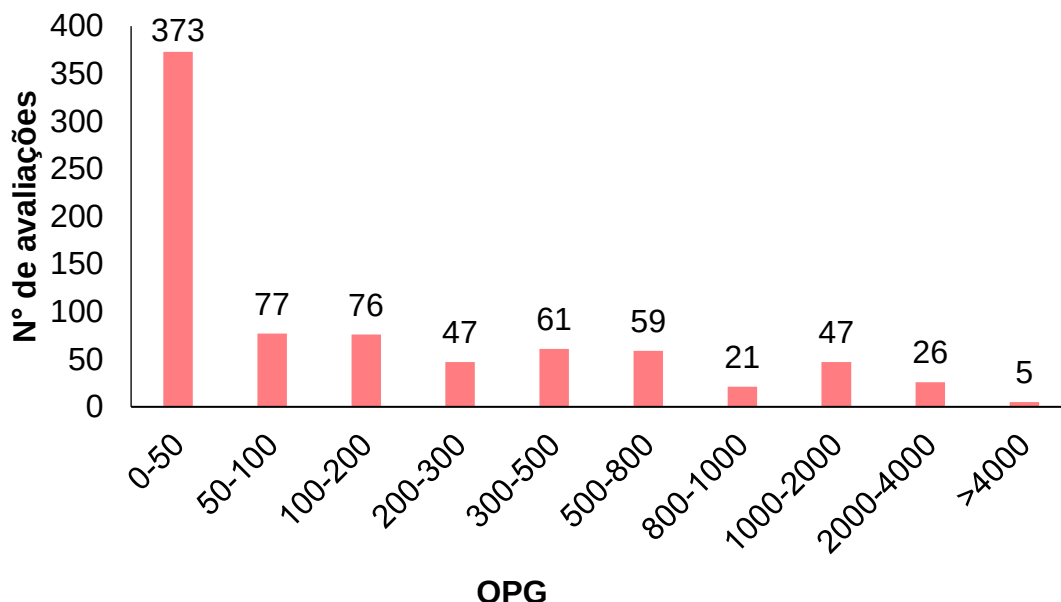


Fonte: Elaborado pela autora.

A classificação de animais em relação ao nível de suscetibilidade à parasitas é encontrada na literatura descrevendo uma proporcionalidade de animais resistentes, resilientes e suscetíveis, como exemplo a sugerida por Gasbarre, Leighton e Sonstergard (2001) de acordo com o grau de infecção por helmintos gastrintestinais (25% resistentes, 50% resilientes e 25% suscetíveis, aproximadamente). Dessa forma, a distribuição do rebanho no presente estudo ficou próxima da proporcionalidade relatada por Gasbarre, Leighton e Sonstergard (2001).

A Figura 2 mostra a distribuição da frequência da contagem de OPG das 72 novilhas. Observa-se que a maioria das avaliações (47%) apresentaram uma baixa contagem de OPG (0-50). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos avaliando as diferenças na resistência/susceptibilidade de bovinos  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore e com maior grau de sangue taurino ( $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{4}$  Canchim x  $\frac{1}{4}$  Nelore), respectivamente, sendo observado que a maioria dos exames apresentaram contagens fecais de 0 a 100 OPG (OLIVEIRA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

**Figura 2** - Distribuição da frequência das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) nas 72 novilhas, durante todo o período de avaliação.



Fonte: Elaborado pela autora.

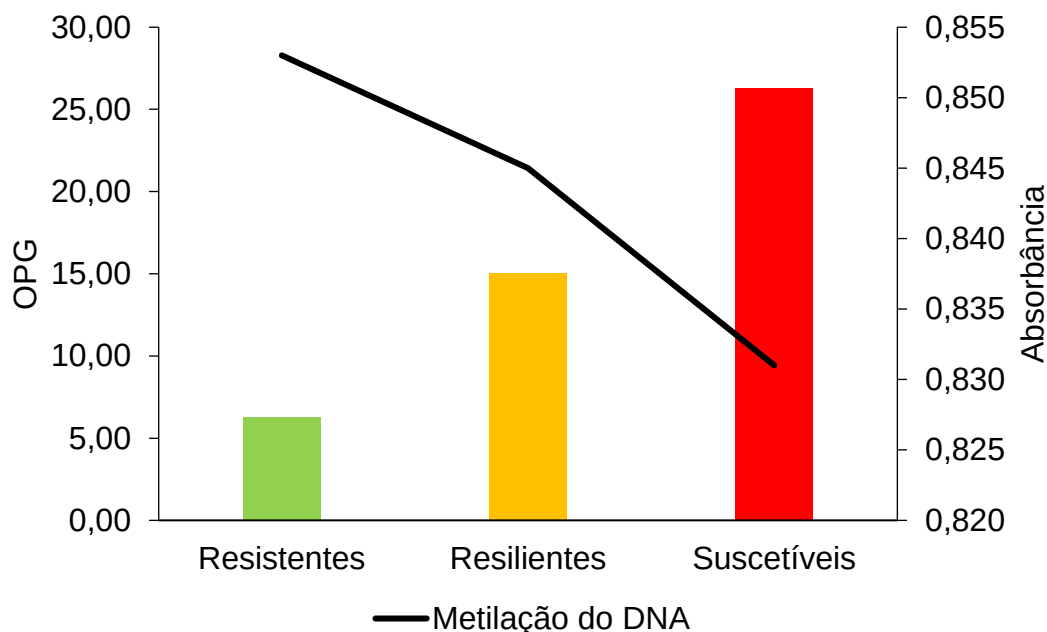
Como consequência desse fato, devido a maior parte dos animais apresentarem carga parasitaria baixa durante o período experimental, pode ocorrer menor contaminação das pastagens por larvas infectantes (BARGER, 1989; BISHOP; STEAR, 1999) o que diminui a exposição dos animais aos parasitas e possibilita melhor produtividade.

Apesar de ter sido verificada diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre as médias de OPG (Tabela 1) para as categorias estudadas, pode-se verificar que os grupos dos suscetíveis apresentaram a maior quantidade de animais com altas contagens de OPG (>4000 OPG), porém apresentaram também animais com contagens mais baixas (800 – 1000 OPG), sendo essas ainda consideradas por Ueno e Gonçalves (1998) como alto grau de infecção.

A Figura 3 apresenta as contagens médias de OPG e o conteúdo de metilação global do DNA dos grupos de animais resistentes, resilientes e suscetíveis dentro do rebanho estudado. Os valores reais podem ser observados na Tabela 1, sendo as contagens de OPG dos três grupos de 86 OPG, 392 OPG e 1087 OPG,

respectivamente), e os valores absolutos da absorvância de 0,238, 0,225 e 0,197, respectivamente.

**Figura 3** - Contagem média de ovos por grama de fezes (OPG) e conteúdo de metilação global do DNA dos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis (valores transformados).



Fonte: Elaborado pela autora.

Não foi observado diferença significativa entre os conteúdos de metilação global dos três grupos ( $p=0,486$ ) (Tabela 1), contudo fica nítido a ligação entre as contagens médias de OPG e as quantificações de DNA metilado dos animais, com o grupo dos animais resistentes apresentando maior quantidade de DNA metilado e os suscetíveis com menor quantidade. O grupo dos animais resilientes apresentaram uma quantidade intermediária de DNA metilado.

Na Tabela 2 são apresentadas as médias das contagens de carrapatos, o conteúdo de metilação global do DNA (valor absoluto de absorvância) e a quantidade de animais por grupo das 72 novilhas classificadas em resistentes, resilientes e suscetíveis.

**Tabela 2** - Média de carrapatos (*Rhipicephalus microplus*), conteúdo de metilação global do DNA (valor absoluto de absorbência) e quantidade de animais por grupo (N) das novilhas, distribuídas nos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis.

| <b>Classificação</b> | <b>N</b> | <b>Carrapatos</b> | <b>Metilação do DNA</b> |
|----------------------|----------|-------------------|-------------------------|
| <b>Resistentes</b>   | 19       | 3 a               | 0,295 a                 |
| <b>Resilientes</b>   | 43       | 8 b               | 0,216 b                 |
| <b>Suscetíveis</b>   | 10       | 19 c              | 0,151 c                 |
| <b>Média</b>         |          | 8                 | 0,227                   |
| <b>CV (%)</b>        |          | 9,61              | 8,46                    |
| <b>p-valor</b>       |          | <0,001            | <0,001                  |

Letras distintas na coluna apotam significância pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. Fonte: Elaborado pela autora.

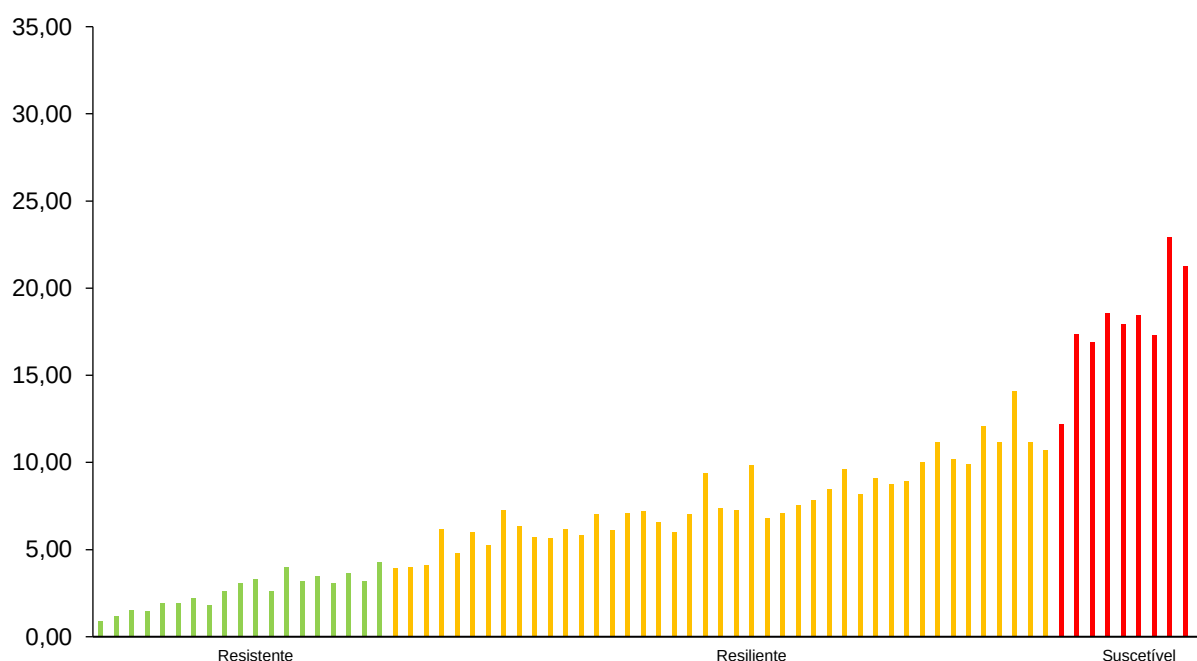
As infestações nas três categorias (Tabela 2) apresentaram diferença significativa entre si ( $p < 0,001$ ). Sabe-se que a resistência de animais mestiços ao carrapato depende do grau de sangue europeu e zebuino presente no cruzamento, quanto maior a porcentagem de sangue europeu, maior a susceptibilidade, e quanto maior a porcentagem de sangue zebuino, maior a resistência ao ectoparasita (LEMOS *et al.*, 1985; SILVA *et al.*, 2010). Lemos *et al.* (1985), analisando os efeitos genéticos sobre a carga de carrapatos de novilhas e vacas de seis graus Holstein Friesian x Guzerá, observaram que novilhas  $\frac{1}{2}$  Holstein Friesian x  $\frac{1}{2}$  Guzerá apresentaram uma média de 71 carrapatos/ animal e as  $\frac{1}{4}$  HolsteinsFriesian x  $\frac{3}{4}$  Guzerá apresentaram uma média de 44 carrapatos/animal.

Entretanto, no presente trabalho, todas as novilhas, incluindo as classificadas como suscetíveis, apresentaram médias de contagens de carrapatos inferior dos trabalhos acima citados, sendo semelhantes ao encontrado por Soutello *et al.* (2001b), que avaliando animais  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore relataram contagens médias de 11 e 16 carrapatos/animal para animais suplementados e não suplementados, respectivamente, e estando também próximas das contagens médias observadas em animais zebuínos ou cruzamentos com maior porcentagem de sangue zebuínos (LEMOS *et al.*, 1985; GOMES *et al.*, 1989; SILVA *et al.*, 2007; IBELLI *et al.*, 2012). Esse fato também pode ser observado comparando a média geral de OPG das 72 novilhas (8 carrapatos/animal) com os dados da literatura (MARINI *et al.*, 2010). Os autores, avaliando a prevalência do *Rhipicephalus microplus* em novilhas de mesmo grupo genético ( $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore) no mesmo local do presente experimento,

encontraram contagens médias de 6,02 carrapatos/animal. A condição climática é outro fator que pode ter influenciado no grau de infestação por carrapatos das novilhas. Segundo Fraga *et al.* (2003), fatores ambientais podem influenciar no número de parasitas infestantes no hospedeiro, pois parte de seus ciclos de vida ocorrem no meio ambiente. A sobrevivência dos carrapatos nas pastagens está relacionada com as condições de temperatura e umidade no microambiente (FURLONG; PRATA, 2005; CANÇADO *et al.*, 2012).

Outros fatores que influenciam a resistência ao carrapato são: o comportamento de autolimpeza (DECASTRO, 1985), que segundo FRAGA *et al.* (2003) é um dos elementos mais importantes da expressão da resistência e pode ser influenciado pela espessura do pelo do animal; a presença de imunoglobulinas específicas (KASHINO *et al.*, 2005); células T (PIPER *et al.*, 2010); e genes relacionados a expressão de queratinas e lipocalinas (KONGSWAN *et al.*, 2010).

**Figura 4** - Contagem média individual de carrapatos (*Rhipicephalus microplus*) das 72 novilhas classificadas nos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis.



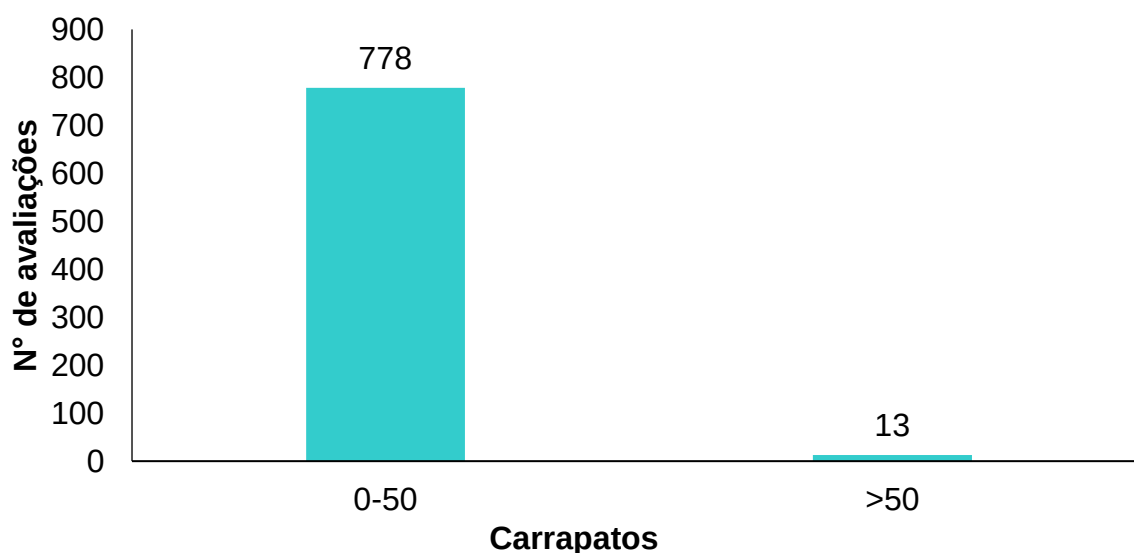
Fonte: Elaborado pela autora.

Observou-se que 19 (26,39%) animais foram identificados como resistentes, 43 (59,72%) como resilientes e 10 (13,89%) animais como suscetíveis (Figura 4),

havendo diferença significativa entre a contagem média individual de carrapatos das novilhas. A literatura apresenta diferentes formas de ranquear bovinos de acordo com a infestação por carrapatos. Labruna e Veríssimo (2001), por exemplo, ranqueiam proporcionalmente 36 bovinos mestiços com relação ao número total de carrapatos contados em cada animal, obtendo três grupos (resistentes, intermediários e sensíveis) com 12 animais cada. Já Silva *et al.* (2007), avaliando o grau de resistência ao carrapato em novilhas de diferentes grupos genéticos, relataram que, do rebanho total de novilhas  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore avaliadas, 87,5% apresentaram-se como resistentes e 12,5% apresentaram-se como resilientes, seguindo os níveis de infestação propostos por Utech *et al.* (1978), que trabalham com porcentagem de recuperação, ou seja, porcentagem de carrapatos contados em relação ao total infestado.

A Figura 5 apresenta a distribuição da frequência da contagem de *Rhipicephalus microplus* (carrapato) das 72 novilhas. Foram realizadas 792 avaliações, sendo observado que 98% das avaliações (778) apresentaram baixas contagens de carrapatos (0-50).

**Figura 5** -Distribuição da frequência das contagens de *Rhipicephalus microplus* nas 72 novilhas  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore, durante todo o período de avaliação.



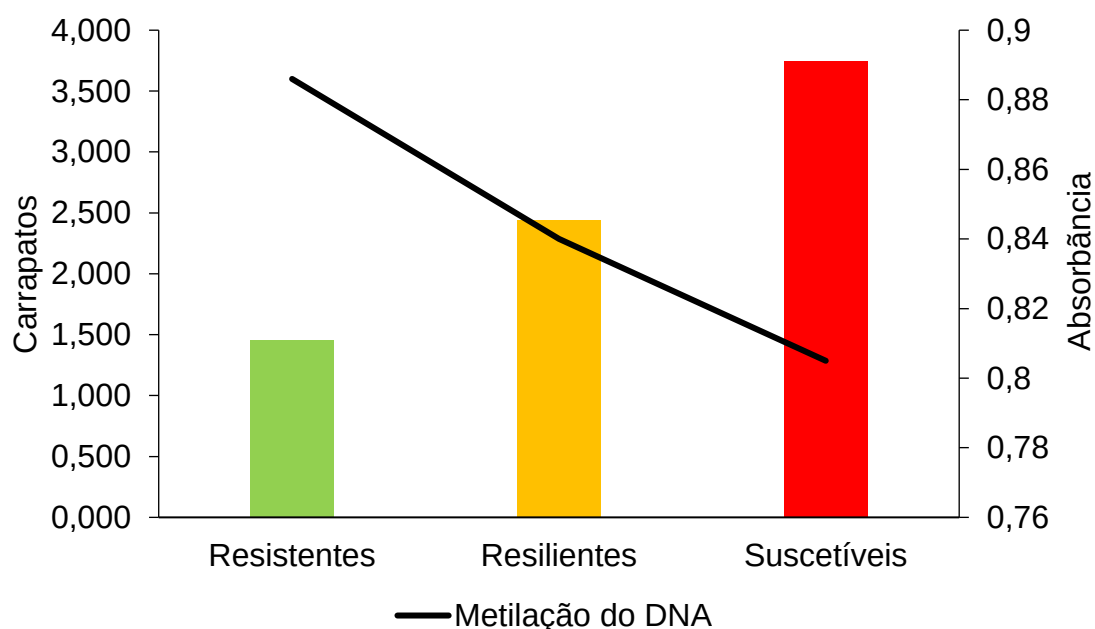
Fonte: Elaborado pela autora.

A distribuição diferiu da observada por Silva *et al.* (2007), que avaliando o grau de resistência ao carrapato em novilhas de diferentes grupos genéticos, observaram que a maioria das novilhas  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore (68,75%) apresentaram cargas de 0 a 100 carrapatos/animal

Contudo, ficaram abaixo do recomendado para tratamento (FURLONG; PRATA, 2005). Segundo os autores, após o tratamento estratégico de um rebanho, poucos animais carregam a maior parte da carga de carrapatos, logo apenas esses animais devem ser tratados quando apresentam populações médias de 25 ou mais fêmeas ingurgitadas em um lado do corpo dos animais.

A Figura 6 apresenta as contagens médias de carrapatos e o conteúdo da metilação global do DNA dos grupos de animais resistentes, resilientes e suscetíveis dentro do rebanho estudado. Os valores reais podem ser observados na Tabela 2, sendo as contagens de carrapatos dos três grupos de 3, 8 e 19 carrapatos/animal, respectivamente, e os valores absolutos de absorbância de 0,295, 0,216 e 0,151, respectivamente.

**Figura 6** -Contagem média de carrapatos e conteúdo de metilação global do DNA dos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis (valores transformados).



Fonte: Elaborado pela autora.

Diferente da infecção por helmintos, foi observado diferença significativa entre os conteúdos de metilação global do DNA dos três grupos ( $p < 0,001$ ), havendo também uma ligação entre as contagens médias de carrapatos e as quantificações de DNA metilado dos animais, com o grupo dos animais resistentes apresentando maior quantidade de DNA metilado e os suscetíveis com menor quantidade. O grupo dos animais resilientes apresentaram uma quantidade intermediária de DNA metilado.

Na Tabela 3 são apresentadas as médias das contagens de mosca-dos-chifres, o conteúdo de metilação global do DNA (valores absolutos de absorbância) e a quantidade de animais por grupo das 72 novilhas classificadas em resistentes e resilientes.

**Tabela 3** - Média de moscas-dos-chifres (*Haematobia irritans*), conteúdo de metilação global do DNA (valores absolutos de absorbância) e quantidade de animais por grupo (N) das novilhas, distribuídas nos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis.

| <b>Classificação</b> | <b>N</b> | <b>Mosca dos chifres</b> | <b>Metilação do DNA</b> |
|----------------------|----------|--------------------------|-------------------------|
| <b>Resistentes</b>   | 39       | 17 a                     | 0,245                   |
| <b>Resilientes</b>   | 33       | 32 b                     | 0,205                   |
| <b>Média</b>         |          | 23                       | 0,227                   |
| <b>CV (%)</b>        |          | 9,55                     | 11,15                   |
| <b>p-valor</b>       |          | <0,001                   | 0,213                   |

Letras distintas na coluna apotam significância pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. Fonte: Elaborado pela autora.

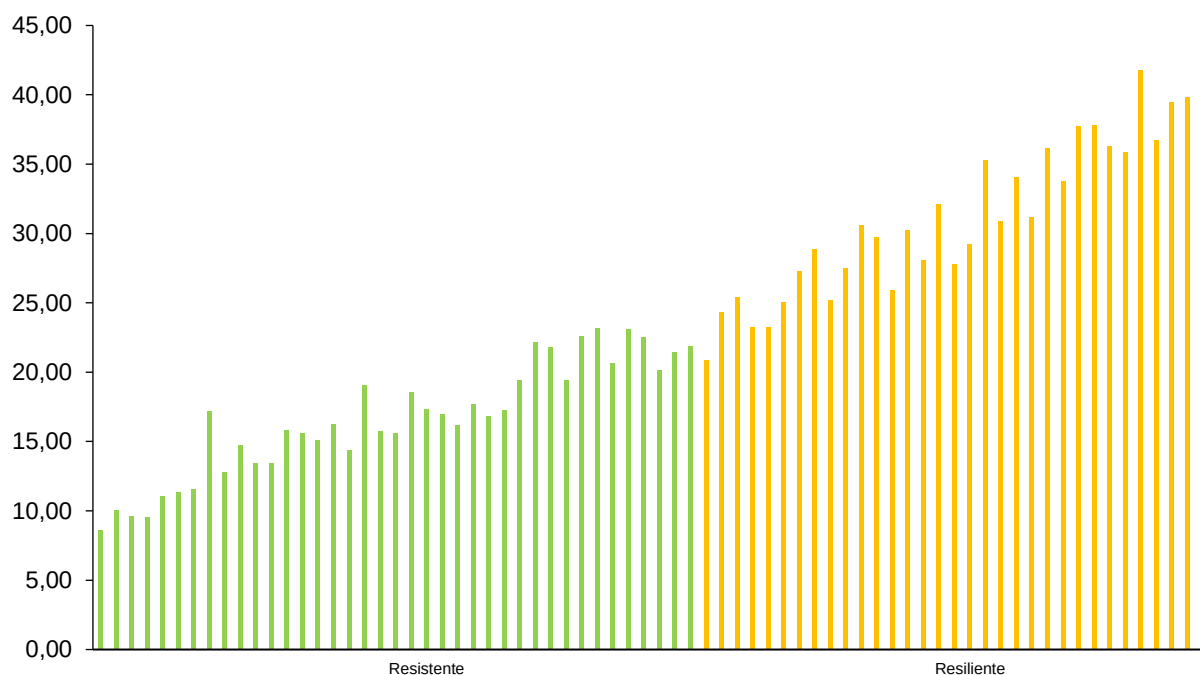
Os níveis de infestação de *Haematobia irritans* do rebanho para as duas categorias (resistentes e resilientes), descritos na Tabela 3, apresentaram diferença significativa entre si ( $p < 0,001$ ) e ambas ficaram dentro do intervalo considerado tolerável, estando abaixo do preconizado por Filho *et al.* (2010), que consideram níveis de infestação entre 50 e 300 moscas/animal como prejudiciais a produção de bovinos, e por Bianchin, Honer e Gomes (1992), que consideram até 200 moscas/animal um nível tolerável de infestação. Segundo Kaufman e Weeks (2012), infestações acima de 200 moscas/animal já provocam perdas econômicas em bovinos de corte.

Na Figura 7 é possível observar que, 39 novilhas (54,17%) foram classificadas como resistentes e apresentaram contagem média menor comparada

com a contagem das 33 novilhas classificadas como resilientes (45,83%), havendo diferença significativa entre os dois grupos. Distribuição distinta foi encontrada por Medeiros *et al.* (2019), que também identificaram animais sensíveis a mosca-dos-chifres por dois métodos (análise descritiva e BLUPs). Os autores relataram que, pelo método de análise descritiva, 16% dos animais foram identificados como resistentes e 10,7% suscetíveis. Já pelo método inferencial, utilizando a análise de previsões não imparciais lineares (BLUPs), observaram que 12% dos animais foram classificados como resistentes e 12% como suscetíveis.

A contagem média geral de *H. irritans* das 72 novilhas foi de 23 moscas/animal, diferindo do encontrado por Neves *et al.* (2016), que avaliando novilhas de diferentes grupos genéticos naturalmente parasitadas na mesma propriedade do presente estudo, observaram que os animais Nelore x Angus apresentaram  $66 \pm 12,46$  moscas/animal e os animais da raça Guzará e Nelore apresentaram contagens de  $24 \pm 4,16$  moscas/animal e  $13 \pm 1,73$  moscas/animal, respectivamente.

**Figura 7** - Contagem média individual de mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) das 72 novilhas classificadas nos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis.

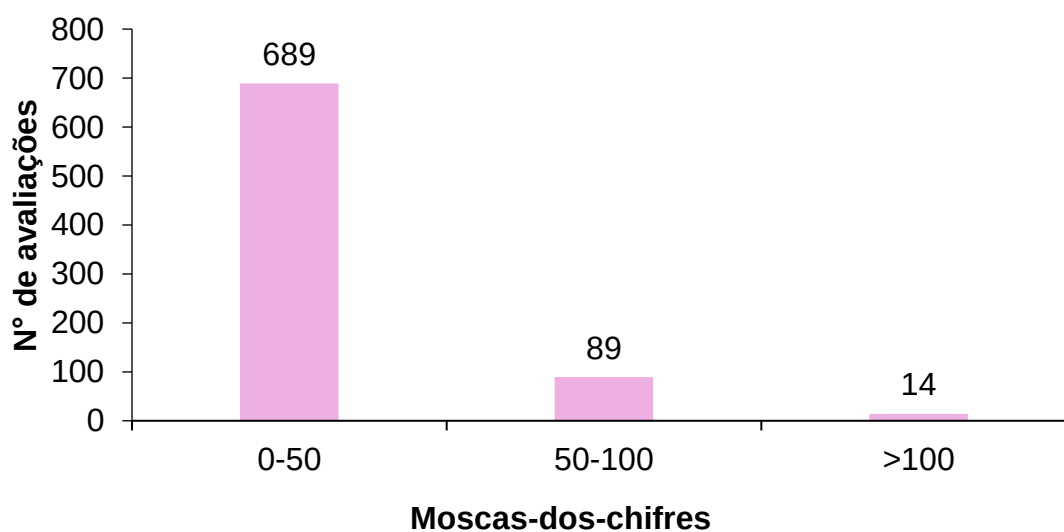


Fonte: Elaborado pela autora.

Dessa forma foi possível observar que a infestação das novilhas do presente estudo ficou mais próxima da infestação observada por Neves *et al.* (2016) para os animais *Bos indicus*. Já Silva *et al.* (2010), avaliando o grau de infestação em bovinos de corte de diferentes grupos genéticos, observaram infestação de *H. irritans* para animais Angus x Nelore de aproximadamente 17 moscas/animal, sendo essa contagem mais próxima e até menor da encontrada para as 72 novilhas avaliadas no presente estudo. Segundo tais autores, as diferenças de clima em locais e períodos diferentes são responsáveis pela variação das infestações por mosca-dos-chifres, principalmente nas diferentes épocas do ano.

A Figura 8 apresenta a frequência da contagem de *Haematobia irritans* das 72 novilhas durante todo o período experimental. Foi possível observar que 87% (689) das avaliações apresentaram contagem entre 0 e 50 moscas/animal, 11% (89 avaliações) ficaram entre 50 e 100, e apenas 2% (14 avaliações) apresentaram contagens acima de 100 moscas/animal. Essa distribuição demonstrou semelhança com a distribuição encontrada por Lima, Prado e Perri(2002) para animais da raça Nelore, que avaliando a ocorrência de diferentes níveis de infestação por mosca-dos-chifres em 60 bovinos observaram que 50% dos animais apresentavam infestações inferiores a 50 moscas/bovino, 38% entre 50 e 100 moscas, 10% entre 100 e 150 moscas e apenas 2% apresentavam mais de 150 moscas/bovino.

**Figura 8** -Distribuição da frequência das contagens de *Haematobia irritans* nas 72 novilhas  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore, durante todo o período de avaliação.

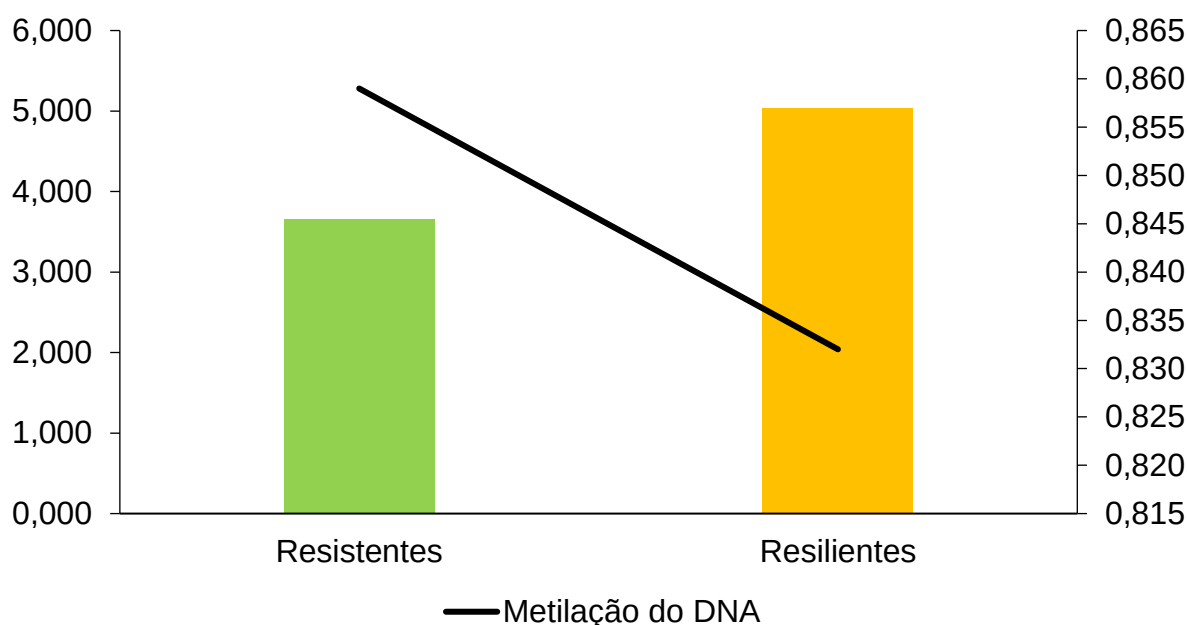


Fonte: Elaborado pela autora.

Vários estudos atribuem essa diferença das infestações às diferentes raças, cor da pelagem, idade e sexo do animal (MORGAN, 1964; SCHREIBER; CAMPBELL, 1986; HONER *et al.*, 1991; STEELMAN *et al.*, 1991; STEELMAN *et al.*, 1996; BIANCHIN; ALVES, 2002). Contudo, os animais cujos dados foram utilizados no presente experimento não apresentavam diferenças de raça, cor da pelagem, idade e sexo, e mesmo assim foram observados diferentes níveis infestações por mosca-dos-chifres. Sendo que outros fatores também podem influenciar a infestação por *Haematobia irritans*, como: as condições climáticas, responsável por 83% da variabilidade do número de moscas no animal (ERNST; KRAFSUR, 1984); e a variação individual de cada animal dentro de uma mesma raça (BIANCHIN; ALVES, 2002), decorrente da variabilidade genética do mesmo.

A Figura 9 apresenta as contagens médias de mosca-dos-chifres e conteúdo de metilação do DNA dos grupos de animais resistentes e resilientes dentro do rebanho estudado. Os valores reais podem ser observados na Tabela 3, sendo as contagens de moscas dos dois grupos de 17 e 31 moscas/animal, respectivamente, e os valores absolutos de absorbância de 0,245 e 0,205, respectivamente.

**Figura 9** -Contagem média de moscas-dos-chifres (*Haematobia irritans*) e conteúdo de metilação global do DNA dos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis (dados transformados).



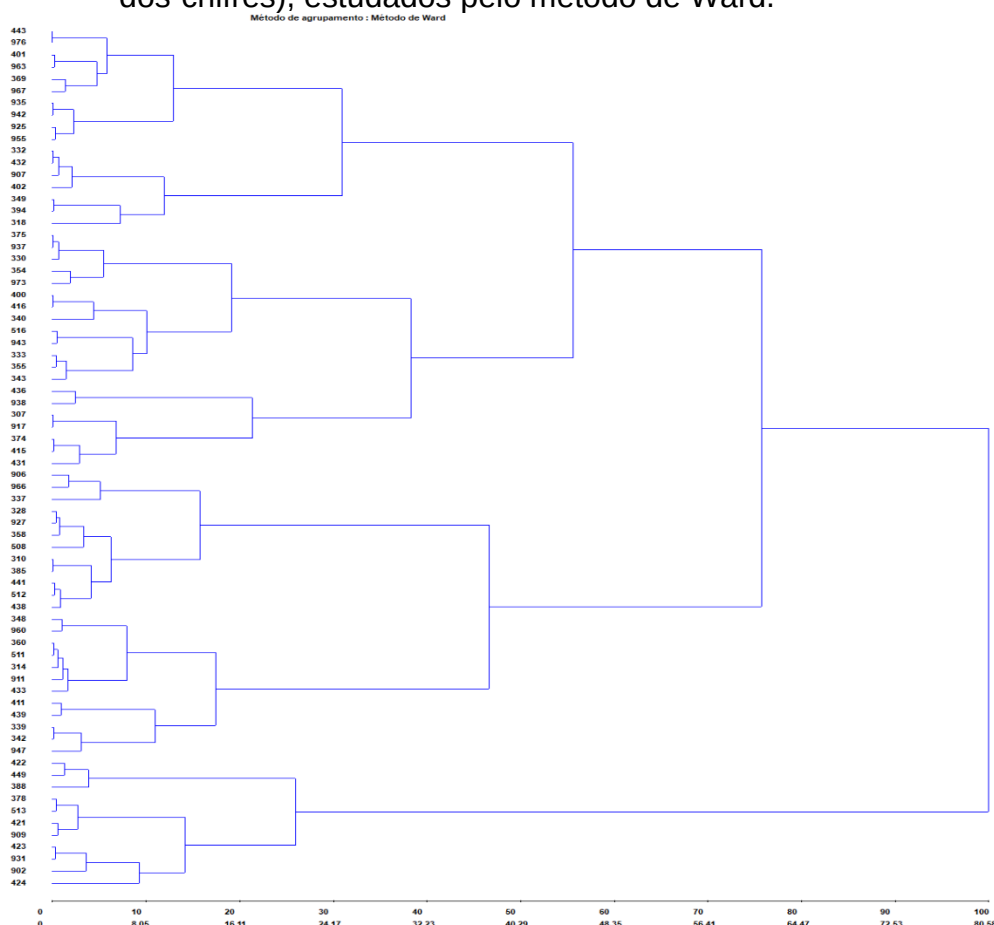
Fonte: Elaborado pela autora.

Não foi observado diferença significativa entre os conteúdos de metilação global do DNA dos dois grupos ( $p=0,213$ ), havendo também uma ligação entre as contagens médias de moscas e as quantificações do DNA metilado dos animais, com o grupo dos animais resistentes apresentando maior quantidade de DNA metilado e resilientes com menor quantidade.

A Figura 10 apresenta a aglomeração hierárquica das 72 novilhas de acordo com a resistência ao parasitismo à helmintos gastrintestinais, carrapatos e moscas-dos-chifres calculadas pelo programa GENES, pelo método de Ward.

Foi possível ranquear as novilhas em três grupos: animais resistentes à parasitas (24 novilhas), resilientes (37 novilhas) e suscetíveis (11 novilhas). Essa distribuição corrobora com a proporcionalidade de 25:50:25 sugerida para contagem de ovos por grama de fezes, na qual a maior parte de um rebanho é constituído de animais resilientes (GASBARRE; LEIGHTON; SONSTERGAR, 2001).

**Figura 10** -Dendrograma do agrupamento das 72 novilhas  $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore baseados em três caracteres (contagem de OPG, carrapatos e mosca-dos-chifres), estudados pelo método de Ward.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para uma população ter as proporcionalidades sugeridas por esses autores, esta deve ter uma distribuição normal, ou seja, estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg (determinado par de alelos com frequências  $p$  e  $q$ , em uma população mendeliana em equilíbrio) (HARDY, 1908; WEINBERG, 1908). No presente trabalho o que se nota é que foi avaliado um lote de animais contemporâneos oriundos de um mesmo rebanho, sendo este apenas um seguimento de uma população. Com o passar das gerações este lote de animais tende a entrar em equilíbrio se tornando uma população com distribuição normal. Dessa forma, a análise estatística utilizada no presente estudo possibilitou uma distribuição de animais nas três categorias (resistentes, resilientes e suscetíveis) de forma fidedigna, visto que as proporções ficaram próximas da literatura e o programa GENES, por meio do método de Ward, realiza uma aglomeração hierárquica em forma de árvore que agrupa “objetos”

(animais) semelhantes, segundo as variáveis estudadas, produzindo uma representação gráfica chamada de dendrograma (SEIDEL *et al.*, 2008).

Na Tabela 4 são apresentadas as médias das contagens de ovos por grama de fezes (OPG), carrapatos, mosca-dos-chifres, o conteúdo de metilação global do DNA (valores absolutos de absorbância) e a quantidade de animais por grupo das 72 novilhas classificadas em resistentes, resilientes e suscetíveis.

**Tabela 4** - Média de contagem de ovos por grama de fezes (OPG), carrapatos (*Rhipicephalus microplus*), moscas-dos-chifres (*Haematobia irritans*), conteúdo de metilação global do DNA e quantidade de animais por grupo (N) das novilhas, distribuídas nos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis.

| <b>Classificação</b> | <b>N</b> | <b>OPG</b> | <b>Carrapato</b> | <b>Moscas</b> | <b>Metilação do DNA</b> |
|----------------------|----------|------------|------------------|---------------|-------------------------|
| <b>Resistentes</b>   | 24       | 307 a      | 3,4 a            | 19 a          | 0,247 a                 |
| <b>Resilientes</b>   | 37       | 205 b      | 10,4 b           | 26 b          | 0,227 ab                |
| <b>Suscetíveis</b>   | 11       | 988 c      | 10,2 b           | 24 b          | 0,185 b                 |
| <b>Média</b>         |          | 359        | 8                | 23            | 0,227                   |
| <b>CV (%)</b>        |          | 23,92      | 19,11            | 14,29         | 63,84                   |
| <b>p-valor</b>       |          | <0,001     | <0,001           | <0,001        | <0,05                   |

Letras distintas na coluna apotam significância pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. Fonte: Elaborado pela autora.

Houve diferença significativa para a contagem média de OPG entre os três grupos ( $p < 0,001$ ), ficando a infecção por helmintos das novilhas ainda próxima dos padrões propostos por Ueno e Gonçalves (1998) e da classificação realizada pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade para a variável separada. Para a contagem de *Rhipicephalus microplus* e *Haematobia irritans*, houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) apenas entre o grupo dos animais resistentes comparado com os resilientes e suscetíveis, que não diferiram significativamente entre si.

A quantificação da metilação global do DNA apresentou diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ) dos animais resistentes e suscetíveis (Tabela 4), logo, também foi possível observar que houve uma ligação entre a resistência parasitária dos animais e o conteúdo de metilação global, com o grupo dos animais resistentes apresentando maior quantidade de DNA metilado, e suscetíveis com menor quantidade de DNA metilado. O grupo dos animais resilientes apresentaram metilação global intermediária, não diferindo significativamente dos demais.

Não há relatos na literatura que relacionem a resistência parasitária de bovinos e a metilação global do DNA. Há um trabalho na área, porém avalia e

investiga os eventos genômicos e a ocorrência de eventos epigenéticos envolvidos na resistência do *Haemonchus contortus* (principal nematódeo gastrointestinal que acomete ovinos) ao anti-helmíntico monepantel (NICIURA *et al.*, 2018). No entanto, é possível relatar estudos sobre a metilação global do DNA e outros mecanismos epigenéticos em bovinos em outras áreas.

Wang *et al.* (2019), trabalhando com vacas leiteiras, relataram correlação significativa entre taxas globais de metilação do DNA no sangue e a produção de leite ou proteína do leite, sendo a taxa de metilação do DNA menor no grupo de animais com alta produção de leite e maior nos animais com baixa produção de leite. Contudo, segundo os autores, há a necessidade de mais estudos para verificar se existem diferentes padrões de metilação do DNA nos diversos tipos de células sanguíneas.

A metilação do DNA, assim como outros mecanismos epigenéticos, é dinâmica, sendo influenciada pelo tipo de célula ou tecido, idade, exposição a estímulos ambientais e inúmeros outros fatores (FINGERMAN *et al.*, 2013). É relatado na literatura que a metilação global do DNA afeta a fertilidade de vacas velhas com média de 141 meses de idade, que apresentam metilação global do DNA menor comparada com vacas jovens (média de 27,4 meses de idade) (GOTO *et al.*, 2011). A influência da metilação na idade também pode ser observada em outros animais. Jin *et al.* (2014) mostram que o nível de metilação do DNA no coração de porcos de meia idade é significativamente menor comparado com porcos jovens. Os autores sugerem que esse resultado possa ser decorrente dos maiores níveis de transcrição de mRNA do DNA metiltransferases 3b, podendo esse fato regular o padrão de metilação genômica de maneira específica em porcos durante o desenvolvimento. Também foi observado a influência da idade na metilação global do DNA em cães (GRYZINSKA *et al.*, 2016).

No presente estudo os resultados não foram influenciados pela variação da idade, pois os animais eram todos jovens contemporâneos nascidos no mesmo mês, filhos do mesmo touro, oriundos de um mesmo rebanho de matrizes, ou seja, as novilhas eram todas meio irmãs. Características que minimizam a influência da variabilidade dos animais em relação aos resultados (WITTENBURG *et al.*, 2016)

Sabe-se que a metilação do DNA é um processo que regula a expressão do gene, sendo a adição de um radical metil (-CH<sub>3</sub>) à uma base nitrogenada (PORTELLA; ESTELLER, 2010), normalmente aos nucleotídeos de DNA cisteína de dinucleotídeos CpGs (GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007), ou seja, em regiões do DNA ricas em nucleotídeos citosina e guaninas, que são agrupados em ilhas na maioria dos genes (REIS, 2015). Essa regulação da expressão gênica ocorre por conta da inibição direta dos fatores de transcrição em sequências específicas do DNA (PAIVA *et al.*, 2019), sendo que a localização que o mecanismo ocorre no gene influencia o controle de sua expressão, podendo ser silenciado, ativado ou superexpresso (FANTAPPIE, 2013; REIS, 2015; RIVAS; TEIXEIRA; KREPISCHI, 2019).

As ilhas CpG possuem papel importante nas regiões promotoras, levando ao silenciamento de diversos genes (inibição da transcrição gênica) quando as ilhas são metiladas, ou ativando as regiões promotoras quando ocorre a desmetilação das ilhas CpG (REIS, 2015). Uma superexpressão do gene também pode ocorrer quando a metilação ocorre nas regiões codificadoras dos genes (éxons) (YANG *et al.* 2014). Osorio *et al.* (2016), trabalhando com vacas leiteiras peripartais suplementadas com metionina, observaram uma menor metilação global do DNA no gene PPARA, que atua no metabolismo de ácidos graxos, consequentemente houve uma regulação positiva para o gene PPARA, ou seja, um aumento da expressão do gene, proporcionando uma melhoria do metabolismo lipídico e função imunológica, portanto uma melhoria na saúde e desempenho pós-parto das vacas. Em outro estudo, Huang *et al.* (2014) analisando regiões diferencialmente metiladas e identificando genes envolvidos no desenvolvimento muscular de bovinos, observaram correlação negativa da expressão gênica com a metilação do DNA nas regiões promotoras. Dessa forma, no presente estudo, há a possibilidade da maior metilação encontrada nos animais resistentes estar ligada a uma superexpressão dos genes da resistência, e a menor metilação nos animais suscetíveis ao silenciamento desses genes.

Tendo em vista a importância e o aumento de estudos voltados a compreensão dos mecanismos epigenéticos e suas relações com o desenvolvimento de bovinos, o presente trabalho é o primeiro a avaliar a correlação

de um mecanismo epigenético (metilação global do DNA) e a resistência de bovinos a helmintos (nematódeos gastrintestinais), *Rhipicephalus microplus* (carrapato bovino) e *Haematobia irritans* (mosca-dos-chifres), considerados os parasitas que causam maior prejuízo na bovinocultura (GRISI *et al.*, 2014).

Os resultados encontrados fornecem informações promissoras sobre a possibilidade da metilação global do DNA no sangue estar ligada com a regulação da expressão de genes envolvidos na resistência de bovinos à parasitas, estimulando assim a realização de estudos futuros sobre o assunto, averiguando de forma mais aprofundada os fatores envolvidos no processo de resistência parasitária.

## 5 CONCLUSÃO

As metodologias utilizadas possibilitaram a identificação dos animais quanto ao grau de infecção por helmintos e infestação por *Rhipicephalus microplus* (carrapato bovino) e *Haematobia irritans* (mosca-dos-chifres).

Foi possível relacionar o grau de resistência de animais a parasitas com a quantidade de metilação global do DNA, sendo estes resultados promissores, incentivando a realização de mais estudos sobre o assunto e aumentando as expectativas sobre os mecanismos epigenéticos se tornarem uma ferramenta para a seleção de bovinos resistentes a parasitas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. A.; BASSO, F. C.; ZOCOLLER-SENO, M. C.; VALÉRIO FILHO, W. V. Dinâmica populacional da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) em bovinos da raça Guzerá e mestiço em Selvíria, MS. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 157–162, 2010.

ARAÚJO, N. B. **Análise do perfil de metilação do DNA em pacientes com câncer de mama**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

BARGER, I. A. Genetic resistance of hosts and its influence on epidemiology. **Veterinary Parasitology**, v. 32, p. 21-35, 1989.

BASTOS, J. A. R.; PINTO, R.; FAUSTO, G. C.; PONTES, K. C. S.; NONATO, I. dos A.; CARVALHO, C. A. De. Tratamento antiparasitário em bovinos com erva de macaé (*Leonurussibiricus*) e pau jacaré (*Piptadeniagonoacantha*): uma alternativa terapêutica. **Revista Científica UniScientiae**, v. 1, n. 2, 2018.

BIANCHIN, I.; ALVES, R. G. O. Mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*: comportamento e danos em vacas e bezerros Nelore antes da desmama. **Pesq. Vet. Bras.**, v.22, p. 109-113, jul./set. 2002.

BIANCHIN, I.; HONER, M.R.; GOMES, A. Controle integrado da mosca-dos-chifres na região centro-oeste. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n. 65, p. 43-46, 1992.

BIEGELMEYER, P.; NIZOLI, L. Q.; CARDOSO, F. F.; DIONELLO, N. J. Aspectos da resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, n. 237, p. 1–11, 2012.

BISHOP, S.C.; STEAR, M.J. Genetic and epidemiological relationships between productivity and disease resistance: gastro-intestinal parasite infection in growing lambs. **Animal Science**, v.69, p. 515-524, 1999.

BLOMEN, V. A.; BOONSTRA, J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 1, p. 27–44, 2011.

BRAGA, A. G. S.; LIMA, R. A.; CELESTINO, C. O.; FACUNDO, V. A. Tick *Rhipicephalus microplus* Canestrini: Biological, morphological and biological activity. **REGET - Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 88–96, 2017.

BRICARELLO, P. A.; ZAROS, L. G.; COUTINHO, L. L.; ROCHA, R. A.; KOOYMAN, F. N. J.; DE VRIES, E.; GONÇALVES, J. R. S.; LIMA, L. G.; PIRES, A. V.; AMARANTE, A. F.T. Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 272-278, 2007.

BRITO, L. G.; BARBIERI, F. S.; ROCHA, R. B.; SANTOS, A. P. L.; SILVA, R. R.; RIBEIRO, E. S.; GUERRERO, F.; FOIL, L.; OLIVEIRA, M. C. S. Pyrethroid and organo phosphate pesticide resistance in Field populations of hornfly in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 33, p. 121-130, 2019.

CANÇADO, P. H. D.; CATTO, J. B.; SOARES, C. O.; MIRANDA, P. A. B.; SOUZA, T. F.; PIRANDA, E. M. Controle parasitário de bovinos de corte em sistemas de integração. In: BUNGENSTAB, D. J. (Ed.). **Sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta: a produção sustentável**: INFOTECA.2. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2012. p. 177–187.

DECASTRO, J. J.; YOUNG, A. S.; DRANSFIELD, R. D.; CUNNINGHAM, M. P.; DOLAN, T.T. Effects of tick infestation on Boran (*Bos indicus*) cattle immunized against theileriosis in an endemic area of Kenya. **Research in Veterinary Science**, v.9, p.279-288,1985.

ERNST, C.M.; KRAFSUR, E.S. Horn fly (Diptera: Muscidae): sampling considerations of host breed and color. **Environmental Entomology**, v. 13, p. 892-894, 1984.

FANTAPPIE, M. Epigenética e memória celular. **Revista Carbono**, n. 3, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, n.2, p. 109-112, mar./abr. 2014.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p. (EMBRAPACENARGEN, Documento, 20).

FILHO, W. V. V.; SENO, M. C. Z.; BASSO, F. C.; ALMEIDA, F. A. Population dynamics of the horn fly (*Haematobia irritans*) on Guzera cattle breed and crossbred in Selvíria, MS. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 157–162, 2010.

FINGERMAN, I. M.; ZHANG, X.; RATZAT, W.; HUSAIN, N.; COHEN, R. F.; SCHULER, G. D. NCBI Epigenomics: What's new for 2013. **Nucleic Acids Research**, v.41, p. D221-D225, 2013.

FRAGA, A. B.; ALENCAR, M. M. ; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G. [UNESP. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 1578–1586, 2003.

FURLONG, J.; PRATA, M. C. A. Conhecimento básico para controle do carrapato-dos-bovinos. In: FURLONG, J. (Ed.). **Carrapato: problemas e soluções**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2005.

GASBARRE, L. C.; LEIGHTON, E. A.; SONSTEGARD, T. Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology: Promotion Advancement, Preserving Tradition**, v. 98, n. 1, p. 51–64, 2001.

GOMES, A.; HONER, M. R.; SCHENK, M. A. M.; CURVO, J. B. E. Populations of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred Nellore, Ibague and Nellore × European crossbreds in the Brazilian savanna. **Tropical Animal Health and Production**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 20–24, 1989.

GORDON, H. McL; WHITLOCK, A. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. **Journal Council Scientific Industry Research**, Australia, v. 12, p. 50-52, 1939.

GOTO, H.; IWATA, H.; TAKEO, S.; NISINOSONO, K.; MURAKAMI, S.; MONJI, Y.; KUWAYAMA, T..Effect of bovine age on the proliferative activity, global DNA methylation, relative telomere length and telomerase activity of granulosa cells. **Zygote**, v.21, n.3, p. 256-264, 2011.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M. ; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P. ; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S.; GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M. ; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P. ; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

GRYZINSKA, M.; JAKUBCZAK, A.; LISTOS, P.; DUDKO, P.; ABRAMOWICZ, K.; JEŻEWSKA-WITKOWSKA, G. Association between body weight and age of dogs and global DNA methylation. **Med. Weter**, v.72, n.1, p.64-67, 2016.

HARDY, G.H. Mendelian proportions in a mixed population. **Science**, v.78, p.49-50, 1908.

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R.; HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 163–171, 2016.

HONER, M. R.; BIANCHIN, I.; GOMES, A. **Mosca-dos-chifres: histórico, biologia e controle**. Campo Grande, MS: EMBRAPA, CNPGC, 1990. (EMBRAPA – CNPGC. Documentos, 45). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/318773/mosca-dos-chifres-historico-biologia-e-controle>. Acesso em: 3 set. 2019.

HUANG, Y.; SUN, J.; LI, C.; WOMACK, J.E. Genome-wide DNA Methylation Profiles and Their Relationships with mRNA and the microRNA Transcriptome in Bovine Muscle Tissue (*Bos taurine*). **Scientific Reports**, v. 4, n.1, p.1-17, out. 2014.

IBELLI, A. M. G.; RIBEIRO, A. R. B.; GIGLIOTI, R.; REGITANO, L. C. A.; ALENCAR, M. M.; CHAGAS, A. C. S.; PAÇO, A. L.; OLIVEIRA, H. N.; DUARTE, J. M. S.; OLIVEIRA, M. C. S. Resistance of cattle of various genetic groups to the tick *Rhipicephalus microplus* and the relationship with coat traits. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 186, n. 3, p. 425–430, 2012.

JIN, L.; JIANG, Z.; XIA, Y.; LOU, P.; CHEN, L. Genome-wide DNA methylation changes in skeletal muscle between young and middle-aged pigs. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 653, 2014.

JORGE, M. A.; ROSA, C.; SANTOS, G. D. Impacto econômico da mosca dos chifres em bovinos de corte. **Revista IPecege**, v. 2, n. 3, p. 27–39, 2016.

KASHINO, S. S.; RESENDE, J.; SACCO, A. M. S.; ROCHA, C.; PROENÇA, L.; CARVALHO, W. A.; FIRMINO, A. A.; QUEIROZ, R.; BENAVIDES, M.; GERSHWIN, L. J.; DE MIRANDA SANTOS, I. K. F. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 1, p. 12–21, 2005.

KAUFMAN, P. E.; WEEKS, E. N. I. **Horn Fly Management**, Gainesville, FL: UF/IFAS Extension, 2012. (ENY288 - Entomologia e Departamento de Entomologia e Nematologia). Disponível em: <https://edis.ifas.ufl.edu/in952>. Acesso em: 13 out. 2019.

KEITH, R. K. The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. **Australian Journal of Zoology**, Victoria, v. 1, n. 2, p. 223-235, 1953.

KÖEPPEN, W. **Climatologia**. México: Fondo de Cultura Económica, 1948. 478 p.

KONGSWAN, K.; JOSH, P.; COLGRAVE, M. L.; BAGNALL, N. H.; GOUGH, J.; BURNS, B.; PEARSON, R. Activation of several key components of the epidermal differentiation pathway in cattle following infestation with the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **International Journal Parasitology**, v. 40, p. 499-50, 2010.

LABRUNA, M. B.; VERISSIMO, C. J. Observações sobre a infestação por *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae) em bovinos mantidos em rotação de pastagem, sob alta densidade animal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 115–120, 2001.

LEIGHTON, E. A.; MURRELL, K. D.; GASBARRE, L. C. Evidence for Genetic Control of Nematode Egg-Shedding Rates in Calves. **The Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 75, n. 4, p. 498–504, 1989.

LEMO, A. M.; TEODORO, R. L.; OLIVEIRA, G. P.; MADALENA, F. E. Comparative performance of six Holstein-Friesian × Guzera grades in Brazil 3. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. **Animal Science**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 187–191, 1985.

LEW-TABOR, A. E.; RODRIGUEZ VALLE, M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. **Ticks Tick Borne Dis.**, v. 7, p. 573–585, 2016.

LIMA, L. G. F.; PRADO, Â. P.; PERRI, S. H. V. Localização preferencial e índices diferenciados de infestação da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) em bovinos da raça Nelore. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 25–32, 2002.

MARINI, A.; SOUTELLO, R. V. G.; COSTA, R. L. D.; NEVES, J. H.; VACARI, A. C.; BARRETO, T. N.; JUNIOR, S. M.; DEMARCHI, J. J. A. de A. Infestação por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em novilhas de diferentes grupos genéticos. **Boletim de Indústria Animal**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 65–71, 2010.

MEDEIROS, M. A.; BARROS, A. T. M.; RIET-CORREA, F.; MARQUES, A. R.; LOPES, J. R. G.; VIEIRA, V. D.; MIRABALLES, C. Identificação de vacas Sindhi que são suscetíveis ou resistentes à *Haematobia irritans*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 3, p. 465–472, 2019.

MORAES, C. V. Investigação da ocorrência de eventos epigenéticos em *Haemonchus contortus* e sua relação com a resistência ao anti-helmíntico

monopantel. 2019. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2019.

MORGAN, N.O. Autecology of the adult horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). **Ecology**, v. 45, n. 4, p. 728-736, 1964.

NEVES, J. H.; COSTA, R. L. D.; MARINI, A.; SOUTELLO, R. V. G.; BARRETO, T. N. Performance of heifers from different genetic groups without anthelmintic treatment. **Veterinária e Zootecnia**, v. 23, n. 4, p. 688–695, 2016.

NICIURA, S. C. M.; MORAES, C. V.; CRUVINEL, G. G.; GAINZA, Y. A.; ALBUQUERQUE, A. C. A.; SANTANA, R. C. M.; THOLON, P.; TIZIOTO, P. C.; CHAGAS, A. C. S.; ESTEVES, S. N.; BENAVIDES, M. V.; AMARANTE, A. F. T. . **Análise genômica da resistência ao monepantel e investigação epigenética em Haemonchus contortus**. 1. ed. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2018.

OLIVEIRA, M. C. S.; ALENCAR, M. M.; CHAGAS, A. C. S.; BERALDO, M. C. D.; GIGLIOTI, R. **Estudo da resistência aos ectoparasitas e aos nematódeos gastrintestinais em bovinos da raça Nelore e cruzados**. 1. ed. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2012 (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 32).

OLIVEIRA, M. C. S. Alternativas para o controle de ectoparasitas em bovinos da raça Canchim. In: CONVENÇÃO NACIONAL DA RAÇA CANCHIM, 5., 2018, São Carlos, SP. **Anais[...]**. São Carlos: Embrapa, 2018.

OLIVEIRA, M. C. S.; ALENCAR, M. M.; CHAGAS, A. C. S.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H. N. Gastrointestinal nematode infection in beef cattle of different genetic groups in Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 166, n. 3, p. 249–254, 2009.

OLIVEIRA, M. C. S.; ALENCAR, M. M.; GIGLIOTI, R.; BERALDO, M. C. D.; ANÍBAL, F. F.; CORREIA, R. O.; BOSCHINI, L.; CHAGAS, A. C. S.; BILHASSI, T. B.; OLIVEIRA, H. N. Resistance of beef cattle of two genetic groups to ectoparasites and gastrointestinal nematodes in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 197, n. 1, p. 168–175, 2013.

OLIVEIRA, P. A.; RUAS, J. L.; RIET-CORREA, F.; COELHO, A. C. B.; SANTOS, B. L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E. S. V.; SCHILD, A. L.; OLIVEIRA, P. A. De; RUAS, J. L.; RIET-CORREA, F.; COELHO, A. C. B.; SANTOS, B. L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E. S. V.; SCHILD, A. L. Doenças parasitárias em bovinos e ovinos no sul do Brasil: frequência e estimativa de perdas econômicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 8, p. 797–801, 2017.

OSORIO, J. S.; JACOMETO, C. B.; ZHOU Z.; LUCHINI, D.; CARDOSO, F. C.; LOOR, J. J. Hepatic global DNA and peroxisome proliferator-activated receptor alpha promoter methylation are altered in periparturient dairy cows fed rumen-protected methionine. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n.1, p. 234-244, 2016.

PAIVA, J. T.; RESENDE, M. D. V.; RESENDE, R. T.; OLIVEIRA, H. R.; SILVA, H. T.; CAETANO, G. C.; LOPES, P. S.; SILVA, F. F. Epigenética: mecanismos, herança e

implicações no melhoramento animal. **Archivos de zootecnia**, v. 68, n. 262, p. 304–311, 2019.

PAIVA, J. T.; RESENDE, M. D. V.; RESENDE, R. T.; OLIVEIRA, H. R.; SILVA, H. T.; CAETANO, G. C.; LOPES, P. S.; SILVA, F. F. Epigenética: mecanismos, herança e implicações no melhoramento animal. **Archivos zootecnia**, v.68, n.262, p. 304-311, 2019.

PIMENTEL NETO, M.; FONSECA, A. H.. Epidemiologia das helmintoses pulmonares e gastrintestinais de bezerros em região de baixada do Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 4, p. 148–152, 2002.

PIPER, E. K.; JACKSON, L. A.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; GONDRO, C., LEW-TABOR, A. E., JONSSON, N. N. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick resistant *Bos indicus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 431–441, 2010.

PORTILLO, M. T. E.; MENDONZA, J. A. S. P. P. CH. M ahalanobis y lasaplicaciones de su distancia estadística. **CULCyT**, v.5, n. 27, p.13-20, 2008.

RAMOS, F. **Helmintoses de ruminantes**: i. viabilidade econômica do tratamento anti-helmíntico; ii. perfil da resistência anti-helmíntica de nematódeos gastrintestinais de ruminantes. 2019. 88 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, 2019.

PASSAFARO, T. L.; CARRERA, J. P. B.; SANTOS, L. L.; RAIDAN, F. S.; SANTOS, D. C. C.; CARDOSO, E. P.; LEITE, R. C.; TORAL, F. L. B. Genetic analysis of resistance to ticks, gastrointestinal nematodes and Eimeria spp. in Nellore cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 3, p. 224-234, 2015.

REIS, A. P. Epigenética da asma: revisão. **Brazilian Journal Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 13–18, 2015.

RIVAS, M. P.; TEIXEIRA, A. C. B.; KREPISCHI, A. C. V. Epigenética: conceito, mecanismos e impacto em doenças humanas. **Genética na Escola**, v. 14, n. 1, p. 14–25, 2019.

RIVAS, M. P.; TEIXEIRA, A. C. B.; KREPISCHI, A. C. V. Epigenética: conceito, mecanismos e impacto em doenças humanas. **Genética na escola**, v.14, n.1, p. 14-25, 2019.

ROBERT, F. H. S.; O’SULLIVAN, P. J. Methods for eggs counts and larval cultures for Strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 1, n.1, p. 99-192, 1950.

SANTOS, P.R.; BAPTISTA, A.; LEAL, L.; MOLETTA, J.; ROCHA, R. Nematódeos gastrintestinais de bovinos – Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v.14, n.24, p. 1-15. Jan. 2015. Semestral.

SCHREIBER, E. T.; CAMPBELL, J. B. Horn fly (Diptera: Muscidae) distribution on cattle as influenced by host color and time of day. **Environ. Entomol.**, v. 15, n. 6, p. 1307-1309, 1986.

SEIDEL, E. J.; JUNIOR MOREIRA, F. J.; ANSUJ, A. P.; NOAL, M. R. C. Comparação entre o método Ward e o método K-médias no agrupamento de produtores de leite. **Ciência e Natura**, UFSM, v. 30, n. 1, p. 7-15, 2008.

SHYMA, K. P.; GUPTA, J. P.; SINGH, V. Breeding strategies for tick resistance in tropical cattle: a sustainable approach for tick control. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 39, n. 1, p. 1–6, 2015.

SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S.; BARIONI JÚNIOR, W. Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 1150–1155, 2007.

SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1477-1482, 2010.

SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na região sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1477-1482, 2010.

SILVA, L. V.; RUE, M. L.; GRAÇA, D. L. Lesions of the horn fly (*Haematobia irritans* Linnaeus, 1758) on the bovine skin and their impact in leather industry). **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 1039–1043, 2002.

SOUTELLO, R. V. G. ; BELLO, H. J. S.; GONÇALVES, J. A.; SANCHEZ, C. A.; PIROLA, J. V. F.; TEIZEIRA, G. S. Resistência anti-helmíntica em bovinos, ovinos e equinos criados no Brasil. In: POLYCARPO, G. do V.; BILLER, J. D.; FERRARI, S.; ROSAS, F. S.; MEMBRIVE, C. M. B.; VIANA, R. S.; TOMAZ, R. S. (Eds.). **IMAST 2018: atualidades nas ciências agrárias: mudanças, tendências e impactos**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2018.

SOUTELLO, R. V. G.; SENO, M. C. Z.; BERGAMASCHINE, A. F.; BIANCHINI, E.; TOZI, C. R. Infestação de carrapatos em relação ao tratamento estratégico com endectocidas e suplementação proteica em novilhos. **Ciências Agrárias e da Saúde**, FEA, Andradina, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 16–22, 2001b.

SOUTELLO, R. V. G.; CONDI, J. K; PAES, F.; FONZAR, J. F. Influência do parasitismo e da suplementação proteica no desenvolvimento ponderal de novilhos mestiços Angus-Nelore e raça Guzerá. **Ciências Agrárias e da Saúde**, v. 2, p. 21-27, 2002.

SOUTELLO, R. V. G.; SENO, M. C. Z.; BERGAMASCHINE, A. F.; BIANCHINI, E. Effect of proteic supplementation and of parasitismo in the weight gain of bullocks

during the dry period in the region of savana. **Ciências Agrárias e da Saúde, FEZ, Andradina**, v.1 n.1, p.13-16, jan-jun. 2001a.

STEELMAN, C. D.; BROW, C. J.; MCNEW, R. W.; GBUR E. E.; BROW; M. A.; TOLLEY G. The effects of selection for size in cattle on horn fly population density. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 10, p. 129-136, 1996.

STEELMAN, C.D.; BROWN JUNIOR, A.H.; GBUR, E.E.; TOLLEY, G. Interactive response of the horn fly (Diptera: Muscidae) and selected breeds of beef cattle. **Journal of Economic Entomology**, v. 84, p. 1275-1282, 1991.

STOTZER, E. S.; LOPES, L. B.; ECKSTEIN, C.; MORAES, M. C. M. M. De; RODRIGUES, D. S.; BASTIANETTO, E. Impacto econômico das doenças parasitárias na pecuária. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 3, p. 198-221–221, 2014.

SUAREZ, V. H.; BUSETTI, M. R.; LORENZO, R. M. Comparative effects of nematode infection on *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred calves grazing on Argentina's Western Pampas. **Veterinary Parasitology**, v. 58, n. 3, p. 263–271, 1995.

SYKES, A.R. Manipulating host immunity to improve nematode parasite control – Quo vadit. **Parasite Immunology**, v. 30, p. 71-77, 2008.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokyo, Japan: Japan International Cooperation Agency, 1998.

UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H.; KERR, J. D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, n. 4, p. 885–895, 1978.

UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H.; KERR, J. D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in diferente breeds of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, n. 4, p. 885–895, 1978.

VENTURINI, T.; MENEZES, L. F. G. Parasitismo na bovinocultura de corte. In: **Técnicas de manejo agropecuário sustentável**. Curitiba: UTFPR Editora, 2016. p. 115–138.

WANG, L.; SUN, H.Z.; GUAN, L. L.; LIU, J. X. Relationship of blood DNA methylation rate and milk performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.102, n.6, p.1-4, 2019.

WEINBERG, W. Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. Jahreshefte Verein f. vaterl. **Naturk. in Wurtemberg**, v.64,p.368-382, 1908.

WHARTON, R. H.; UTECH, K. B. W. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. **Australian Journal of Entomology**, Malden, v. 9, n. 3, p. 171-182, dez. 1970.

WITTENBURG, D.; TEUSCHER, F.; KLOSA, J.; REINSCH, N. Covariance Between Genotypic Effects and Its Use for Genomic Inference in Half-Sib Families. **G3 (Bethesda)**, v.6, n.9, p. 2761-2772, set. 2016.

YANG, X.; HAN, H.; DE CARVALHO, D. D.; LAY, F. D.; JONES, P. A.; LIANG, G. Gene Body Methylation Can Alter Gene Expression and Is a Therapeutic Target in Cancer. **Cancer Cell**, v. 26, n. 4, p. 577–590, 2014.