

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

Isabela de Almeida Cipriano

Médica Veterinária

VARIAÇÃO EPIGENÉTICA RELACIONADA AO GRAU DE HELMINTOSE EM
BOVINOS NELORE

Dracena - SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

Isabela de Almeida Cipriano

Médica Veterinária

VARIAÇÃO EPIGENÉTICA RELACIONADA AO GRAU DE HELMINTOSE EM
BOVINOS NELORE

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Velludo Gomes de Soutello
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues

Dracena - SP

2023

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

C577v

Cipriano, Isabela de Almeida.

Variação epigenética relacionada ao grau de helmintose em bovinos nelore / Isabela de Almeida Cipriano. -- Dracena: [s.n.], 2023.

42 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2023.

Orientador: Ricardo Velludo Gomes de Soutello

1. Genética animal. 2. Metilação de DNA. 3. Parasitismo. I. Título.

Bibliotecário Fábio S. Rosas
CRB 8/6665

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Variação Epigenética Relacionada ao Grau de Helmintose em Bovinos Nelore

AUTORA: ISABELA DE ALMEIDA CIPRIANO

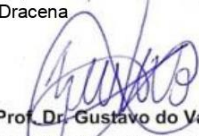
ORIENTADOR: RICARDO VELLUDO GOMES DE SOUTELLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência e Tecnologia Animal, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:



Prof. Associado RICARDO VELLUDO GOMES DE SOUTELLO (Participação Virtual)

Departamento de Produção Animal - DPA / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT - UNESP - Dracena



Prof. Dr. Gustavo do Valle Polycarpo (Participação Virtual)

Departamento de Produção Animal - DPA / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - FCAT - UNESP



Prof. Dr. VAMILTON ALVARES SANTAREM (Participação Virtual)

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal / Universidade do Oeste Paulista

Dracena, 02 de fevereiro de 2023.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Isabela de Almeida Cipriano, nascida em 04 de fevereiro de 1997, na cidade de Martinópolis/SP. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade do Oeste Paulista, em Presidente Prudente/SP, em fevereiro de 2015, graduando-se em dezembro de 2019. Em março de 2021 ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, na FCAT/Unesp - Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Campus de Dracena e tornou-se integrante do EEPPA – Equipe de Extensão e Pesquisa em Parasitologia Animal (grupo de estudo credenciado ao CNPq).

DEDICATÓRIA

Dedico está, como também todas as minhas conquistas, aos meus amados pais, Celso e Aparecida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por sempre me dar forças quando o medo e as dificuldades tomavam conta de mim.

Agradeço aos meus pais por sempre apoiarem minhas decisões e me ajudarem a chegar até aqui. Em especial, a minha mãe, por ser meu exemplo de força, bondade e por tudo que fez para que eu chegasse aonde estou. Tudo isso é por você.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Velludo Gomes de Soutello, por todo apoio, aprendizado e bons conselhos.

Agradeço à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Campus de Dracena e a todos os professores pela elevada qualidade do ensino oferecido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal.

Agradeço aos meus colegas de mestrado e a todos os alunos membros do EEPPA - Equipe de Extensão e Pesquisa a Parasitologia Animal, que contribuíram para desenvolvimento do meu projeto.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"METILAÇÃO GLOBAL GENÔMICA RELACIONADA COM RESISTÊNCIA A HELMINTOS E DESEMPENHO EM NOVILHAS NELORE"** (GLOBAL GENOMIC METHYLATION RELATED TO HELMINTH RESISTANCE AND PERFORMANCE IN NELORE HEIFERS), registrada com o nº **09/2011.SP2 – 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 **22/03/2022**.

Dracena, 22 de março de 2022.



Prof. Dra. Jaqueline Dalbello Biller
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar um rebanho de 48 novilhos Nelore, identificando animais resistentes, resilientes e suscetíveis a helmintos gastrointestinais, relacionando a metilação global do DNA com grau de helmintose em bovinos. Contagem individual de ovos por grama de fezes (OPG), coprocultura para identificação dos gêneros e coleta de sangue para extração de DNA e posterior análise de metilação genômica. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para agrupar os animais em resistentes, resilientes e suscetíveis pelo teste de Tukey (5%) no programa SISVAR. Os valores médios de absorbância absoluta dos grupos e as médias das variáveis foram submetidas à ANOVA e análise de Tukey (5%). Os resultados foram: 56% animais resistentes, 24% resilientes e 20% suscetíveis à infecção por helmintos gastrointestinais, com contagens médias de OPG de 44, 135 e 345 respectivamente, mostrando diferença estatística entre todos os grupos. A quantificação da metilação do DNA foi de 0,164, 0,134 e 0,077 respectivamente para resistente, resiliente e suscetível. Menor metilação do DNA foi observada no grupo de animais suscetíveis, no qual diferiram estatisticamente dos animais resistentes e resiliente, que apresentaram maior quantidade de DNA metilado. Sendo assim, as metodologias utilizadas possibilitaram a identificação dos animais quanto ao grau de infecção por helmintos gastrintestinais, possibilitando relacionar a resistência de bovinos à helmintos com a quantidade de metilação global do DNA.

Palavras-chave: Genética animal. Metilação de DNA. Parasitismo.

ABSTRACT

The objective of the present study was to characterize a herd of 48 Nellore steers, identifying resistant, resilient and susceptible animals to gastrointestinal helminths, relating global DNA methylation with the degree of helminthosis in cattle. Individual count of eggs per gram of feces (OPG), fecal culture for gender identification and blood collection for DNA extraction and subsequent analysis of genomic methylation. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) to group animals into resistant, resilient and susceptible by Tukey's test (5%) in the SISVAR program. The mean absolute absorbance values of the groups and the means of the variables were submitted to ANOVA and Tukey analysis (5%). The results were: 56% resistant, 24% resilient and 20% susceptible to gastrointestinal helminth infection, with mean OPG counts of 44, 135 and 345 respectively, showing statistical difference between all groups. The quantification of DNA methylation was 0.164, 0.134 and 0.077 respectively for resistant, resilient and susceptible. Less DNA methylation was observed in the group of susceptible animals, in which they differed statistically from the resistant and resilient animals, which presented a greater amount of methylated DNA. Thus, the methodologies used made it possible to identify the animals regarding the degree of infection by gastrointestinal helminths, making it possible to relate the resistance of cattle to helminths with the amount of global DNA methylation.

Keywords: Animal genetics. DNA methylation. Parasitism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Média geral da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e $\pm$ erro padrão da média dos 48 novilhos distribuídos nos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis durante o período experimental.....	30
Figura 2. Contagem média individual de ovos por grama de fezes (OPG) dos 48 novilhos classificados nos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis durante o período experimental.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de animais por grupo (N), média de ovos por grama de fezes (OPG), OPG inicial e conteúdo de metilação global do DNA (valor absoluto de absorbância) dos novilhos distribuídos nos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis.....	31
--	----

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5mC - 5-metil-citosina

DNA - ácido desoxirribonucleico

mRNA - RNA mensageiro

OPG - ovos por grama de fezes

RNA - ácido ribonucleico

μL – microlitro

mm – milímetro

U – unidade

°C – grau celsius

SUMÁRIO

1 Introdução	14
2 Objetivos	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 Revisão de Literatura	17
3.1 Panorama da Bovinocultura.....	17
3.2 Parasitismo	18
3.3 Controle e Resistência Anti-Helmíntica.....	20
3.4 Resistência à Parasitas e Epigenética.....	21
4 Material e Métodos.....	25
4.1 Local e Animais	25
4.2 Avaliação do Parasitismo.....	25
4.3 Coleta de Sangue	25
4.4 Extração do DNA	26
4.5 Metilação Global do DNA.....	27
5 Análise Estatística	28
5.1 Classificação dos Animais Mediante o Grau de Parasitismo	28
6 Resultados	29
7 Discussão.....	33
8 Conclusão	35
Referências Bibliográficas	36

1 INTRODUÇÃO

O rebanho de bovinos no Brasil é de aproximadamente 260.375.000 cabeças, o que permite o país ocupar a 2ª posição no ranking dos países com maiores rebanhos, sendo o maior rebanho comercial do mundo (ANUALPEC, 2021).

As pastagens são a principal via de infecção dessas larvas para os bovinos (SHOOP; SOLL, 2002). Dessa forma, as condições ambientais são importantes, uma vez que influenciam as condições das pastagens, que por sua vez oferecem condições propícias para que os estágios de vida livre dos nematóides gastrintestinais alcancem o estágio infectante (AMARANTE, 2004).

Dentre os entraves ao crescimento e produção na bovinocultura, as helmintoses são uma das principais causas, devido a redução da produtividade dos ruminantes (OLIVEIRA *et al.*, 2017) por representarem um impacto negativo na criação desses animais (STOTZER *et al.*, 2014). As infecções por nematódeos gastrintestinais devem ser levadas em consideração, pois agravam a redução dos índices produtivos, acarretando em baixa conversão alimentar, retardo no crescimento e menor ganho de peso dos animais (VENTURINI; MENEZES, 2016).

De acordo com Bianchin (1996) e Soutello *et al.* (2001), é difícil mensurar as perdas causadas pelas verminoses, contudo Grisi *et al.* (2014) estimaram que altas perdas podem chegar a US\$7.107,97 milhões, sendo um grande problema econômico no Brasil. Logo, controlar as helmintoses é um fator muito importante para o sucesso da pecuária bovina (SOUTELLO *et al.*, 2001).

O uso de antiparasitários é a forma mais utilizada de controlar as infecções por helmintos (BRITO *et al.*, 2019). Contudo, o uso indiscriminado e recorrente de uma mesma base farmacológica leva ao aparecimento da resistência antiparasitária (MCVEIGH, 2020). Desta forma, a busca por alternativas de controle desses parasitas é fundamental, como a utilização de animais resistentes. Ou seja, animais que conseguem suprimir o estabelecimento e/ou desenvolvimento desses parasitas (UTECH *et al.*, 1978; GASBARRE *et al.*, 2001). Portanto, a seleção de animais resistentes pode ser altamente eficiente (BIEGELMEYER *et al.*, 2011), já que a resistência é herdável (AMARANTE, 2004).

Segundo Li *et al.* (2012), a resistência está ligada a herança de genes/locos genômicos com papel importante na expressão de moléculas que regulam o sistema imunológico dos hospedeiros, tendo como intuito limitar e controlar a enfermidade. Portanto, a seleção de animais resistentes pode ser altamente eficiente (BIEGELMEYER *et al.*, 2011), já que a resistência é uma característica herdável (AMARANTE, 2004).

Por muitos anos, os genes foram considerados os únicos responsáveis pela passagem das características biológicas de uma geração à outra. Porém, variações epigenéticas também possuem essa característica, sendo a epigenética definida como modificações no genoma que não alteram a sequência de DNA (FANTAPPIE, 2013).

Um dos mecanismos epigenéticos mais estudados é a metilação do DNA (NICIURA *et al.*, 2018), que consiste basicamente na adição de um radical metil à uma base nitrogenada (COSTA, 2008; PORTELA, 2010), normalmente nas citosinas dos dinucleotídeos CpG, mais especificamente na posição carbono-5 no anel pirimídico de uma citosina (5-metil-citosina - 5mC) (MORAES, 2019).

As ilhas CpG (regiões com grande quantidade das bases citosinas e guanina), comumente presentes nas regiões promotoras dos genes, quando metiladas levam ao silenciamento dos mesmos, ou seja, inibição da transcrição gênica, e a desmetilação torna as regiões promotoras ativas, proporcionando a interação com vários fatores de transcrição que controlam a ativação gênica (REIS, 2015). Também pode ocorrer uma superexpressão dos genes (FANTAPPIE, 2013) quando a metilação ocorre nos éxons, ou seja, nas regiões codificadoras dos genes (YANG *et al.*, 2014). Logo a alteração do padrão de metilação do DNA leva a criação de um novo perfil, que tem efeito significativo na vida e saúde do animal (FANTAPPIE, 2013).

Tendo em vista a importância do controle dos nematódeos gastrintestinais em bovinos, se faz necessário a busca por alternativas como o uso de animais resistentes aos mesmos. Assim, as pesquisas sobre mecanismos epigenéticos podem ser utilizadas como uma ferramenta para a identificação e possível seleção de animais resistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo analisar o conteúdo de metilação global do DNA correlacionando com grau de helmintose em bovinos.

2.2 Objetivos Específicos

- Mensurar o grau de infecção por nematódeos gastrintestinais de cada animal, a partir dos dados obtidos em avaliações durante 12 meses, por meio da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG);
- Identificar e classificar, por meio da carga parasitária, os animais em resistentes, resilientes e suscetíveis à nematódeos gastrintestinais;
- Quantificar o percentual de animais resistentes, resilientes e suscetíveis à nematódeos gastrintestinais;
- Analisar como o grau de infecção por nematódeos gastrintestinais pode influenciar no conteúdo de metilação global do DNA por meio da quantificação de DNA metilado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Panorama da Bovinocultura

A atividade pecuária no Brasil é responsável por gerar em torno de 7,5 milhões de empregos e um faturamento anual de aproximadamente 5 bilhões de reais, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento socioeconômico (MOTTES *et al.*, 2016).

O Brasil é possui o segundo maior rebanho do mundo com aproximadamente 260.375.000 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2021). Por esse motivo é extremamente importante buscar por novas tecnologias que possibilitem o sucesso da exploração do gado de corte, como por exemplo, cruzamentos industriais, exigências nutricionais e alimentação mais adequada às realidades de campo e a uma condição sanitária satisfatória do rebanho (BASTOS *et al.*, 2018).

O rebanho nacional é composto em sua maioria por zebuínos e mestiços, principalmente, para a produção de carne (SIQUEIRA *et al.*, 2012). A base da bovinocultura de corte é formada, em sua maioria, pela raça zebuína nelore devido a sua ótima adaptação as condições tropicais, que incluem tolerância ao calor, resistência parasitária, capacidade de aproveitar pastagens com baixo valor nutricional e maior rusticidade do bezerro (ALBUQUERQUE; MERCADANTE; ELER, 2007).

O rebanho de corte tem como principal característica o sistema de criação a pasto, e dentre os fatores que contribuem para o declínio na produção e produtividade da pecuária de corte estão a alta incidência de parasitas, doenças e deficiências minerais, manejo inadequado e flutuações sazonais contínuas na disponibilidade e qualidade dos alimentos (BIANCHIN, 1987).

Com a expansão intensiva da pecuária bovina há um aumento da lotação das pastagens que juntamente com o método de pastejo contínuo, acarreta o aumento de problemas sanitários, como as helmintoses (VENTURINI; MENEZES, 2016).

3.2 Parasitismo

As helmintoses são uma das principais causas da redução de produtividade em ruminantes (OLIVEIRA *et al.*, 2017) e possuem um impacto negativo significativo no potencial da atividade pecuária, comprometendo os investimentos em genética do rebanho e insumos utilizados, além de reduzir o desempenho produtivo e reprodutivo dos animais, levar a um possível descarte involuntário e até mesmo morte dos mesmos (STOTZER *et al.*, 2014).

A predominância de climas tropicais e subtropicais no Brasil favorece a ocorrência de parasitas internos e externos em bovinos (GRISI *et al.*, 2014) por conta disso, o controle desses patógenos em bovinos é crucial para a pecuária, pois estes resultam em perdas econômicas significativas devido à diminuição do ganho de peso e rendimento da carcaça, custos associados a antiparasitários e mão de obra, transmissão de patógenos, redução na produtividade e até mesmo mortalidade (HEINZEN *et al.*, 2012).

Os endoparasitas, em específico os helmintos, causam alterações metabólicas que podem comprometer o desempenho do hospedeiro (SYKES; COOP, 1979), prejudicando o crescimento ósseo por conta da perda de minerais (como por exemplo: cálcio, fósforo e magnésio) nas fezes e urina (PEREIRA; LEITE; BIANCHIN, 2004) reduzindo a disponibilidade de nutrientes no organismo dos animais por conta da diminuição do apetite e da ingestão voluntária, e consequentemente digestão e absorção, ocasionando infecção do trato digestivo e comprometendo a absorção dos alimentos pelos bovinos; provocando a perda de proteínas endógenas no trato gastrintestinal, responsáveis pelas atividades do sistema imunológico e reparação dos tecidos (VENTURINI; MENEZES, 2016). Logo, bovinos com infecções parasitárias apresentam crescimento atrofiado, produção reduzida de leite e carne, e desempenho reprodutivo reduzido, e como consequência causam prejuízos aos produtores (STROMBERG *et al.*, 2012) por conta do menor ganho de peso e 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).

As espécies de nematódeos gastrintestinais e suas prevalências variam muito de acordo com fatores topográficos, temperatura, precipitação pluviométrica, pastagem, entre outros fatores (UENO; GONÇALVES, 1998). Os

ruminantes, de forma geral, são hospedeiros de diversas espécies do Filo Nematoda (VENTURINI; MENEZES, 2016), mais especificamente da ordem *Strongylida* (SEQUEIRA; AMARANTE, 2001). Essa ordem é dividida em quatro superfamílias, sendo a *Trichostrongyloidea* a superfamília que contém os nematódeos mais comuns e patogênicos para ruminantes mantidos à pasto, eles são encontrados principalmente no abomaso e no intestino desses animais, compreendendo os seguintes gêneros: *Trichostrongylus*, *Haemonchus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Dictyocaulus*, *Ostertagia*, *Oesophagostomum* e *Hyostrogylus* (BOWMAN, 2010). No Brasil, diversos estudos com bovinos indicam que os principais gêneros encontrados 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; SOUTELLO *et al.*, 2018), sendo as infecções causadas pelas espécies de *Haemonchus* consideradas as mais patogênicas, pois são parasitas hematófagos que causam debilitação no animal (BOIUX *et al.*, 1998).

Esses endoparasitas geralmente estão associados com animais a pasto, pois os fatores edáficos e as condições climáticas de alta temperatura e umidade das pastagens brasileiras são favoráveis ao parasitismo (MENDONÇA *et al.*, 2014), propiciando, 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 gastrintestinais dos animais em pastejo (WALLER, 2006). O ciclo de vida dos nematódeos é definido por mudas de cutícula antes da fase adulta, sendo elas os estágios L1, L2, L3, L4, e por fim a larva adulta imatura (URQUHART *et al.*, 1998). Esse ciclo pode ser dividido em ciclo de vida direto, no interior do hospedeiro e outra externa, no ambiente, nas áreas fecais e de forragem, tendo início pela ingestão do parasita (L3 ou forma infectante) ou pela penetração ativa através da pele, sendo que esses endoparasitas chegam ao meio exterior por meio das 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).

Santos (1973), avaliando os malefícios causados por essas helmintoses em bovinos de duas propriedades com criação extensiva na Depressão Central,

constatou que os animais parasitados perderam 36,7 kg de peso vivo, significando que a incidência de helmintoses resultou em uma perda de 32% do ganho total. Grisi *et al.* (2014) estimaram os prejuízos devido a nematódeos gastrintestinais em bovinos chegaram aos US\$7.107,97 milhões, portanto esse parasitismo representa um problema econômico significativamente impactante no Brasil. Dessa forma, o controle das helmintoses é de grande importância para o sucesso da pecuária bovina.

3.3 Controle e Resistência Anti-Helmíntica

O principal método de controle de helmintos é a utilização de drogas anti-helmínticas. No entanto, o uso desses produtos químicos, além do alto custo, 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).

Considerando a resistência aos anti-helmínticos pelos nematódeos, na literatura existem mais estudos para ovinos e caprinos, nos quais se observa até mesmo resistência simultânea a várias classes de drogas (BORSTEEDE, 1990; VAN WYK, 1990; ROTHWELL; SANGSTER, 1993; YADAV *et al.*, 1993; D'ASSONVILLE *et al.*, 1996; WALLER, 1986; COLES, 1997). No Brasil, a princípio, a resistência a esse tipo de drogas foi constatada em ovinos na região sul com as principais classes de anti-helmínticos: benzimidazóis, levamisóis e ivermectinas (AMARAL, 1985; ECHEVARRIA, 1995; ECHEVARRIA *et al.*, 1996; FARIAS *et al.*, 1997).

O primeiro relato de resistência em bovinos no Brasil, foi feito por Pinheiro e Echevarria (1990), no Rio Grande do Sul, que verificaram resistência do *H. contortus* ao oxfendazole e ao albendazole. Souza *et al.* (2001), em Santa Catarina, publicaram resultados parciais sobre a resistência de *Trichostrongylus spp* e *Ostertagia spp* ao levamisole, *Haemonchus spp* e *Cooperia spp* à ivermectina e *Cooperia spp* ao sulfóxido de albendazole. Mais recentemente, a resistência também foi demonstrada por Paiva *et al.* (2001) e Costa *et al.* (2004) em São Paulo e por Borges *et al.* (2004) e Rangel *et al.* (2005) em Minas Gerais.

Segundo Paiva *et al.* (2001) a resistência ocorre pelo uso frequente e continuado de uma mesma base farmacológica destinada ao controle dos

parasitas e esta pressão de seleção é gradativa e silenciosa, caso não diagnosticada precocemente somente foi detectada quando atingir níveis com danos aos animais.

De modo geral, a possibilidade de aparecimento de populações de parasitas resistentes é desprezada, não só pelos produtores, mas também pelos profissionais da área, pois a eficiência dos anti-helmínticos não é clinicamente óbvia e só pode ser observada, se especificamente investigada (PRICHARD, 1994; WALLER, 1994). Entretanto, uma vez instalada, não foi revertida, mesmo após a descontinuação do uso da classe de anti-helmínticos que lhes deram origem (MARTIN *et al.*, 1998); dado que os genes da resistência estão presentes em frequência muito alta nos parasitas e isto lhes proporcionam mecanismos metabólicos que inibem ou evitam os efeitos críticos ou letais das drogas (GILL; LACEY, 1998). Em bovinos, o gênero predominante nos registros de resistência é *Cooperia spp.* (JACKSON *et al.*, 1987; VERMUNT *et al.*, 1995; WILLIAMS, 1997; ANZIANI *et al.*, 2000) sendo estas descrições feitas na Austrália, Nova Zelândia e Argentina. Outra espécie citada é *Trichostrongylus axei*, na Austrália, resistente a oxfendazole e benzimidazol (EAGLESON; BOWIE, 1986; EAGLESON *et al.*, 1992).

Dessa forma, é extremamente importante buscar por novas alternativas no controle de parasitas. No Brasil, há um grande interesse na utilização de animais resistentes à parasitas e melhor adaptados às condições climáticas tropicais, portanto a seleção de animais geneticamente resistentes é uma estratégia de controle promissora, que pode ajudar a reduzir a necessidade de medicamentos antiparasitários, amenizar os prejuízos provocado pelos helmintos e os altos custos de tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

3.4 Resistência à Parasitas e Epigenética

É possível definir resistência como a capacidade de suprimir o estabelecimento e/ou desenvolvimento de uma infecção provocada por helmintos (SUAREZ; BUSETTI; LORENZO, 1995; GASBARRE; LEIGHTON; SONSTERGERD, 2001) e/ou a infestação causada por ectoparasitas (*Rhipicephalus microplus* e *Haematobia irritans*) (UTECH; WHARTON; KERR, 1978).

Diversos fatores podem influenciar a resistência dos animais aos parasitas, fatores tais 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.*, 2010; PACHECO, 2015; PASSAFARO *et al.*, 2015; NEVES *et al.*, 2016).

Independentemente da raça, dentro de uma população de animais não selecionados para resistência parasitária, existem aproximadamente 10 a 20% de indivíduos que não precisam ou necessitam de muito pouco anti-helmíntico para que ocorra o controle dos parasitas, esses indivíduos são considerados naturalmente “resistentes”. Nessa mesma proporção existem os indivíduos que sempre apresentam alta carga parasitária em seu trato gastrintestinal, sendo eles considerados animais disseminadores de parasitas no meio ambiente, denominados “suscetíveis”. Existem ainda os indivíduos “resilientes”, são animais que não possuem resistência, mas que conseguem amenizar o efeito do parasitismo no seu desempenho produtivo (AMARANTE *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2004).

Os mecanismos por trás desse processo, no entanto, são complexos e ainda pouco compreendidos (BIEGELMEYER *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2015) uma vez que dependem de um número significativo de genes, citosinas e tipos de células (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).

A habilidade do animal em expressar resistência e adquirir uma autoimunidade varia muito de acordo com as espécies, provando que esses fatores são um controle genético, sendo comprovado em diversos estudos tendo como parâmetro examinador o OPG (ovos por grama de fezes) (GASBARRE *et al.*, 2001). Diversos resultados de pesquisas demonstram que é possível realizar a seleção através do OPG de hospedeiros resistentes aos nematódeos gastrintestinais, além disso, esta técnica pode levar a uma diminuição

significativa de larvas infectantes presente no ambiente a longo prazo, proporcionando uma menor infecção dos animais (BASSETTO *et al.*, 2009). A grande evidência que se tem a respeito deste controle genético pode ser demonstrada através dos valores de herdabilidade para resistência parasitária, ou seja, o quanto desta característica é herdada e transmitida para a prole. Em bovinos essa herdabilidade é estimada em cerca de 0,30 (GASBARRE *et al.*, 2001). Desta forma, a seleção de bovinos resistentes a helmintoses demonstram ser a melhor alternativa para aumentar a habilidade do animal em amenizar o grau de infecção parasitária, e consequentemente, a uma redução de custos no controle antiparasitário, resultando em um maior retorno econômico na atividade pecuária.

Considerando que a herança dos genes que possuem importância na expressão de moléculas que regulam a imunidade do hospedeiro e controlam a patologia está ligada a resistência (LI *et al.*, 2012), a seleção de animais resistentes pode ser uma alternativa eficiente (BIEGELMEYER *et al.*, 2011), visto que a resistência é uma característica herdável (AMARANTE, 2004), além de diminuir expressivamente os picos sazonais na carga parasitária e no número de larvas no pasto após a seleção (PACHECO, 2015).

Por um longo período os genes foram considerados como os únicos responsáveis por transmitir as características biológicas entre gerações, no entanto, foi descoberto que variações epigenéticas também podem ser passadas a prole (FANTAPPIE, 2013). Essas variações podem ser definidas como alterações no genoma hereditárias e reversíveis, por meio da memória celular, (TSAI; BAYLIN, 2011) que não modificam a sequência de DNA (BAKUSIC *et al.*, 2017), representando um conjunto de eventos moleculares moduladores da expressão dos genes (BIRD, 2007).

Essas modificações incluem o surgimento de metilação do DNA, alterações das histonas, entre outros mecanismos, tais como a inativação da cromatina (BRÄUTIGAM; CRONK, 2018). A metilação do DNA está entre os mecanismos mais estudados da epigenética, consistindo basicamente na adição de um radical metil à uma base nitrogenada (COSTA, 2008; PORTELA; ESTELLER, 2010). Usualmente a metilação ocorre em uma ilha CpG, que consiste em um sítio dinucleotídeo (PORTEN, 2018), particularmente, na posição carbono-5 no anel de citosina, 5mC (TCHURIKOV, 2005).

A adição de um grupo metila a uma molécula de DNA pode provocar o completo silenciamento até a superexpressão de diversos genes, sendo que a modificação do padrão da metilação do DNA leva a criação de um perfil novo que pode ativar genes que deveriam permanecer silenciados e ter um efeito significativo na vida e na saúde de um organismo (FANTAPPIE, 2013).

Sendo assim, a possibilidade de haver uma relação entre o grau de resistência dos animais a parasitas e o conteúdo global de metilação do DNA, pôde ser evidenciado em um recente estudo realizado por Soutello *et al.* (2022), no qual foram avaliados bovinos $\frac{1}{2}$ Angus x $\frac{1}{2}$ Nelore com o objetivo relacionar a metilação global do DNA a endo e ectoparasitas. Permitindo assim estabelecer uma ligação entre a resistência parasitária e o conteúdo de metilação global do DNA, com os animais resistentes exibindo maiores quantificações de DNA metilado, enquanto que os animais suscetíveis apresentam teores mais baixos.

Tendo em vista a importância do controle dos parasitas em bovinos, se faz necessário a busca por novas alternativas para o controle de helmintos, como por exemplo, o uso de animais resistentes 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.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e Animais

O uso de animais foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Faculdade de Engenharia da UNESP/Dracena, de acordo com as normas internacionais de uso de animais em pesquisa (certificado de autorização númeroº09/2011.SP2 – CEUA).

O estudo foi realizado na Fazenda Córrego Seco, localizada no município de Castilho – SP (latitude 20°52'09.0" sul, longitude 51°29'22.9"oeste), conveniada com a Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), UNESP - Campus de Dracena.

Foram avaliados 48 novilhos contemporâneos da raça Nelore, oriundos do mesmo rebanho, com aproximadamente 18±2 meses. Os animais receberam tratamento antiparasitário três meses antes do início das avaliações, com Fosfato de Levamisol 18,8% (Ripercol®, Zoetis), seguindo as recomendações do fabricante, para o controle de helmintos gastrintestinais e depois permaneceram sem tratamento antiparasitário até o final do experimento.

4.2 Avaliação do Parasitismo

Avaliou-se o grau de parasitismo dos animais por meio de coletas de fezes realizadas a cada 28 dias durante 12 meses, para posteriormente identificar os animais resistentes, resilientes e suscetíveis de acordo com os resultados obtidos por meio da contagem de ovos por grama de fezes (OPG). As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal para realização das análises de OPG, utilizando-se câmara de McMaster (GORDON; WHITLOCK, 1939). Em seguida, foi realizado o cultivo de fezes (coprocultura) para extração e identificação das larvas infectantes pelo método de Roberts e O'Sullivan (1950), e posteriormente a identificação dos gêneros presentes pela chave de Keih (1953).

4.3 Coleta de Sangue

A coleta de sangue foi realizada individualmente, utilizando agulha 0,40 x 12mm e seringa de 5 ml descartáveis. As amostras sanguíneas foram colocadas

em tubos *ependorf* previamente identificadas com o número de cada animal e coletados cinco mililitros de sangue por punção da veia jugular, para posterior extração do DNA dos animais e análise de metilação. Após a coleta, as amostras sanguíneas foram acondicionadas em geladeira de transporte a 4°C até chegar ao laboratório de Parasitologia e Sanidade Animal (FCAT/UNESP), sendo armazenado em freezer (-20°C).

4.4 Extração do DNA

A extração de DNA total genômico foi realizada pelo *EasyPureBlood® Genomic DNA Kit* (Transgen). Foi adicionado 250µL de sangue, 20µL de proteinase K e 500 µL de BB3 (*Binding Buffer 3*) em um tubo de microcentrífuga, sendo misturado por 15 segundos em vortex. Em seguida foi incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Após o preparo do material, o tubo foi brevemente centrifugado e o lisado transferido para uma coluna de centrifugação (12.000xg por um minuto), descartando o sobrenadante. Ao final da centrifugação adicionou-se 500 µL de CB3 (*Clean Buffer 3*) e o material foi novamente centrifugado (12.000xg por 30 segundos), também com descarte do sobrenadante. Na etapa seguinte, que ocorreu duas vezes, foi adicionado 500µL de WB3 (*Wash Buffer 3*), e novamente o material foi centrifugado (12.000xg por 30 segundos), descartando o sobrenadante. Ao final, a coluna foi centrifugada (12.000xg por dois minutos) para remoção do WB3 residual.

Posteriormente, a coluna de centrifugação foi colocada em um tubo estéril de microcentrífuga de 1,5mL e foi adicionado 50 – 200 µL de Tampão de Eluição à matriz da coluna. Após essa etapa, o material foi centrifugado (12.000xg por um minuto) para eluir o DNA genômico isolado. Esse DNA eluído foi armazenado a -20°C.

Para quantificar e qualificar as amostras de DNA, utilizou-se o espectrofotômetro (NanoDrop2000 – ThermoScientific), medindo 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 indica excesso de proteínas e valores superiores a 2,0 indica excesso de solventes orgânicos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

4.5 Metilação Global do DNA

A metilação foi analisada por meio do *Imprint DNA Methylation Quantification* Kit (Sigma), usando tiras com poços pré-tratados com reagente ligante de DNA metilado, 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. Utilizou-se água ultrapura para o controle negativo e DNA 100% metilado para o controle positivo, fornecido pelo kit.

Em cada poço da placa do kit, utilizou-se 180 ng de DNA diluídos de cada animal para um total de 30µL em solução fixadora de DNA metilado (*Binding Solution*). Após 60 minutos de incubação a 37°C, foi adicionado 150µL de solução bloqueadora (*Block Solution*) e os poços foram incubados por mais 30 minutos a 37°C. Ao final, as soluções, juntamente com o DNA, foram removidas e cada poço foi lavado três vezes com solução de lavagem diluída em água ultrapura (*Wash Buffer 10x*) para 1x.

Cada poço então, recebeu 50µl de anticorpo de captura, diluído em uma concentração de 1:1000, e ficaram incubados por 60 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, o anticorpo de captura foi removido, cada poço foi lavado com 150µl de solução de lavagem diluída, por quatro vezes, e foi adicionado 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 receberá 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 leitora de microplacas (DR-200BS-NM-BI), sendo a fórmula utilizada para obtenção dos valores corrigidos: $[(A_{450} \text{ Amostra} - A_{450} \text{ Branco}) / (A_{450} \text{ DNA Controle metilado} - A_{450} \text{ Branco})] \times 100$.

Para a análise de metilação global, em delineamento inteiramente casualizado, foram utilizados os valores de absorbância corrigidos individualmente para cada animal, que foram agrupados de acordo com as categorias dentro dos tratamentos, definidos de acordo com o grau de parasitismo.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.1 Classificação dos Animais Mediante o Grau de Parasitismo

A distribuição das contagens de OPG foi verificada pelo teste de Análise de Variância, por meio do programa SISVAR 5.4 (FERREIRA, 2014) e os dados transformados em $\sqrt[2]{n + 0,5}$, em que o n é o valor das contagens. A transformação nesta fórmula 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 das contagens de OPG em delineamento inteiramente casualizado, contendo 48 tratamentos e 13 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 Tukey (5%), pelo programa computacional SISVAR 5.4. Assim, os animais do rebanho foram, de acordo com o grau de parasitismo, agrupados em três categorias: resistentes, resilientes e suscetíveis. Após tal classificação, a contagem média de OPG dos animais de cada grupo também foi submetida a ANOVA, sendo considerado três tratamentos (classificação de acordo com a resistência) e 48 repetições (cada animal sendo considerado uma repetição), e posterior análise estatística pelo programa computacional SISVAR 5.4, pelo teste Tukey (5%).

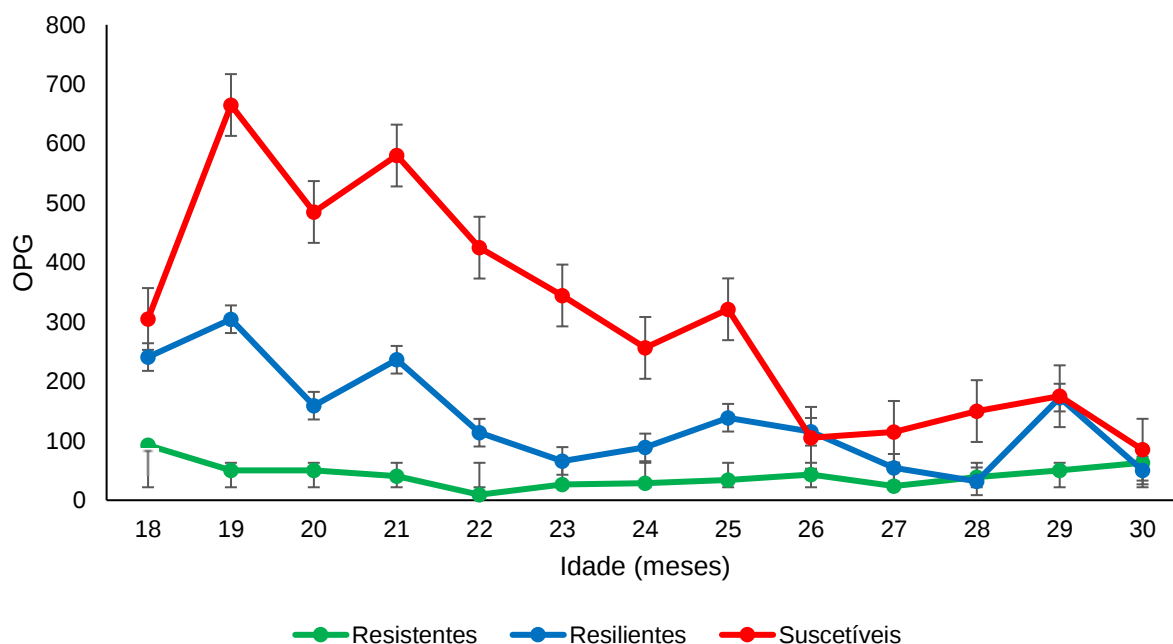
A análise estatística de metilação global do DNA, em delineamento inteiramente casualizado, utilizou os valores absolutos de absorbância, sendo as médias das diferenças de metilação entre os animais transformadas em $\sqrt[2]{n + 0,5}$ e submetidas à ANOVA, pelo programa computacional SISVAR 5.4, a fim de se verificar a significância estatística entre os diferentes valores dos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis a helmintos gastrintestinais pelo teste Tukey (5%).

6 RESULTADOS

A dinâmica do grau de infecção por helmintos, avaliada pela contagem de OPG durante o período experimental (Figura 1), aponta que o OPG inicial dos animais demonstra uma diferença no grau de infecção entre os grupos desde o início do experimento. Quando observado o OPG médio geral, nota-se que os animais suscetíveis apresentaram um perfil característico com maiores contagens de OPG em todo o período experimental, seguido dos animais resilientes, com médias intermediárias e os animais resistentes sempre com médias inferiores de OPG.

No primeiro mês de avaliação, foi observado OPG de 50, 304 e 665, respectivamente, para os animais resistentes, resilientes e suscetíveis. Sendo observadas médias superiores de OPG nos animais suscetíveis, que se mantiveram em níveis altos até os animais atingirem 24 meses de idade. Observa-se que nos seis primeiros meses de avaliações, onde os animais estavam com aproximadamente dois anos de idade, as médias de OPG dos animais resistentes, resilientes e suscetíveis neste período, foram de, respectivamente, 46, 172 e 436. Após esse período, os animais suscetíveis e resilientes apresentaram uma queda em sua carga parasitária, já os animais resistentes, permaneceram com o OPG em níveis baixos em todo o período experimental, a partir desse período (de 24 a 30 meses de idade) não havendo mais diferença no grau de helmintose entre os grupos.

Figura 1 - Média geral da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e $\pm$ erro padrão da média dos 48 novilhos distribuídos nos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis durante o período experimental.



Fonte: Elaborado pela autora.

Na Tabela 1 são apresentadas as médias das contagens de ovos por grama de fezes (OPG), o conteúdo de metilação global do DNA e a quantidade de animais por grupo, sendo o OPG médio respectivamente de 44, 135 e 345, para os animais resistentes, resilientes e suscetíveis com média geral de 175 OPG, sendo observado diferença estatística entre os grupos. Para grau de metilação do DNA, os animais resistentes apresentaram 0,164; os resilientes 0,134 e os suscetíveis 0,077. Nota-se que não houve diferença significativa entre o conteúdo de metilação global do DNA dos animais resistentes e resilientes, os quais diferiram-se dos animais suscetíveis. Sendo observado que os animais resistentes apresentaram maior quantidade de DNA metilado e os suscetíveis menor quantidade.

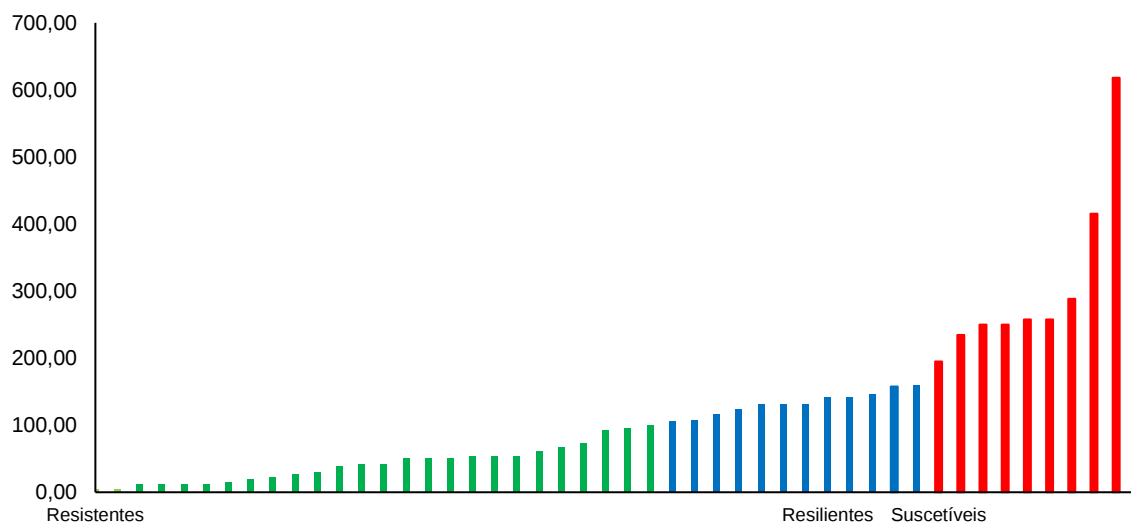
Tabela 1 - Quantidade de animais por grupo (N), média de ovos por grama de fezes (OPG), OPG inicial e conteúdo de metilação global do DNA (valor absoluto de absorbância) dos novilhos distribuídos nos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis.

Classificação	N	OPG Médio	OPG Inicial	Metilação do DNA
Resistentes	27	44 a	46 a	0,164 a
Resilientes	11	135 b	196 b	0,134 a
Suscetíveis	10	345 c	444 c	0,077 b
Média		175	233	0,139
p-valor		<0,001	0,39	0,002

As letras distintas na coluna apontam significância pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os grupos.

A partir dos resultados obtidos, observou-se que 27 novilhos foram classificados como resistentes, 11 como resilientes e 10 como suscetíveis a helmintos gastrintestinais, havendo diferença significativa entre a contagem média de OPG individual dos mesmos (Tabela 1). Dessa forma, a proporção de animais resistentes, resilientes e suscetíveis dentro do rebanho estudado foi de 56%, 24% e 20%, respectivamente, sendo a maior parcela constituída por animais resistentes, observado na Figura 2 pela distribuição dos animais classificados conforme a média de OPG.

Figura 2 - Contagem média individual de ovos por grama de fezes (OPG) dos 48 novilhos classificados nos grupos resistentes, resilientes e suscetíveis durante o período experimental.



Fonte: elaborado pela autora.

Os gêneros de helmintos encontrados por meio das coproculturas, apresentaram maior prevalência de *Cooperia* spp. (53,6%), seguidos por *Haemonchus* spp. (33,9%), *Oesophagostomum* spp. (12,3%) e *Trichostrongylus* spp. (0,2%).

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, pode-se observar que a contagem média de OPG dos animais resistentes durante o período experimental ficou próxima do encontrado para animais da raça Nelore, em estudo realizado por Bricarello *et al.* (2007), que observaram contagens de OPG inferiores a 50 para animais resistentes.

Segundo a classificação de Ueno e Gonçalves (1998), no qual observou que contagens médias menores que 200 OPG representam grau leve de infecção, entre 200 e 700 OPG representam grau moderado e acima de 700 OPG representam grau alto de infecção, o que se assemelha com o presente estudo, desde o primeiro mês de avaliação até os animais completarem 24 meses de idade. Porém, essa característica não é mantida até o final do experimento, devido aos animais possivelmente adquirirem imunidade e sua carga parasitária tende a ser menor. Pois há uma propensão do OPG diminuir nos animais à medida que se tornam adultos, visto que, segundo Bianchin *et al.* (1996) e Catto *et al.* (2008) os animais adquirem imunidade a partir dos 18 meses de idade. Estes resultados concordam com estudo realizado por Neves (2014) onde observou diminuição nos valores de OPG a medida que os animais vão se tornando adultos.

Em estudo realizado por Soutello *et al.* (2001) na mesma região, observou-se que os valores encontrados para a contagem média de OPG foi de 314 OPG. Valores maiores do que foi observado no presente estudo, não corroborando também com outro estudo de Soutello *et al.* (2022), realizado na também na mesma região, ambos utilizando animais $\frac{1}{2}$ Angus x $\frac{1}{2}$ Nelore. Entretanto, corrobora com estudos que utilizaram animais do mesmo grupo genético, observado em trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2009). Essa diferença pode estar relacionada com a genética (LEIGHTON *et al.*, 1989; PASSAFARO *et al.*, 2015) e com o desafio proporcionado pelo ambiente, condições climáticas e estações do ano de cada região (PIMENTEL NETO; FONSECA, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

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 de 25% resistentes, 50% resilientes e 25% suscetíveis, aproximadamente. Proporcionalidade observada de forma diferente no presente estudo, onde aproximadamente metade dos animais avaliados foram classificados como resistentes, sendo observado proporções próximas para os animais suscetíveis e resilientes .

A dinâmica da carga parasitária durante todo o período experimental dos animais resistentes foi inferior aos demais grupos, indicando possivelmente que a interação entre o parasita e o sistema de defesa do hospedeiro pode resultar na morte e eliminação dos vermes (AMARANTE, 2004). Tal fato é explicado pois, os animais resistentes possuem uma resposta imunológica que limita o estabelecimento do parasito e no caso da resiliência, os animais são capazes de conviver com os parasitos com redução mínima de produtividade (ALBERS *et al.*, 1987).

Analisando os dados das coproculturas, as espécies mais frequentes encontradas nas regiões sudeste e centro-oeste são *Cooperia punctata* e *Haemonchus placei* (FELIPPELLI *et al.*, 2014). Soutello *et al.* (2002) verificaram que animais sem tratamento anti-helmíntico, apresentaram maior porcentagem de larvas do gênero *Haemonchus* spp., em relação ao gênero *Cooperia* spp. Fato não observado em nenhum dos grupos, pois no presente estudo as culturas indicaram maior prevalência de larvas do gênero *Cooperia* spp., seguido por *Haemonchus* spp., resultado semelhante ao estudo realizado por Araujo e Lima (2005) e Stromberg *et al.* (2012), o qual além da prevalência do gênero, os dados obtidos sugerem que *C. punctata* tem um efeito deletério tanto no apetite quanto na absorção ou utilização de nutrientes.

A metilação do DNA é uma importante modificação que afeta a expressão gênica pelas regulações epigenéticas. De acordo com Bernstein *et al.* (2007), esse tipo de variação epigenética tem sido associada à regulação da expressão gênica, à defesa do genoma, diferenciação celular, inativação da cromatina e *imprinting* genômico.

Há somente um relato na literatura que relaciona a resistência parasitária de bovinos e a metilação global do DNA (SOUTELLO *et al.*, 2022). Sendo encontrados poucos estudos com animais de produção envolvendo metilação global e outras características, tais como: investigação da ocorrência de eventos epigenéticos envolvidos na resistência anti-helmíntica do *Haemonchus contortus*

em ovinos (NICIURA *et al.*, 2018), relação da metilação do DNA do sangue e desempenho de vacas leiteiras (WANG *et al.*, 2019) e análise do perfil de metilação do gene da resistência parasitária em equinos (PIRES *et al.*, 2021).

No entanto, no presente estudo foi possível correlacionar as quantificações de DNA metilado e OPG, onde animais com maior grau de helmintose apresentaram menor quantidade de DNA metilado, podendo constatar a hipótese estudada, corroborando com os resultados observados em estudo realizado por Soutello *et al.* (2022), onde foi comprovada a relação do grau de resistência dos animais a parasitas usando o conteúdo global de metilação do DNA.

8 CONCLUSÃO

As metodologias utilizadas possibilitaram a identificação dos animais quanto ao grau de infecção por helmintos gastrintestinais, possibilitando relacionar a resistência de bovinos à helmintos com a quantidade de metilação global do DNA. Sendo estes resultados promissores que poderão auxiliar a realização de mais estudos sobre os mecanismos epigenéticos, possibilitando tornarem-se uma ferramenta para a seleção de bovinos resistentes a parasitas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, G. A. A.; GRAY, G. D.; PIPER, L. R.; BARKER, J. S. F.; LE JAMBRE, L. F.; BARGER, I. A. The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* in young Merino sheep. **Int. J. Parasitol.**, [S. l.], 1987.

AMARANTE, A. F. T. Resistência genética a helmintos gastrintestinais. *In*: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, Pirassununga. **Anais** [...]. Pirassununga: [s.n.], p. 1-10, 2004.

AMARANTE, A. F. T. Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. **Anais** [...]. Ouro Preto: [s.n.], p.249, 2004.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria/Agros Comunicação, 2021. 220 p.

ARAUJO, R. N. Infecções helmínticas em um rebanho leiteiro na região Campo das Vertentes de Minas Gerais. **Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoo**, [S. l.], 2015.

ASHWELL, C. M.; ANGEL, R. Nutritional genomics: a practical approach by early life conditioning with dietary phosphorus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S. l.], v. 39, p. 268-278, 2010.

BASTOS, J. A. R.; PINTO, R.; FAUSTO, G. C.; PONTES, K. C. S.; NONATO, I. BERNSTEIN, B.R.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. The mammalian epigenome. **Cell.**, [S. l.], v.23, p. 69-81, 2007.

BIANCHIN, I. Controles estratégicos dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte no Brasil. **Hora Veterinária**, [S. l.], v. 39, p. 49-53, 1987.

BIANCHIN, I. Epidemiologia dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte nos cerrados e o controle estratégico no Brasil. *In*: CONTROLE dos nematódeos gastrointestinais de bovinos. [S. l.]: EMBRAPA, 1996. p. 113-156.

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, 2011.

BOUIX, J.; KRUPINSKI, J.; REZEPECKI, R. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Polish long-wool sheep. **Int. J. Parasitol.**, [S. l.], v. 28, p. 1797-1804, 1998.

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

- 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**, [S. l.], v. 48, 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**, [S. l.], v. 33, p. 121-130, 2019.
- CATTO, J. B.; BIANCHIN, I.; SANTURIO, J. M.; FEIJÓ, G. L. D.; KICHEL, A. N.; SILVA, J. M. Sistema de pastejo rotenona e controle de parasitas: Efeito sobre o ganho de peso e nível de parasitismo em bovinos cruzados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], 2008.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 44, p. 35–44, 1992.
- 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 antihelmíntica e do desenvolvimento ponderal de bezerros tratados com diferentes avermectinas de longa ação. **A Hora Veterinária**, [S. l.], v. 24, n. 139, p.31-34, 2004.
- COSTA, F. F. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. **Gene**, [S. l.], v. 410, n. 1, p. 9-17, 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. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 29–33, 2009.
- FANTAPPIE, M. Epigenética e memória celular. **Revista Carbono**, [S. l.], n. 3, 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**, [S. l.], p. 1578-1586, 2003.
- FROMMER, M.; MCDONALD, L. E.; MILLAR, D. S.; COLLIS, C. M.; WATT, F.; GRIGG, G. W.; MOLLOY, P. L.; PAUL, C. L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 89, p. 1827–1831, 1992.

GASBARRE, L. C.; LEIGHTON, E. A.; SONSTEGARD, T., Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes.

Veterinary Parasitology, [S. l.], v. 98, p. 51–64 2001.

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, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

GUERRERO-PRESTON, R.; GOLDMAN, L. R.; BREBI-MIEVILLE, P.; ILI-GANGAS, C.; LEBRON, C.; WITTER, F. R.; APELBERG, B. J.; HERMÁNDEZ-

ROYSTACHER, M.; JAFFE, A.; HALDEN, R. U. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. **Epigenetics**, [S. l.], v. 5, p. 539-546, 2010.

GUIMARÃES, J. D. Testicular shape and andrological aspects of young Nellore bulls under extensive farming. **Revista Brasileira Zootecnia**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 612-617, 2012.

HEINZEN, E. L.; PEIXOTO, E. C. T. M.; JARDIM, J. G.; GARCIA, R. C.; HEPBURN, A.G.; BELANGER, F.C.; MATTHEIS, J.R. DNA methylation in plants. **Developmental Genetics**, [S. l.], v. 8, p. 475-493, 1987.

HOFFMANN, A.; MORAES, E. H. B. K.; MOUSQUER, C. J.; SIMIONI, T. A.; GOMES, F. J.; FERREIRA, V. B.; SILVA, H. M. Produção de bovinos de corte no sistema de pasto-suplemento no período seco. **Nativa**, [S. l.], v. 2, p.119-130, 2014.

JIMENEZ-SANZ, A.; QUIRINO, C. R.; PACHECO, A.; COSTA, R. L. D.; DABELTRAME, R. T.; RUA, M. A. S.; SILVA, R. M. C.; MADELLA-OLIVEIRA, K. J. J.; HARVEY, W.J.; BRUS, L. M. **Bioquímica Clínica de Animais Domésticos**. 5. ed. Cambridge: Academic Press, 1997.

KANOBANA, K.; PLOEGER, H. W.; VERVELDE, L. Immune expulsion of the trichostrongylid *Cooperia oncophora* is associated with increased eosinophilia and mucosal IgA Int. **Journal Parasitology**, [S. l.], v. 32, p. 1389–1398, 2002.

KEITH, R. K. The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. **Australian Journal of Zoology**, [S. l.], v. 1 (2), p. 223-235, 1953.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends Biochem Sci**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 89-97, 2006.

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**, [S. l.], v. 190, p. 1-11, 2012.

MAMPUMBU, A. R. **Condensação cromatínica e metilação de DNA investigadas em abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Melipona rufiventris* (Hymenoptera, Apoidea)**. 2006. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.

MCCLELLAND, M.; NELSON, M.; RASCHKE, E. Effect of sitespecific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. **Nucleic Acids Res**, [S. l.], v. 22, p. 3640–3659, 1994.

MCVEIGH P. Post-genomic progress in helminth parasitology. **Parasitol.**, [S. l.], 2020.

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**, [S. l.], 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. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

NEVES, J. H. **Diagnóstico de resistência anti-helmíntica em bovinos**. 2014. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2014.

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. **Análise genômica da resistência ao monepantel e investigação epigenética em *Haemonchus contortus***. 1. ed. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2018.

OLIVEIRA, N. T. E.; ORSI, R. O. Extrato de própolis no controle de helmintoses em bezerros. **Acta Veterinaria Brasilica**, [S. l.], p. 40–44, 2012.

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, **Pesq. Vet. Bras.**, [S. l.], v. 140, n. 3-4, p. 289-295, 2017.

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**, [S. l.], v. 20, n. 120, p. 29-32, 2001.

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**, [S. l.], v. 68, n. 262, p. 304– 311, 2019.

PAIVA, J. T.; RESENDE, M. D. V.; RESENDE, R. T.; OLIVEIRA, H. R.; SILVA, Parasitic helminth infection in young cattle raised on silvopasture and openpasture in Southeastern Brazil. **Agroforestry Systems**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 53–62, 2014.

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 Nellore cattle. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], 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.

PIMENTEL NETO, M., FONSECA, A. H. Epidemiologia das helmintoses pulmonares e gastrintestinais de bezerros em região de baixada do Estado do Rio de Janeiro. **Pesq. Vet. Bras**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 148–152, 2002.

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

PIRES, VERÔNICA S.; DE O. GANZELLA, FERNANDO A.; MINOZZO, GUILHERME A.; DIAS DE CASTRO, LUCIANA L.; MONCADA, ANGIE D.B.; KLASSEN, GISELI; RAMOS, EDNEIA A.S.; MOLENTO, MARCELO B. PIRES, VERÔNICA S.; DE O. GANZELLA, FERNANDO A.; MINOZZO, Epigenetic regulation of SLC11a1 gene in horses infected with cyathostomins. **Gene reports**, [S. l.], v. 25, p. 101 - 110, 2021.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and humandisease. **Nature biotechnology**, [S. l.], v. 18, n. 10, p. 1057-68, 2010.

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

REYNA-LOPEZ, G. E.; SIMPSON, J.; RUIZ-HERRERA, J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphism. **Mol. Gen. Genet**, [S. l.], v. 253, p. 703-710, 1997.

ROBERTS, 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**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 99-192, 1950.

RODRIGUES, M. S.; SILVA, F. C.; BARREIRA, L. P.; KOVACS, A. SALLOVITZ, J.; LANUSSE, C. Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of a sustained-release bolus to cattle. **Res. Vet. Sci**, [S. l.], v. 66, p. 57–61, 2006.

ROYSTACHER, M.; JAFFE, A.; HALDEN, R.U. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. **Epigenetics**, [S. l.], v. 5, p. 539-546, 2010.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSH, E.F. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2.ed. New York, 1989.

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**, [S. l.], 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, 2001. 158 p.

SHOOP, W.; SOLL, M. Química, farmacologia e segurança das lactonas macrocíclicas. **Lactonas macrocíclicas na terapia antiparasitária. Estagiário do CAB**, pág. 1-29, 2002.

SIQUEIRA, J. B.; OBA, E.; PINHO, R. O.; GUIMARÃES, S. E. F.; NETO, T. M.; SONSTERGARD, T. S.; GASBARRE, L.C. Genomic tools to improve parasite resistance. **Veterinar Parasitology**, [S. l.], v. 101, p. 387-403, 2001.

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. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção Animal). Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2001.

SOUTELLO, R. V. G.; RODRIGUES, M. G. F.; GONÇALVES, J. A.; BELLO, J. S.; PAVAN, B. E.; RAMOS, E. S. Metilação genômica global relacionada ao grau de parasitismo em bovinos. **Sci. Rep.**, [S. l.], p. 18135, 2022.

STOTZER, E. S.; LOPES, L. B.; ECKSTEIN, C.; MORAES, M. C. M. M. De; STROMBERG, B. E.; GASBARRE, L. C.; WAITE, A.; BECHTOL, D. T.; BROWN, susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. **Small Ruminants Research**, [S. l.], n. 55, p. 65-75, 2004.

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**, [S. l.], p. 345–57, 1979.

TCHURIKOV, N. Molecular mechanisms of epigenetics. **Biochemistry**, Moscow, v. 70, n. 4, p. 406-423, 2005.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Tokyo: 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. p. 223.

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**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 885–895, 1978.

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

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 21, p. 4407-4414, 1995.

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**, [S. l.], v. 126, n. 3, p. 277–289, 2006.

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**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 577–590, 2014.