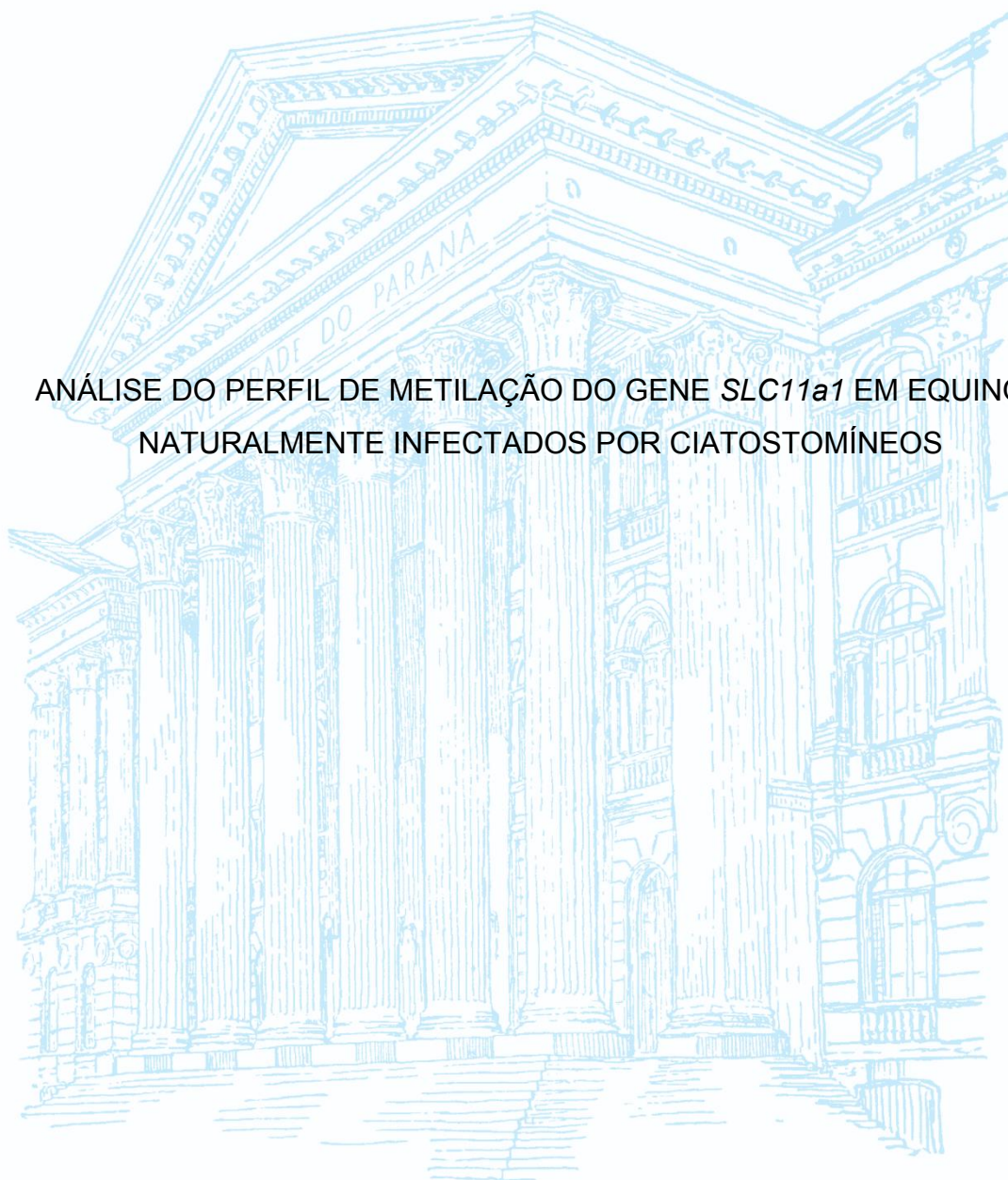


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUILHERME AUGUSTO MINOZZO

ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE *SLC11a1* EM EQUINOS  
NATURALMENTE INFECTADOS POR CIATOSTOMÍNEOS



CURITIBA

2018

GUILHERME AUGUSTO MINOZZO



ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE *SLC11a1* EM EQUINOS  
NATURALMENTE INFECTADOS POR CIATOSTOMÍNEOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Setor Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Edneia A S R Cavalieri

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR -  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, DOUGLAS ALEX JANKOSKI CRB 9/1167  
COM OS DADOS FORNECIDOS PELO (A) AUTOR (A)

M666a Minozzo, Guilherme Augusto  
Análise do perfil de metilação do gene *SLC11a1* em equinos naturalmente infectados por ciatostomíneos / Guilherme Augusto Minozzo. - Curitiba, 2018.  
115 f.: il., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Orientador: Marcelo Beltrão Molento

Coorientadora: Edneia Amancio de Souza Ramos Cavalieri

1. Parasitologia veterinária. 2. Gene SLC11A1. 3. Metilação do DNA. 4. Equino - Parasito. I. Molento, Marcelo Beltrão. II. Cavalieri, Edneia Amancio de Souza Ramos. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDU 619: 636.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **GUILHERME AUGUSTO MINOZZO** intitulada: **ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE SLC11a1 EM EQUINOS NATURALMENTE INFECTADOS POR CIATOSTOMÍNEOS**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Março de 2018.

MARCELO BELTRÃO MOLENTO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARCIA KIYOE SHIMADA

Avaliador Externo (UFPR /DPB)

LARISSA REIFUR

Avaliador Externo (UFPR /DPB)

## **AGRADECIMENTOS**

Gratidão a Deus, porque Ele que dá sentido à vida e me proporcionou essa gratificante oportunidade.

Gratidão a Nossa Senhora, a quem sempre recorri e recorro em todos os momentos da minha vida.

Gratidão a meu pai João Carlos Minozzo e à minha mãe Albina Lurdes Mattana Minozzo, pois sem o apoio, o carinho, a parceria e o amor deles nada disso teria sido possível. Eles me dão uma força incrível para continuar nos trabalhos, e devo minha vida e minhas conquistas a eles.

Gratidão à minha irmã Carla Eloisa Minozzo, a qual sempre esteve comigo, nos momentos bons e ruins. A ela sou grato por todo o carinho, companhia, amor e pelas ajudas que recebi, principalmente com formatação e imagens.

Gratidão à minha namorada Fernanda Muhlstedet Carrico, que sempre esteve comigo, sendo muito parceira e me estimulando a continuar mesmo diante das dificuldades. Esta conquista é nossa Fernanda, pois você sempre esteve ao meu lado, do início ao fim do mestrado.

Gratidão a Aparecido Arruda, a Erivelton Carrico, a Marcia Muhlstedet Carrico, a Gustavo Muhlstedet Carrico e a Maria Mafalda Ripka Muhlstedet, por todo auxílio e estímulo ofertados durante os dois últimos anos.

Gratidão ao Professor Marcelo Beltrão Molento, pela oportunidade a mim confiada, pelo estímulo e apoio constante, pela compreensão mesmo com a disponibilidade de tempo reduzida no segundo ano do mestrado, e pela responsabilidade a mim direcionada.

Gratidão a Professora Edneia Amancio de Souza Ramos Cavalieri, a qual sempre esteve disposta a me ensinar sobre o mundo da epigenética, a qual foi peça-chave para o andamento da pesquisa e que sempre foi solícita a me ajudar quando foi necessário.

Gratidão ao Estatístico, Professor e Doutor José Carlos Coninck pela ajuda na estatística do trabalho, pela imensa disponibilidade de me ajudar em momentos de fim de semana e durante a noite, pela extrema competência e profissionalismo que demonstrou em todos os momentos.

Gratidão a todo apoio técnico, pessoal e intelectual à equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, Setor Ciências Agrárias da UFPR.

Gratidão à Doutora Luciana Laitano Dias de Castro, a qual me ajudou de forma direta na pesquisa, na coleta das amostras e com auxílio intelectual.

Gratidão a todo apoio técnico, pessoal e intelectual à equipe do Laboratório de Epigenética, principalmente as alunas mestranda Angie Becerra e doutoranda Andressa Chequin do Departamento Patologia Básica, Setor Ciências Biológicas da UFPR.

Gratidão à Universidade Federal do Paraná, a qual me concedeu a oportunidade de conseguir o título de mestre.

Gratidão ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFPR, aos seus funcionários, professores e alunos, que fizeram parte dessa etapa da minha vida.

Agradecimento ao Haras São José da Serra pela disponibilidade em colaborar com a pesquisa, fornecendo gentilmente as amostras de cavalos PSI.

Agradecimento ao Rancho JB pela disponibilidade em colaborar com a pesquisa, fornecendo gentilmente as amostras de cavalos Crioulo.

Agradecimento a Capes pelo estímulo e incentivo financeiro ao projeto através de concessão de bolsa de mestrado.

## RESUMO

Os ciatostomíneos são os parasitos nematóides mais prevalentes em equinos. A infecção por esses parasitos causa prejuízos na criação de equinos, prejudicando o desempenho dos animais, podendo levar ao óbito. O gene *SLC11a1* (*Solute Like Carrier Family 11a1*) está relacionado com a resistência natural do hospedeiro aos patógenos. As características fenotípicas dos animais podem ser influenciadas por mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA. O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de metilação do DNA no gene *SLC11a1* em equinos com alta e baixa contagem de ovos de ciatostomíneos por grama de fezes (OPG). Realizou-se esse exame coproparasitológico de 30 animais da raça Puro Sangue Inglês (PSI) e de 44 cavalos Crioulo. Destes, selecionou-se alguns animais de cada raça, sendo 6 PSI e 3 Crioulo. Os animais selecionados foram os que apresentaram as menores e as maiores contagens de OPG. Desses animais foram pesquisados o perfil de metilação do gene *SLC11a1*. Além disso, desses e outros animais foram realizados um teste ELISA para detectar IgGs contra as formas larvares de ciatostomíneos encistadas na mucosa. Foram observadas correlações entre a OPG e o ELISA fraca, moderada e forte para as categorias de animais PSI com OPG menores, intermediários e maiores respectivamente com  $R=0,189$ ;  $R=0,372$  e  $R=-0,547$  respectivamente. Nas mesmas três categorias dos animais Crioulos (menores, intermediários e maiores OPG) as correlações entre os dois testes foram fracas com  $R=0,136$ ;  $R=0,280$  e  $R=0,025$  respectivamente (sendo que abaixo de 0,3 é baixa; entre 0,3 e 0,5 é moderada; acima de 0,5 é alta; e zero é sem relação). Somente para os animais da raça PSI, avaliou-se também o hematócrito (Ht), contagem diferencial de leucócitos (CDL) e número de prêmios em corridas (somente para éguas PSI adultas). Os resultados de Ht (var. 34 – 46) e CDL se mostraram dentro dos valores de referência na quase totalidade dos animais. As análises *in silico* mostraram que o gene *SLC11a1* possui duas ilhas de CpG no corpo do gene de equinos. Após a coleta do sangue dos animais, realizou-se a extração do DNA leucocitário e posterior tratamento com bissulfito de sódio. Ambas as ilhas de CpG foram amplificadas por PCR, purificadas, clonadas e sequenciadas. Os resultados do sequenciamento demonstraram o mesmo padrão de metilação entre os animais com as maiores e as menores contagens de OPG na ilha um (com  $P=1.0$ ) e na ilha dois (com  $P=0.105$ ) do gene. A raça dos animais também não influenciou nos resultados de metilação do DNA tanto para a ilha um ( $P=0.595$ ) quanto para a ilha dois ( $P=0.639$ ). Houve diferença significativa entre o perfil de metilação da ilha um de CpG e da ilha dois, com  $P=0.0001$ . A ilha um do gene se apresentou hipermetilada (>75%) enquanto a ilha dois mostrou-se hipometilada (<30%). Os achados permitiram concluir a ausência de correlação forte entre OPG e o ELISA, a ausência de influência da metilação do DNA na contagem de OPG e indicam uma possibilidade de haver regulação epigenética por metilação do DNA no gene *SLC11a1* em equinos.

Palavras-chave: Doenças parasitárias. Gene *SLC11a1*. Metilação do DNA. Bissulfito de sódio. Regulação Epigenética. Equinos.

## ABSTRACT

Cyathostomins are the most prevalent nematodes parasites in horses. The infection by these parasites causes damages in the breeding of horses, damaging the performance of the animals, and can lead to death. The gene *SLC11a1* (*Solute Like Carrier Family 11a1*) is related to the host's natural resistance to pathogens. The phenotypic characteristics of the animals may be influenced by epigenetic mechanisms, such as DNA methylation. The objective of this work was to evaluate the profile of DNA's methylation on the *SLC11a1* gene in horses with high and low egg counts of cyathostomins per gram of feces (EPG). This coproparasitological exam was performed on 30 animals of the Thoroughbred and on 44 Crioulo's horses. Of these, some animals of each breed were selected, being 6 Thoroughbred and 3 Crioulo. The animals selected were the ones with the lowest and the highest EPG counts. From these animals, it was studied the profile of methylation of the *SLC11a1* gene. Besides that, from these and another animals they were performed the ELISA test to detect IgGs against the encysted larval forms of cyathostomins. They were observed weak, moderate and strong correlations between the EPG and the ELISA for the categories of PSI animals with lower, intermediate and higher EPG, respectively, with  $R=0.189$ ;  $R=0.372$  and  $R=-0.547$  respectively. In the same three categories of Crioulo animals (lower, intermediate and higher EPG) the correlations between the two tests were weak with  $R=0.136$ ;  $R=0.280$  and  $R=0.025$  (being below 0.3 is low, between 0.3 and 0.5 is moderate, above 0.5 is high, and 0 is unrelated). Only for the PSI animals, the hematocrit (Ht), differential leukocyte count (CDL) and number of prizes in races (only for adult Thoroughbred mares) were also evaluated. The results of Ht (var. 34-46) and CDL were within the reference values in almost all animals. *In silico* analyzes showed that the *SLC11a1* gene has two CpG islands in the body of the gene. After collection of blood from the animals, the leukocyte DNA was extracted and then treated with sodium bisulfite. Both CpG islands were amplified by PCR, purified, cloned and sequenced. Sequencing results showed the same pattern of methylation between the animals with the highest and lowest EPG counts on island 1 (with  $P = 1.0$ ) and island 2 (with  $P = 0.105$ ). The breed of the animals did not influence the DNA's methylation results for both island 1 ( $P = 0.595$ ) and island 2 ( $P = 0.639$ ). There was a significant difference between the DNA's methylation of island 1 of CpG and island 2, with  $P = 0.0001$ . Island 1 of the gene was hypermethylated (>75%) while island 2 was hypomethylated (<30%). The findings made it possible to conclude the absence of strong correlation between EPG and the ELISA, the absence of DNA's methylation influence on the EPG counts and indicate a possibility of epigenetic regulation by DNA's methylation on the *SLC11a1* gene in horses.

Key Words: Parasitics diseases. *SLC11a1* gene. DNA's methylation. Sodium bisulfite. Epigenetics. Horse.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- METILAÇÃO DA CITOSINA. ....	18
FIGURA 2- CAVALO CRIOULO (A) E CAVALO PURO SANGUE INGLÊS (B). ....	22
FIGURA 3- CICLO DE VIDA DOS CIATOSTOMÍNEOS E POTENCIAL AÇÃO PATOGENICA.....	24
FIGURA 4- GRANULOMAS PROVOCADOS PELA FASE LARVAL DE CIATOSTOMÍNEOS. ....	25
FIGURA 5- PAPEL DO MACRÓFAGO NA FORMAÇÃO DO GRANULOMA. ....	29
FIGURA 6- RESPOSTAS DE IgG PARA AS PROTEÍNAS GALA RECOMBINANTES MEDIDAS PELO ELISA. ....	31
FIGURA 7- ILUSTRAÇÃO DO GENE <i>SLC11a1</i> DE EQUINO. ....	33
FIGURA 8- ILUSTRAÇÃO DA PROTEÍNA DE MEMBRANA CODIFICADA PELO GENE <i>SLC11a1</i> . ....	34
FIGURA 9- ÁRVORE FILOGENÉTICA DA PROTEÍNA SLC11A1 EM ESPÉCIES DE EQUÍDEOS. ....	35
FIGURA 10- ILHAS DE CpG E CpG ISOLADOS EM UM GENE .....	40
FIGURA 11- MAPA DO ESTADO DO PARANÁ COM A LOCALIZAÇÃO DOS MUNICÍPIOS EM QUE ESTÃO LOCALIZADOS OS LOCAIS DE CRIAÇÃO DOS CAVALOS UTILIZADOS NO TRABALHO. ....	43
FIGURA 12- MAPAS DO ESTADO DO PARANÁ COM IDENTIFICAÇÃO DOS DIFERENTES RELEVOS E ALTITUDES (A) E QUANTO A GEOMORFOLOGIA DO ESTADO (B). ....	44
FIGURA 13- ANÁLISE DO GENE <i>SLC11a1</i> PELO CPGPLOT, DO NUCLEOTÍDEO 01 AO 9561, QUANTO AOS CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DE UMA ILHA CpG .....	49
FIGURA 14- DIAGRAMA SOBRE O TRATAMENTO DO DNA DA AMOSTRA COM BISSULFITO DE SÓDIO .....	51
FIGURA 15- ILUSTRAÇÃO DAS ILHAS 1 E 2 DE CpG DO GENE <i>SLC11a1</i> DE EQUINOS.....	52
FIGURA 16- CONDIÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA DURANTE AS FASES DA REAÇÃO DE PCR PARA OS FRAGMENTOS DE DNA DA ILHA 1 E 2 DE CpG .....	53

FIGURA 17- FRAGMENTO DE DNA DA ILHA 1 DE CpG DO GENE <i>SLC11a1</i> COM A LOCALIZAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS .....	53
FIGURA 18- FRAGMENTO DE DNA DA ILHA 2 DE CpG DO GENE <i>SLC11a1</i> COM A LOCALIZAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS .....	54
FIGURA 19- CONDIÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA DE UMA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIAS. ....	56
FIGURA 20- CONDIÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA DA REAÇÃO DE PCR PARA O SEQUENCIAMENTO DO DNA .....	58
FIGURA 21- EXEMPLO DO PERFIL DE METILAÇÃO DE UMA AMOSTRA QUE CORRESPONDE A COLÔNIAS QUE CONTÉM O FRAGMENTO DE DNA DA ILHA 2 DE CpG DO ANIMAL PSI 41. ....	59
FIGURA 22- QUADRO COM AS CORRELAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE OPG, ELISA, Ht E CDL DOS CAVALOS PSI, CONSIDERANDO OS ANIMAIS POTROS E ADULTOS (n=51).....	66
FIGURA 23- GRÁFICO DA CORRELAÇÃO DOS VALORES DE ELISA E OPG DOS CAVALOS PSI, SEPARADOS EM TRÊS GRUPOS DE ACORDO COM O OPG .....	68
FIGURA 24- GRÁFICO DA CORRELAÇÃO DOS VALORES DE ELISA E OPG DOS CAVALOS CRIOULO, SEPARADOS EM TRÊS GRUPOS DE ACORDO COM O OPG. ....	72
FIGURA 25- QUADRO COM AS CORRELAÇÕES ENTRE OPG, ELISA, Ht, NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS, LINFÓCITOS, EOSINÓFILOS E NÚMERO DE PRÊMIOS EM PROVAS DE CORRIDA PARA AS ÉGUAS ADULTAS DA RAÇA PSI. ....	74
FIGURA 26- DIAGRAMA DA ESTRUTURA GENÔMICA DO GENE EQUINO <i>SLC11a1</i> COM A LOCALIZAÇÃO DOS EXONS, INTRONS E DAS ILHAS DE CpG .....	75
FIGURA 27- GEL DE PRODUTO DE PCR DO FRAGMENTO DE DNA DA ILHA 1 DO GENE <i>SLC11a1</i> DE EQUINOS .....	76
FIGURA 28- GEL DE PRODUTOS DE PCR PURIFICADOS DA ILHA 1 DO GENE <i>SLC11a1</i> .....	77
FIGURA 29- GEL DE POLIACRILAMIDA DE PCR DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS <i>E. coli</i> DH10B .....	78

FIGURA 30- GEL DE AGAROSE APÓS A EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS <i>E. coli</i> DH10B .....	78
FIGURA 31- ILUSTRAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE DNA DE UMA DAS AMOSTRAS DA ILHA 2 DO GENE <i>SLC11a1</i> APÓS O SEQUENCIAMENTO E ALINHAMENTO ATRAVÉS DO PROGRAMA <i>ClustalW</i> .....	79
FIGURA 32- GRÁFICO DOS RESULTADOS DE METILAÇÃO DAS ILHAS 1 E 2 DE CpG DO GENE <i>SLC11a1</i> .....	86
FIGURA 33- MANEJO DE CAVALOS PSI NO HARAS SÃO JOSÉ DA SERRA ....	113
FIGURA 34- ÉGUAS PSI DO HARAS SÃO JOSÉ DA SERRA.....	113
FIGURA 35- MANEJO DOS CAVALOS CRIoulos JOVENS DO RANCHO JB. ...	114
FIGURA 36- ÉGUAS DA RAÇA CRIOULO DO RANCHO JB. ....	114

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- QUADRO COMPARATIVO ENTRE AS PROPRIEDADES DOS ANIMAIS UTILIZADOS NO TRABALHO.....	45
TABELA 2- GENES PESQUISADOS QUANTO À SUA FUNÇÃO DE DEFESA NO ORGANISMO DO EQUINO, APRESENTANDO RELAÇÃO COM O PARASITISMO .....	48
TABELA 3- RESULTADO DA CONTAGEM DE OPG DE ESTRONGILÍDEOS E <i>PARASCARIS</i> DOS POTROS PSI DA GERAÇÃO 2014 .....	60
TABELA 4- RESULTADO DE OPG DE ESTRONGILÍDEOS E DO TESTE ELISA DOS CAVALOS DA RAÇA CRIOULO, COM O NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO, SEXO E IDADE DE CADA ANIMAL .....	61
TABELA 5- IDENTIFICAÇÃO DOS CAVALOS SELECIONADOS PARA A PESQUISA DE METILAÇÃO DO DNA SEPARADOS POR RAÇA, E OS RESPECTIVOS VALORES DE OPG (OVOS POR GRAMA DE FEZES) .....	63
TABELA 6- RESULTADOS DE OPG DE ESTRONGILÍDEOS DOS ANIMAIS PSI (DATA 05/11/2015), RESULTADOS DE HEMATÓCRITO E CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS (04/11/2015), RESULTADOS DO ELISA DO SORO DO SANGUE COLETADO NESSA DATA, ALÉM DA IDENTIFICAÇÃO, DO SEXO E DA IDADE DE CADA UM.....	64
TABELA 7- VALOR DE PROBABILIDADE (p) DOS RESULTADOS DE OVOS POR GRAMA DE FEZES (OPG), ELISA, HEMATÓCRITO (Ht), NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS E EOSINÓFILOS ENTRE DIFERENTES CATEGORIAS; POTROS E ANIMAIS ADULTOS DA RAÇA P S INGLÊS.....	65
TABELA 8- RESULTADOS DE OPG E ELISA DOS CAVALOS PSI E SEPARAÇÃO EM TRÊS GRUPOS DE ACORDO COM O OPG .....	67
TABELA 9- RESULTADOS DE OPG DE ESTRONGILÍDEOS DOS ANIMAIS CRIOULO E RESULTADOS DO ELISA DO SORO DO SANGUE, ALÉM DA IDENTIFICAÇÃO, DO SEXO E DA IDADE DE CADA UM .....	69
TABELA 10- RESULTADOS DE OPG E ELISA DOS CAVALOS CRIoulos E SEPARAÇÃO EM TRÊS GRUPOS DE ACORDO COM O OPG .....	71
TABELA 11- RESULTADOS DO NÚMERO DE PRÊMIOS EM PROVAS DE CORRIDA PARA ÉGUAS PSI, ALÉM DOS RESULTADOS DE OPG, ELISA, Ht E CDL .....	73

TABELA 12- CONCENTRAÇÃO DE DNA (ng/μL) DAS AMOSTRAS, COM A IDENTIFICAÇÃO DAS RAÇAS DOS CAVALOS.....	75
TABELA 13- PERCENTUAL DE METILAÇÃO GLOBAL DO DNA DE CAVALOS PURO SANGUE INGLÊS CUJOS NÚMEROS DE IDENTIFICAÇÃO SÃO: 33; 36; 41; 46; 51 E 60, E CAVALOS CRIOULO CUJOS NÚMEROS DE IDENTIFICAÇÃO SÃO: 77; 81 E 86, SEPARADOS QUANTO A ILHA DE CpG .....	80
TABELA 14- AMOSTRAS DE ANIMAIS DA RAÇA PSI (Nº 33; 36; 41; 46; 51 E 60) E CRIOULO (Nº 77; 81 E 86) QUE FORAM ANALISADAS QUANTO AO PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL (EM %) E SEPARADAS QUANTO A ILHA DE CpG. A TABELA TAMBÉM INCLUI VALOR DE OPG, IDADE E O SEXO DOS ANIMAIS .....	82
TABELA 15- PERCENTUAL DE METILAÇÃO (%) DAS AMOSTRAS DE ANIMAIS COM BAIXO OPG PARA CIATOSTOMÍNEOS, SEPARADOS PELAS ILHAS DE CpG DE AMBAS AS RAÇAS .....	82
TABELA 16- RESULTADOS DO PERCENTUAL DE METILAÇÃO (%) DAS AMOSTRAS DE ANIMAIS COM ALTO VALOR DE OPG PARA CIATOSTOMÍNEOS, SEPARADOS PELAS ILHAS DE CpG DAS DUAS RAÇAS ANALISADAS .....	83
TABELA 17- PERCENTUAL DE METILAÇÃO (%) DAS AMOSTRAS DA ILHA 1 DE CpG DOS EQUINOS COM BAIXOS E ALTOS VALORES DE OPG DAS RAÇAS ANALISADAS .....	84
TABELA 18- PERCENTUAL DE METILAÇÃO (%) DAS AMOSTRAS DA ILHA 2 DE CpG DOS EQUINOS COM BAIXOS E ALTOS VALORES DE OPG DAS RAÇAS ANALISADAS .....	84
TABELA 19- RESULTADO QUANTITATIVO DO NÚMERO DE AMOSTRAS COM BAIXA E ALTA METILAÇÃO DO DNA QUANTO AS ILHAS 1 E 2 DE CpG, MOSTRANDO DIFERENÇA ESTATÍSTICA COM $p < 0,05$ .....	85

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1- HARAS SÃO JOSÉ DA SERRA, SÃO JOSÉ DOS PINHAIS .....	113
ANEXO 2- RANCHO JB, PALMEIRA.....	114
ANEXO 3- COPROCULTURA PELA TÉCNICA DE ROBERTS E O’SULLIVAN ....	115
ANEXO 4- PROTOCOLO DE ELISA .....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS

BZ	- Benzimidazóis
CpG	- Citosina - fosfato – Guanina
CTM	- <i>Consensus Transport Motif</i>
DMR	- Região diferentemente metilada
DNMT	- DNA metiltransferase
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GALA	- Antígeno associado ao intestino de larvas de ciatostomíneos
HEpD	- The Horse Epigenome Database
IgE	- Imunoglobulinas E
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzida
LM	- Lactonas Macroclícas
MHC II	- Complexo de histocompatibilidade classe II
MS	- Matéria seca
NO	- Óxido nítrico
<i>NRAMP1</i>	- <i>Natural resistance associated macrophage protein 1</i>
OPG	- Ovos por grama de fezes
PCR	- Reação em cadeia da Polimerase
PSI	- Puro Sangue Inglês
SAM	- s-adenosilmetionina
<i>SLC11a1</i>	- <i>Solute like carrier Family 11a1</i>
THP	- Tetraidropirimidina
TM	- Transmembranares
TNF $\alpha$	- Fator de necrose tumoral $\alpha$
5meC	- 5 metil citosina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>20</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
3.1	A IMPORTÂNCIA DA EQUINOCULTURA.....	21
3.2	INFECÇÕES POR PARASITOS CIATOSTOMÍNEOS EM CAVALOS.....	22
3.3	A RESPOSTA IMUNE ASSOCIADA À INFECÇÃO POR CIATOSTOMÍNEOS.....	27
3.4	TESTE ELISA PARA DIAGNÓSTICO DE CIATOSTOMÍNEOS.....	29
3.5	HEMATÓCRITO E A CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NA INFECÇÃO POR CIATOSTOMÍNEOS.....	32
3.6	O GENE <i>SLC11a1</i> EM EQUINOS.....	33
3.7	A PROTEÍNA SCL11a1 E A FUNÇÃO NO SISTEMA IMUNE.....	35
3.8	O PAPEL DO GENE <i>SCL11a1</i> NA MEDICINA VETERINÁRIA.....	36
3.9	EPIGENÉTICA.....	38
3.10	METILAÇÃO DO DNA.....	38
3.11	INFLUÊNCIA DA EPIGENÉTICA NA MEDICINA VETERINÁRIA.....	41
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
4.1	ANIMAIS E LOCAIS DE MANUTENÇÃO.....	43
4.2	COMITÊ DE ÉTICA.....	45
4.3	AMOSTRAS DE FEZES E SANGUE.....	45
4.4	EXAME COPROPARASITOLÓGICO.....	46
4.5	TESTE ELISA, HEMATÓCRITO (HT), CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS (CDL) E RESULTADOS DE COMPETIÇÕES ESPORTIVAS.....	47
4.6	ESCOLHA DO GENE DE ESTUDO A PARTIR DA ANÁLISE DO GENOMA DE EQUINO.....	47
4.7	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO GENE <i>SCL11a1</i> .....	49
4.8	EXTRAÇÃO DE DNA DA CAMADA DE LEUCÓCITOS.....	50
4.9	TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO.....	50
4.10	AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CPG DO GENE <i>SCL11a1</i> .....	51

4.11	PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA E LIGAÇÃO AO VETOR.....	54
4.12	CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA.....	55
4.13	EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	56
4.14	ELETOFORESE EM GEL DE AGAROSE E POLIACRILAMIDA.....	56
4.15	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	57
4.16	ANAÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO.....	58
4.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
5.1	QUANTIDADE DE OPG DOS EQUINOS.....	60
5.2	RESULTADOS DE ELISA, HEMATÓCRITO, CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS E A RELAÇÃO COM RESULTADOS DE OPG.....	63
5.3	CORRELAÇÕES ENTRE RESULTADOS DE PROVAS DE CORRIDAS, HEMATÓCRITO, CDL, TESTE DE ELISA E OPG.....	73
5.4	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO: ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO GENE <i>SLC11a1</i> .....	74
5.5	EXTRAÇÃO DE DNA DA CAMADA LEUCOCITÁRIA.....	75
5.6	AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GENE <i>SLC11a1</i> .....	76
5.7	TRANSFORMAÇÃO, CLONAGEM, EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL E SEQUENCIAMENTO.....	77
5.8	ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DAS ILHAS DE CPG 1 E 2 EM PSI E CRIOULO.....	79
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>98</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>113</b>
	ANEXO 1 – HARAS SÃO JOSÉ DA SERRA, SÃO JOSÉ DOS PINHAIS.....	113
	ANEXO 2 –RANCHO JB, PALMEIRA.....	114
	ANEXO 3 - COPROCULTURA PELA TÉCNICA DE ROBERTS E O’SULLIVAN.....	115
	ANEXO 4 - PROTOCOLO DE ELISA.....	116

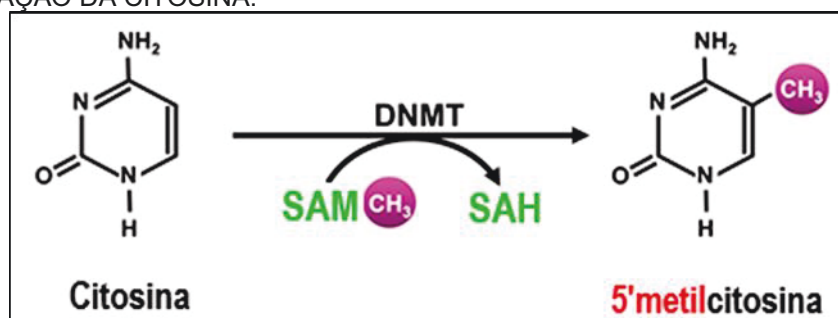
## 1 INTRODUÇÃO

A relação entre o humano e o cavalo começou a mais de 5000 anos atrás. Com o tempo, os equinos se transformaram e evoluíram quanto à forma, tamanho e comportamento, o que tornou mais próxima e importante a relação deles com os humanos (BAILEY e BROOKS, 2013). Uma das mais importantes afecções na clínica médica de equinos é a infecção por ciatostomíneos, popularmente conhecidos como pequenos estrôngilos. Esses parasitos têm alta importância na equinocultura devido a sua elevada incidência e a ocorrência de casos de diarreia e mortes associadas à infecção (RECH, 2003).

Existem algumas técnicas de diagnóstico para a infecção parasitária por equinos, sendo a Técnica de Gordon e Whitlock (1939) modificada amplamente utilizada na rotina em criações de cavalos (CRAIG et al., 2007). Esta técnica permite estimar o nível de infecção parasitária no animal através da contagem de ovos dos parasitos nas fezes e apresenta resultados razoáveis (CRAIG et al., 2007). MITCHELL et al. (2016) desenvolveram um teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent assay*), o qual detecta o nível de anticorpos no soro do animal perante a infecção pela forma larval de ciatostomíneos que ficam encistados na mucosa intestinal, consistindo em um método pioneiro de diagnóstico dessa fase larval nos equinos. Com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre a patogenia dos ciatostomíneos e as respostas que o hospedeiro gera na presença desses parasitos, optou-se por fazer um estudo com epigenética e essa infecção parasitária.

Com grande influência na expressão dos genes, as modificações epigenéticas constituem o epigenoma de eucariotos superiores, e não interferem na sequência de bases nitrogenadas (WADDINGTON, 1942). Os mecanismos epigenéticos compreendem a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas, e a interação dos RNAs não codificantes com a estrutura da cromatina (JONES e TAKAI, 2001). A metilação do DNA (Figura 1) é um dos mecanismos mais estudados da epigenética em mamíferos e consiste na adição de um grupo metil ao carbono 5 da citosina adjacente à guanina, catalisado por um grupo de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) a partir de um substrato obtido da dieta como o ácido fólico, por exemplo (DINDOT e COHEN, 2013).

FIGURA 1- METILAÇÃO DA CITOSINA.



A metilação da citosina ocorre através da ação da DNA metiltransferase (DNMT) que transfere o grupamento metil (CH<sub>3</sub>) da s-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 5' da citosina, tornando-a uma citosina metilada (5 mec).

Fonte: Adaptado de BRANDÃO (2017).

O gene *SLC11a1* (*solute like carrier Family 11a1*) também conhecido como *NRAMP1* (*natural resistance associated macrophage protein 1*) (PRAKASH et al., 2014), produz uma proteína da família 11a1, uma proteína integral trans-membrana transportadora de íons e carreadora de soluto, que é expressa particularmente no fagossomo do macrófago (GRUENHEID, 2000). Essa proteína tem efeitos pleiotrópicos no sistema de defesa dos organismos como o controle da atividade de macrófagos contra agentes patogênicos, tais como os agentes etiológicos da tuberculose em humanos, da leishmaniose em cães e da brucelose em bovinos, durante o estágio inicial da infecção (BLACKWELL, 1994).

ZENG et al. (2015) demonstraram que a regulação epigenética do gene *SLC11a1* teve influência na ativação de macrófagos em casos de tuberculose em humanos. Na medicina veterinária, contudo, não há até o momento, estudos envolvendo mecanismos epigenéticos e o gene *SLC11a1*. Há apenas estudos relacionando alterações genéticas de *SLC11a1*, como polimorfismos e as doenças parasitárias e infecciosas (ex. brucelose bovina) (PAIXÃO, 2012). ARCHER et al. (2015) demonstraram que as alterações genéticas em humanos no gene *SLC11a1*, principalmente polimorfismos, estão associadas com doenças autoimunes e doenças infecciosas.

Neste trabalho, portanto, buscou-se avaliar se a metilação do DNA nas ilhas de CpG encontradas no gene *SLC11a1* tem relação com o valor da contagem de ovos de ciatostomíneos por grama de fezes em equinos. Isso poderia ser um indicativo de tolerância ou susceptibilidade dos animais contra esses parasitos a partir da presença ou ausência de metilação do DNA no gene em questão. Além disso, procurou-se analisar a existência de relação entre o OPG de estrongilídeos e

os dados de exames hematológicos (hematócrito e contagem diferencial de leucócitos), resultados de provas de corrida e do teste ELISA para a infecção pela forma larval de ciatostomíneos, procurando possíveis correlações entre os resultados desses indicadores.

## 2 OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil de metilação do gene *SLC11a1* em animais de duas raças de equinos com altas e baixas contagens de ovos de ciatostomíneos por grama de fezes, com a finalidade de estabelecer futuramente um método de seleção de animais tolerantes aos ciatostomíneos.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar cavalos Puro Sangue Inglês e Crioulos com baixo e alto valor de OPG;
- b) Obter os valores de hematócrito, contagem diferencial de leucócitos, bem como o índice de anticorpos contra ciatostomíneos nos animais;
- c) Obter o número de prêmios conquistados em provas de corrida pelas éguas adultas da raça PSI;
- d) Relacionar os resultados de OPG dos animais com os resultados de ELISA nos animais das duas raças;
- e) Relacionar os resultados de OPG com os resultados de hematócrito e contagem diferencial de leucócitos nos animais PSI;
- f) Relacionar o número de prêmios em provas de corrida das éguas PSI com os resultados de OPG, ELISA, hematócrito e contagem diferencial de leucócitos;
- g) Analisar e identificar as ilhas de CpG do gene *SLC11a1 in silico*;
- h) Analisar o perfil de metilação das duas ilhas de CpG do gene *SLC11a1* nas amostras de equinos com valores altos e baixos de OPG;
- i) Relacionar o perfil de metilação das duas ilhas de CpG do gene *SLC11a1* com os valores de OPG dos animais;
- j) Relacionar o perfil de metilação das duas ilhas de CpG do gene *SLC11a1* com a raça dos animais.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A IMPORTÂNCIA DA EQUINOCULTURA

Os equinos foram domesticados há mais de 5000 anos e mantidos em grupos como fonte de alimento aos humanos (LEVINE, 2005). Atualmente, os equinos são utilizados para esporte, lazer e para trabalho em países em todo o mundo. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016), o Brasil possui o maior rebanho de equinos da América Latina e o terceiro do mundo. A equinocultura é um importante setor econômico, cujo mercado possui animais com alto valor zootécnico e, conseqüentemente, agregação de altos valores financeiros. Tal aporte financeiro na equinocultura deve-se principalmente a um melhoramento genético da espécie (LI e PINKEL, 2006), em que resultados de grande potencial são possíveis devido à adoção de um controle sanitário eficiente. No Brasil, somados os muares (mulas) e asininos (asnos) existem aproximadamente 8 milhões de cabeças. A maior população brasileira de equinos encontra-se nas regiões Sudeste e Sul, sendo que os cavalos de corrida compõem um dos segmentos mais ativos no comércio internacional de animais (CNA, 2004). No Brasil, mais de 80% da população de cavalos é utilizada principalmente para o trabalho (MAPA, 2016).

O presente trabalho envolveu duas raças de equinos populares no Brasil. O cavalo puro sangue inglês (PSI) (Figura 2b), o qual tem origem na Inglaterra, e foi ao longo do tempo manipulado e selecionado para a velocidade, agilidade e resistência, ou seja, características importantes para corrida (LEE et al., 2014). O cavalo Crioulo (Figura 2a) tem sua origem nos equinos Andaluz e Jaca espanhóis, trazidos da península Ibérica pelos colonizadores no século XVI. Estabelecidos na América, principalmente na Argentina, Chile, Uruguai, Paraguai, Peru e sul do Brasil, a raça Crioula foi selecionada e aprimorada em algumas características, sendo a rusticidade e a resistência, as mais marcantes (ABCCC, 2017).

FIGURA 2- CAVALO CRIOULO (A) E CAVALO PURO SANGUE INGLÊS (B).



O cavalo crioulo foi selecionado e aprimorado na América do sul, já o cavalo puro sangue inglês tem sua origem e evolução no continente europeu. Ambos animais selecionados para esportes de corrida. Fonte: Adaptado de ABCCC (<http://abcpsc.com.br/>) e Wikipedia ([https://pt.wikipedia.org/wiki/Crioulo\\_\(cavalo\)](https://pt.wikipedia.org/wiki/Crioulo_(cavalo))) (2018).

### 3.2 INFECÇÕES POR PARASITOS CIATOSTOMÍNEOS EM CAVALOS

Os equinos podem ser hospedeiros de várias famílias de parasitos, sendo que as principais pertencem ao Filo Nematoda, subdivididos em cinco Superfamílias: Trichostrongiloidea (*Trichostrongylus* spp.), Strongyloidea, ou estrôngilos, Spiruroidea (*Habronema* spp. e *Draschia* sp.), Rhabditoidea (*Strongyloides westeri*) e Ascaridoidea (*Parascaris equorum*). Os estrôngilos, que podem ser classificados como pequenos (ciatostomíneos) e grandes estrôngilos representam a maioria dos parasitos nematódeos do intestino de cavalos e outros equídeos (LICHTENFELS et al., 2008). Os parasitos ciatostomíneos pertencem à Família *Strongylidae* e Subfamília *Cyathostominae* (TAYLOR et al., 2010).

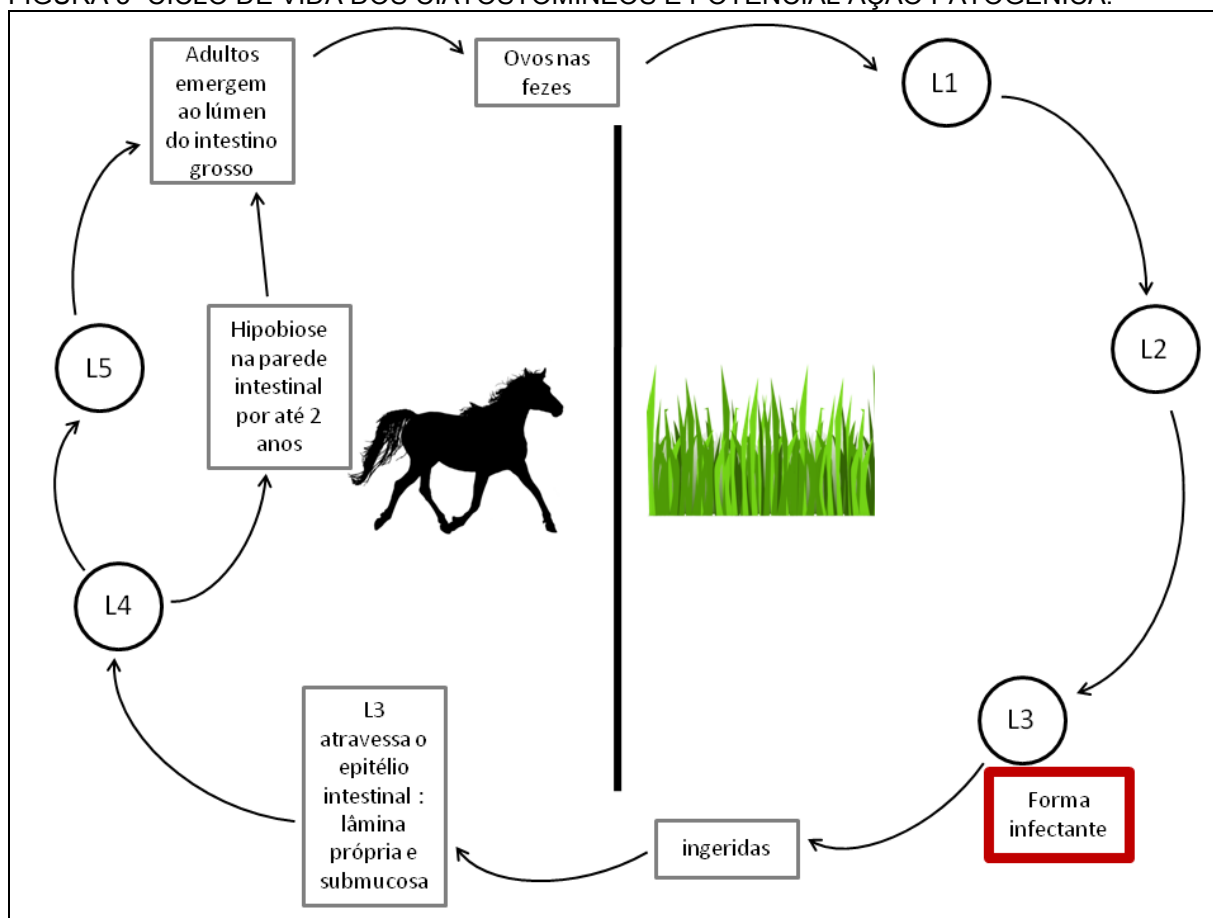
Há mais de 40 espécies identificadas desses parasitos, popularmente conhecidos como ciatostomíneos ou pequenos estrôngilos. Os principais gêneros são *Cylicostephanus*, *Cyathostomum*, *Cylicocyclus* e *Cylicodontophorus* (TAYLOR et al., 2010). As espécies mais comuns em equinos no Brasil são *Cylicostephanus longibursatus*, *Cyathostomum pateratum*, *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicostephanus calicatus*, *Cylicostephanus minutus* e *Cylicocyclus leptostomus* (CORNING, 2009). De acordo com BARBOSA et al. (2001), os ciatostomíneos são os parasitos que apresentam maior prevalência em equinos jovens e adultos.

Os ciatostomíneos são extremamente prevalentes e em geral equinos no pasto levam uma carga mista de grandes e pequenos estrôngilos (TAYLOR et al., 2010). Os ciatostomíneos são parasitos pequenos com menos de 1,5 cm de comprimento, filiformes, brancos ou vermelho-escuros, visíveis no exame minucioso

da mucosa ou no conteúdo do intestino grosso de equinos (BOWMAN, 2010). A diferenciação entre as espécies é feita (1) pela observação do número, arranjo, forma e tamanho dos elementos das coroas lamelares interna e externa, (2) forma da cápsula bucal, incluindo suas paredes, (3) pela forma e tamanho da cauda em machos e sua configuração em fêmeas (TAYLOR et al., 2010). Esses parasitos têm seis estágios de vida em ciclo do tipo monoxeno, ou seja, sem a presença de hospedeiros intermediários, que incluem: ovos, larvas de primeiro estágio (L1), larvas de segundo estágio (L2), larvas de terceiro estágio (L3), larvas de quarto estágio (L4), larvas de quinto estágio (L5) e adultos (Figura 3).

Os parasitos adultos vivem no lúmen intestinal, em que se fixam no epitélio para a alimentação e produzem ovos que são eliminados nas fezes (Figura 3). Em condições favoráveis, as larvas eclodem no meio ambiente, onde o parasito se desenvolve de L1 a L3. As formas infectantes (L3) são ingeridas com o alimento. No tubo digestivo, principalmente no cólon maior e ceco, as larvas L3 atravessam o epitélio intestinal e penetram a lâmina própria e submucosa. Nesses locais, desenvolvem-se em L4 e emergem para o lúmen em sua forma madura. As larvas remanescentes na parede intestinal ficam encistadas e entram em hipobiose, onde podem permanecer por até dois anos (TAYLOR et al., 2010).

FIGURA 3- CICLO DE VIDA DOS CIATOSTOMÍNEOS E POTENCIAL AÇÃO PATOGENÉTICA.



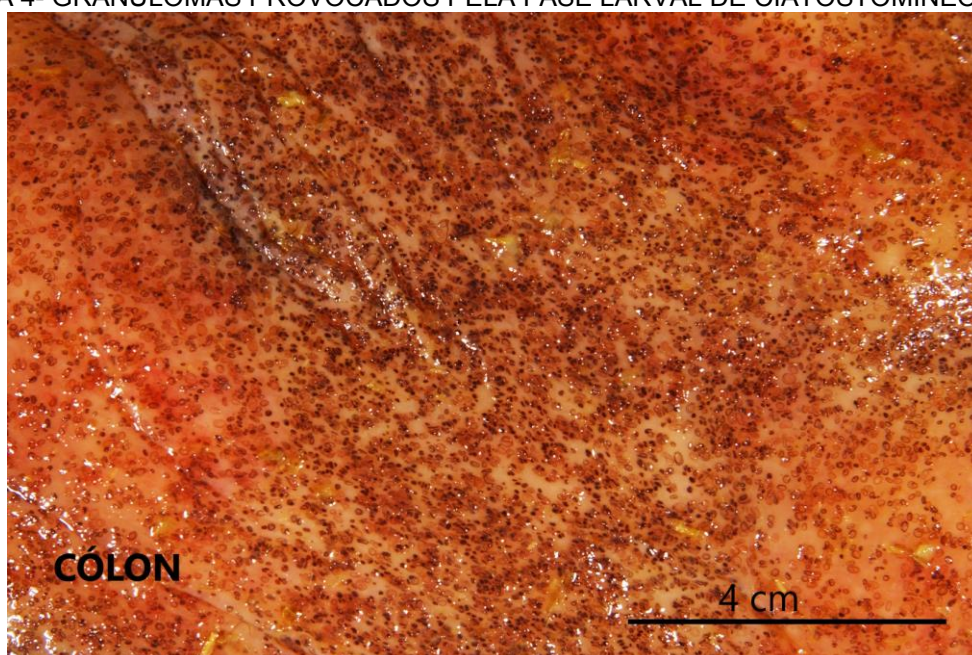
O ciclo dos ciatostomíneos é monoxeno, e é composto por seis fases: verme adulto, ovos, fases larvares 1, 2, 3, 4 e 5. As formas larvares podem ficar encistadas na parede intestinal por até 2 anos. Fonte: O autor (2018)

Embora casos de diarreia ocorram na maioria das vezes associados à insurgência de larvas encistadas nas paredes do intestino, essa síndrome também pode ser provocada pela penetração da L3 (GILES et al., 1985; TAYLOR et al., 2010). A doença tem caráter sazonal, porém, existe diferença da época de ocorrência nas diferentes regiões do mundo. Dessa forma, as condições mais favoráveis nos países do hemisfério norte, com clima temperado, ocorrem na primavera e outono, enquanto nos países de clima subtropical, essas condições ocorrem durante o inverno (TAYLOR et al., 2010). Os animais parasitados podem apresentar fraqueza, pelagem áspera, crescimento lento e, podem apresentar ainda diarreia de início súbito, que pode tornar-se crônica, causar emaciação e morte em 2 a 3 semanas. Sinais clínicos adicionais podem incluir cólica, edema subcutâneo e piroxia (LOVE et al., 1999; TAYLOR et al., 2010).

Não são observadas alterações específicas nos exames hematológicos e bioquímicos, embora alguns equinos afetados desenvolvam neutrofilia e

hipoalbuminemia (GILES et al., 1985). As lesões intestinais incluem enterite catarral ou fibrinosa no cólon maior e ceco, com numerosos focos de hemorragia, necrose ou formação de granulomas na mucosa e submucosa (Figura 4). Essas lesões são associadas à ocorrência de larvas de ciatostomíneos (JASKO e ROTH, 1984; LOVE et al., 1999). Outras lesões intestinais incluem edema da parede intestinal e aumento de volume dos linfonodos mesentéricos (LOVE et al., 1999).

FIGURA 4- GRANULOMAS PROVOCADOS PELA FASE LARVAL DE CIATOSTOMÍNEOS.



Nódulos e granulomas na mucosa do intestino grosso de equino, provocados pela presença de larvas encistadas (pontos negros) de ciatostomíneos.  
Fonte: MOLENTO (2017).

O diagnóstico baseia-se no histórico de pastoreio e nos sinais clínicos como a perda de condição corpórea. O diagnóstico definitivo é dado pelo exame coproparasitológico, pela Técnica de Gordon e Whitlock (1939) modificada, com a identificação e contagem dos ovos típicos de strongilídeos. Os ovos de strongilídeos são ovais, possuem casca fina e apresentam aproximadamente 90 x 50  $\mu\text{m}$  de tamanho. Na literatura, os parasitos ciatostomíneos são reconhecidos por serem responsáveis por aproximadamente 95 a 100% de todos os ovos de strongilídeos contados nas fezes de equinos (PEREGRINE, et al. 2014). Além disso, é possível fazer a identificação de larvas através da cultura das fezes pela Técnica de Roberts e O'Sullivan. Na cultura fecal de equinos, 80% ou mais são larvas de ciatostomíneos. A análise morfométrica é útil para identificar membros da subfamília *Strongylinae* e não é útil para diferenciar as espécies de ciatostomíneos. As larvas

são classificadas de acordo com a disposição das células intestinais, sendo os ciatostomíneos, o grupo parasitário predominante (BEVILAQUA et al. 1993). Para animais mortos, na inspeção minuciosa da mucosa e do conteúdo intestinal é possível identificar parasitos ciatostomíneos adultos e sinais da presença de formas larvares encistadas, como os granulomas na mucosa (TAYLOR et al., 2010).

Quanto ao uso do OPG como método de diagnóstico e como ferramenta para se determinar o momento em que os animais devem ser tratados com antiparasitários, há alguns questionamentos. Por exemplo, diferentes valores de OPG são usados como parâmetros para determinar o momento do tratamento em diferentes partes do mundo (PEREGRINE, et al. 2014). Entretanto, experiências de campo indicam que a infecção por ciatostomíneos é praticamente onipresente em cavalos mantidos a pasto, e que essas infecções são subclínicas na maioria das vezes, sendo que uma parcela muito pequena gera detrimento aos animais. Além disso, infecções substantivas por ciatostomíneos (por exemplo. >10.000) podem ser toleradas, sem houver impacto significativo na saúde dos animais (PEREGRINE, et al. 2014).

O controle desses nematóides vem sendo feito, ao longo das décadas, através do uso de anti-helmínticos, muitas vezes de maneira indiscriminada e sem outras estratégias de controle. Esse fato conduziu a uma seleção de populações resistentes à maioria dos anti-helmínticos, principalmente, aos benzimidazóis (BZ) (KAPLAN, 2002). A resistência parasitária é um fenômeno pelo qual um fármaco não consegue manter a mesma eficácia contra os parasitos, se utilizada nas mesmas condições, após um determinado período de tempo (CONDER e CAMPBELL, 1995).

A resistência aos anti-helmínticos é um grande problema quando se trata de parasitos ciatostomíneos. A resistência ao pirantel, um membro da classe da tetrahidropirimidina (THP) é altamente prevalente (KAPLAN, 2002). Sensibilidade reduzida aos anti-helmínticos à base de lactonas macrocíclicas (LM), como ivermectina e moxidectina, tem sido também relatada em populações de ciatostomíneos (MOLENTO et al., 2008; TRAVERSA et al., 2012; RELF et al., 2014). É comum também a resistência múltipla dos parasitos às diferentes classes de anti-helmínticos como os BZ, THP e LM (CANEVER et al., 2013; LESTER et al., 2013).

### 3.3 A RESPOSTA IMUNE ASSOCIADA À INFECÇÃO POR CIATOSTOMÍNEOS

Diversos patógenos, como as bactérias, colonizam o hospedeiro promovendo doenças invasivas, e gerando reações de defesa do organismo como as respostas imunológicas. Princípios similares às reações imunológicas das infecções bacterianas podem ser aplicados para fungos e parasitos, como os protozoários (COLE et al., 2016). Assim como outros invasores, os protozoários estimulam tanto as respostas imunes mediadas por anticorpos como por células. Em geral, os anticorpos controlam os números de parasitos no sangue e fluidos teciduais, enquanto as respostas mediadas por células são direcionadas amplamente contra parasitos intracelulares (TIZARD, 2014). Quanto aos helmintos, os fatores inatos que influenciam as infecções incluem não apenas efeitos derivados do hospedeiro, mas também a influência de outros parasitos presentes no mesmo hospedeiro. Além disso, a idade, o sexo e, principalmente, os antecedentes genéticos do hospedeiro influenciam na resposta inata de defesa contra os helmintos (TIZARD, 2014). A imunidade para nematoides é um importante aspecto da relação parasito-hospedeiro e normalmente tem papel central na patogênese das infecções.

As interações entre o sistema imune inato e o patógeno são um ponto chave para a determinação de susceptibilidade a uma doença e para o comportamento clínico da infecção (COLE et al., 2016). Por exemplo, RINALDI et al. (2011), estudou o efeito da infecção parasitária pelo nematóide *Ostertagia ostertagi* na síntese de muco no abomaso de bovinos, o qual tem como função proteger a mucosa e expelir parasitos. Nesse estudo, foram utilizados animais de 6 a 8 meses criados livres de infecção parasitária, os quais, exceto o grupo controle, foram oralmente infectados por 100.000 larvas L3 de *O. ostertagi*. Foram realizadas análises de expressão de genes envolvidos com a síntese de muco estomacal, e a partir de amostras de tecido da mucosa, foram realizadas histoquímica e imunohistoquímica. Nesse trabalho, foi observado aumento na expressão de genes envolvidos na síntese de mucinas como os genes *MUC1*, *MUC6* e *MUC20* nos animais parasitados. Foram observadas também alterações qualitativas na composição dos açúcares que formam a mucina, e além disso, nos animais parasitados houve hiperplasia do epitélio secretor de muco, indicando que esses parasitos realmente afetam a produção e a qualidade do muco presente no abomaso de bovinos (RINALDI et al. 2011).

A resposta imunológica tem sido associada aos períodos de mudanças dentro do ciclo de vida do parasito, principalmente envolvendo a hipobiose de larvas (KLEI e CHAPMAN, 1999). Dados de campo sugerem que os equinos adquirem certa tolerância aos pequenos estrôngilos com a idade, verificados através da redução da carga parasitária e da contagem de ovos nas fezes. Esta resposta é lenta e inconsistente na maioria dos animais e não tem relação com a intensidade do contato parasitário anterior (KLEI e CHAPMAN, 1999).

Os mecanismos geralmente associados à resposta imune contra nematódeos gastrintestinais são regulados por citocinas produzidas por células T tipo Th2, diferentemente dos protozoários em que a imunidade normalmente é mediada por respostas Th1 (TIZARD, 2014). As citocinas produzidas por células Th2 incluem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (FINKELMAN et al., 1997), sendo em parte responsáveis pelo aumento dos eosinófilos, mastócitos e IgE. Esses fatores são classicamente associados às respostas de hipersensibilidade e imunológica para nematódeos gastrintestinais.

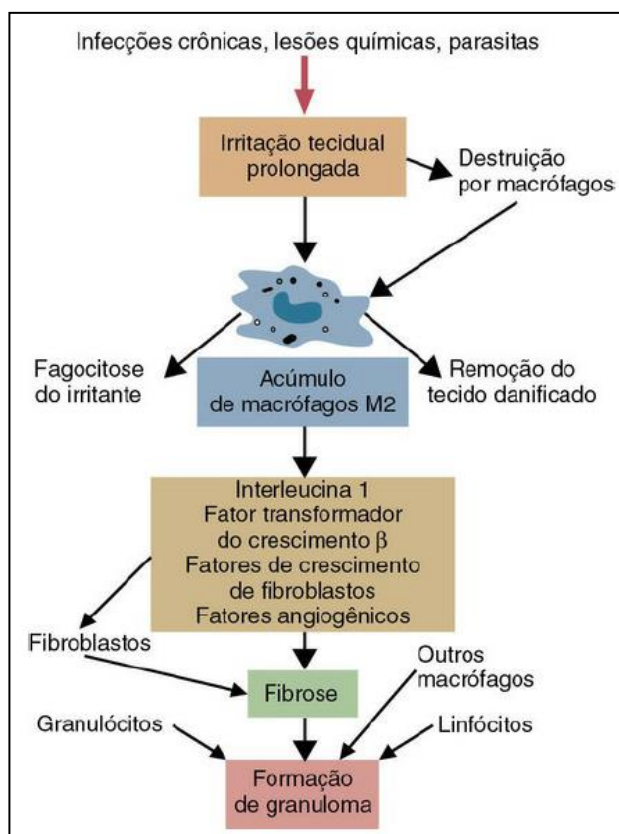
Os macrófagos também desempenham papel importante na defesa do organismo contra parasitos nematódeos, principalmente contra formas larvares migratórias. Um dos papéis dos macrófagos é na produção de quitinases, as quais degradam a proteína quitina abundante na cutícula de helmintos (TIZARD, 2014).

Tanto os neutrófilos quanto os macrófagos possuem CD23, e com isso podem se ligar aos parasitos cobertos de IgE e matá-los, sendo defensores chave contra as larvas migratórias. Macrófagos que se ligam à larva de helmintos por meio de IgE se tornam células M1 com aumento das enzimas dos lisossomos, produção de oxidantes, IL-1, leucotrienos e prostaglandinas. Essas células produzem continuamente óxido nítrico, sendo capazes de provocar a destruição de bactérias, fungos, protozoários e alguns helmintos (TIZARD, 2014). Além disso, os macrófagos podem agir no isolamento de vermes migratórios. Nesses casos, os macrófagos são ativados alternativamente e se tornam células M2, as quais produzem arginase. A arginase é uma enzima importante na formação de granulomas (Figura 5) que se desenvolvem em torno dos helmintos teciduais (TIZARD, 2014).

A resposta imunológica do hospedeiro frente à presença de larvas de ciatostomíneos encistadas na mucosa do intestino grosso tem sido estudada, e está sendo desenvolvido por MITCHELL et al. (2016) um método de diagnóstico para

esse tipo de infecção parasitária. Esse método é um ELISA que visa detectar anticorpos IgG contra larvas encistadas de ciatostomíneos em equinos.

FIGURA 5- PAPEL DO MACRÓFAGO NA FORMAÇÃO DO GRANULOMA.



Os granulomas são uma das principais consequências do encistamento de larvas de ciatostomíneos na mucosa do intestino grosso. Os macrófagos são um dos principais tipos celulares envolvidos na formação de granulomas no organismo hospedeiro conforme esquema demonstrado acima.  
Fonte: Adaptado de TIZARD (2014).

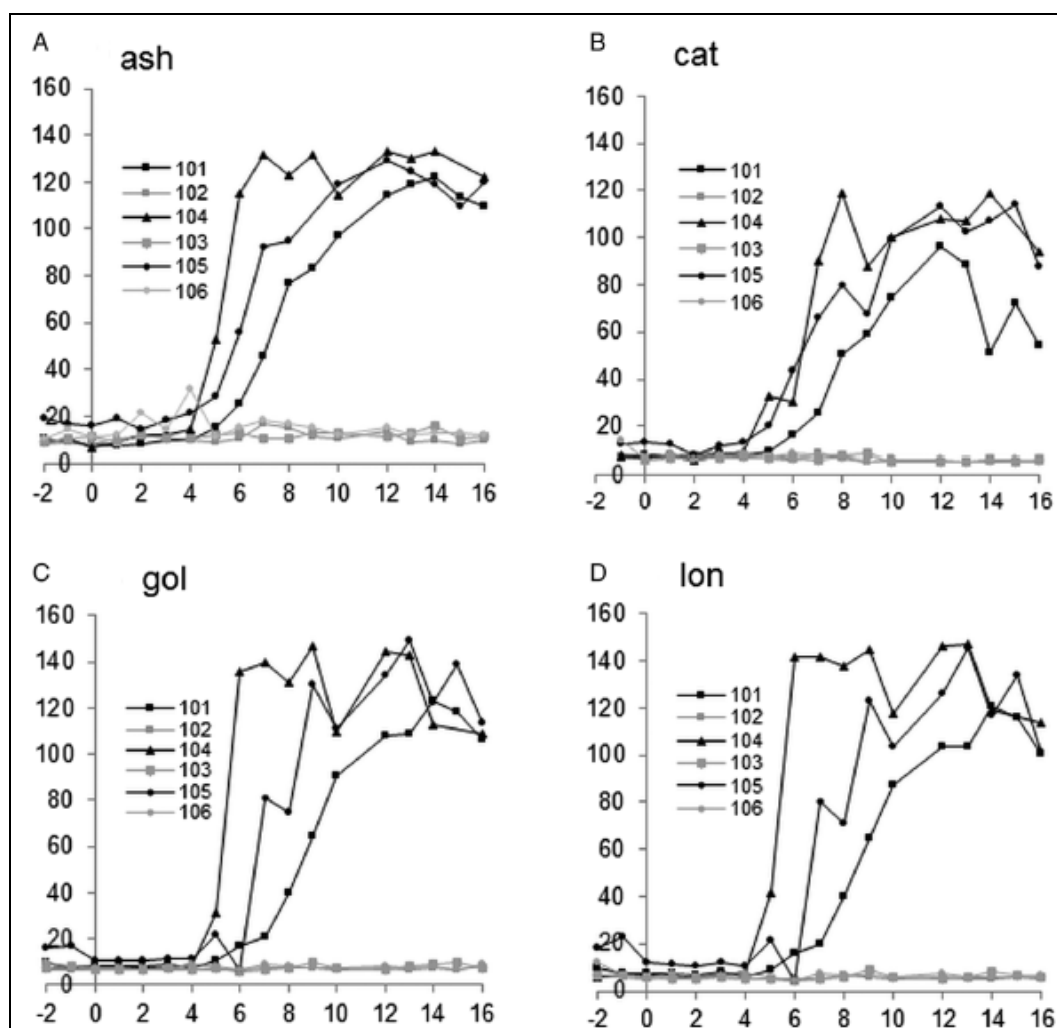
### 3.4 TESTE ELISA PARA DIAGNÓSTICO DE CIATOSTOMÍNEOS

O diagnóstico direto de larvas de ciatostomíneos encistadas na mucosa do intestino grosso de equinos ainda não existe para animais vivos, apenas para animais mortos através da observação da mucosa intestinal em necropsia. A partir de antígenos identificados previamente como marcadores para a infecção pela forma larval encistada de ciatostomíneos, MITCHELL et al. (2016) desenvolveram um teste de ELISA para a verificação do título de anticorpos diante da presença desses parasitos. Um dos antígenos utilizados foi o Cy-GALA-1 (antígeno 1 associado ao intestino de larvas de ciatostomíneos). As imunoglobulinas G (IgG) contra esse antígeno foram detectadas e relacionadas ao diagnóstico da infecção

pela forma larval encistada. Foram identificados e isolados segmentos do gene do *Cy-GALA* em quatro espécies comuns de ciatostomíneos: *Cyathostomum catinatum*, *Cylicocyclus ashworthi*, *Cylicostephanus goldi* e *Cylicostephanus longibursatus* para abranger a identificação pela técnica. As proteínas recombinantes foram confirmadas quanto a sua especificidade e imunogenicidade por ELISA e o teste demonstrou ser capaz de informar a presença de infecção pela forma larval encistada dos ciatostomíneos e o nível dessa infecção (MITCHELL et al., 2016).

MITCHELL et al. (2016), utilizaram amostras de pôneis e cavalos adultos provenientes do Reino Unido e Estados Unidos da América livres de infecção por ciatostomíneos e outros parasitos, e animais naturalmente e experimentalmente infectados por ciatostomíneos. Os dados mostraram que os pôneis criados livres de infecção por ciatostomíneos não apresentaram resultados reagentes no teste ELISA, ou seja, não apresentaram os anticorpos específicos (Figura 6). Já os animais infectados experimentalmente, ou seja, livres de infecção por outros parasitos; os animais com alta carga de parasitos ciatostomíneos encistados na mucosa observados na necropsia; e os animais com sinais clínicos de infecção parasitária e presença de ovos de ciatostomíneos nas fezes, apresentaram resultados reagentes, com diferentes titulações de IgGs (MITCHELL et al., 2016). Nos animais experimentalmente infectados por ciatostomíneos, a resposta de IgG foi monitorada até 16 semanas após o primeiro desafio com os parasitos, sendo que não foi observado queda expressiva do título de IgG durante esse período nos animais que foram infectados (Figura 6) (MITCHELL et al., 2016).

FIGURA 6- RESPOSTAS DE IgG PARA AS PROTEÍNAS GALA RECOMBINANTES MEDIDAS PELO ELISA.



Legenda: Resposta IgG específica para a proteína recombinante GALA (A. GALA-ash, B. GALA-cat, C. GALA-gol, D. GALA-lon) frente a infecção experimental por ciatostomíneos. Seis pôneis britânicos (6 a 12 meses no momento inicial da infecção) foram mantidos com suas mães e criados em condições de serem livres de infecções por helmintos. Por quatro meses, esses animais foram alimentados com ração peletizada de alta fibra e mantidos em locais sem acesso a pastagem. Três pôneis (pôneis 101, 104 e 105) foram infectados com um total de 3.9 milhões de larvas de terceiro estágio (L3) de ciatostomíneos, administrados três vezes por semana em uma quantidade de 150.000 larvas através de tubo nasogástrico. Pôneis 102, 103 e 106 foram mantidos sem infecções, como controle.

Fonte: MITCHELL, et al. 2016.

Esse estudo de MITCHELL et al. (2016) demonstra a relação da infecção parasitária por ciatostomíneos em equinos com outras funções, tecidos e células do organismo do hospedeiro, entre eles as células de defesa presentes no sangue e tecidos dos animais.

### 3.5 HEMATÓCRITO E A CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NA INFECÇÃO POR CIATOSTOMÍNEOS

A relação existente entre as altas infecções parasitárias e as alterações hematológicas é amplamente estudada, sendo já bem estabelecidas a anemia e eosinofilia nessas condições em equinos (SIPRA et al., 1999). Os parasitos ciatostomíneos nutrem-se de sangue do hospedeiro através da mucosa intestinal e, como os demais parasitos, estão associados às infecções bacterianas secundárias, reação inflamatória e reação de hipersensibilidade do hospedeiro. GILES et al. (1985) em um trabalho retrospectivo com 15 equinos, com idade entre 1 e 16 anos, observaram que os animais com infecções parasitárias gastrintestinais, sendo prevalentemente a infecção por ciatostomíneos, apresentaram uma neutrofilia sem desvio à esquerda como alteração característica no exame de sangue, porém, a eosinofilia e a anemia não foram achados marcantes nesse estudo.

STEINBACH et al. (2006) fizeram exame de sangue de pôneis naturalmente infectados por *estrongilídeos*, sendo a infecção por ciatostomíneos a mais prevalente e o objeto desse estudo. Esses animais tiveram o sangue coletado antes e depois de serem tratados com anti-helmínticos, sendo alguns animais tratados e mantidos livres de infecção. Os autores detectaram eosinofilia nos animais infectados antes do tratamento. Após o tratamento, foi detectado, de modo geral, aumento das proteínas plasmáticas e nível alto de globulinas. Outros parâmetros do hemograma não tiveram diferença estatística significativa, entre os animais infectados e o grupo controle, livre de infecção.

O aumento na contagem de eosinófilos, achado comum em animais com altas infestações parasitárias por parasitos gastrintestinais, pode ser explicado devido aos níveis extremamente elevados de imunoglobulina E (IgE) em indivíduos parasitados. Essa imunoglobulina está presente na mucosa intestinal e, atua desencadeando inflamação aguda. As IgE ligam-se aos receptores presentes nos mastócitos, que ao se ligarem a antígenos, influenciam a sua degranulação e estimulando a liberação do fator quimiotático da reação de hipersensibilidade. Esse fator, por sua vez, mobiliza eosinófilos do organismo, resultando na sua liberação em grande número para a circulação (TIZARD, 2014).

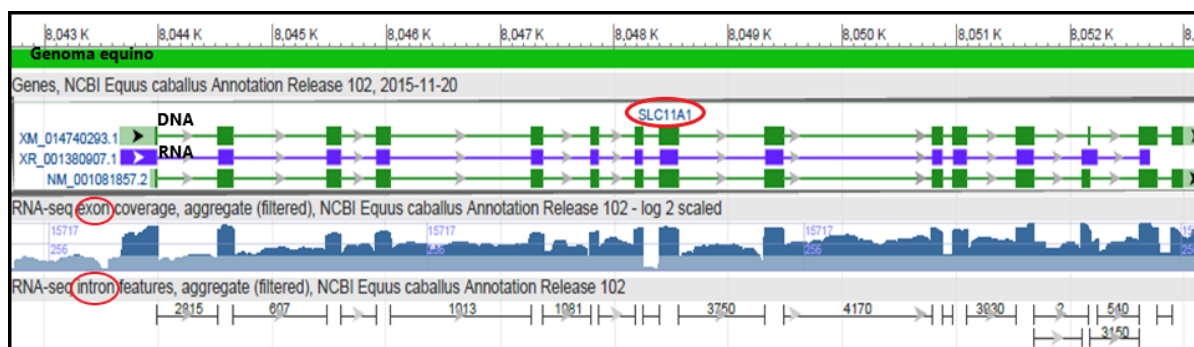
Os parasitos ciatostomíneos desencadeiam reações de defesa, tanto no lúmen intestinal quanto na mucosa e submucosa do hospedeiro. Essas reações

envolvem vários tipos celulares, entre eles os macrófagos, principalmente no caso de larvas encistadas na mucosa. Um dos genes envolvidos na atividade de defesa do macrófago, perante patógenos invasores, é o gene *SLC11a1* (*Solute Like Carrier Family 11a1*).

### 3.6 O GENE *SLC11a1* EM EQUINOS

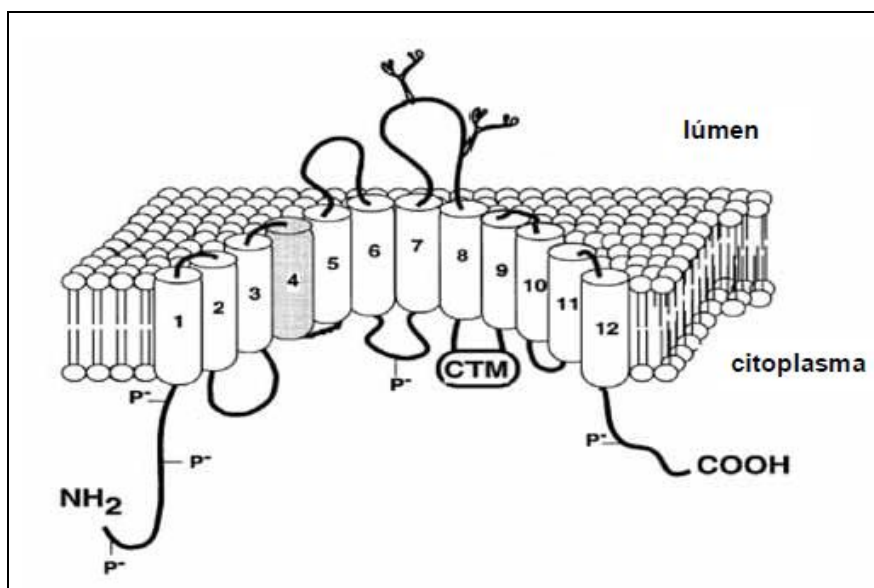
O gene *SLC11a1* está localizado no cromossomo 6 p12-13 na espécie equina, diferentemente da espécie humana, em que está localizado no cromossomo 2. A estrutura do gene *SLC11a1* é similar ao de outras espécies, possuindo 9.560 pares de bases (pb) nitrogenadas distribuídas em 15 exons (Figura 7) e codificando uma proteína de mesmo nome, com 544 aminoácidos (MATIASOVIC et al., 2002). A proteína codificada pelo gene *SLC11a1* é composta de 12 domínios transmembranares (TM), uma alça extracelular glicosilada e uma sequência de transporte (*Consensus Transport Motif* – CTM) (Figura 8) (GOVONI et al., 1995; ALTET et al., 2002).

FIGURA 7- ILUSTRAÇÃO DO GENE *SLC11A1* DE EQUINO.



A primeira linha em verde indica a localização do gene no genoma equino. Abaixo, as linhas em verde ilustram o gene e as partes transcritas em destaque, assim como a linha azul que representa o RNA, e destaca as partes traduzidas. Na parte inferior, está a representação dos exons em azul escuro e logo abaixo os introns.

Fonte: GenBank (2018).

FIGURA 8 - ILUSTRAÇÃO DA PROTEÍNA DE MEMBRANA CODIFICADA PELO GENE *SLC11a1*.

Os números identificam os 12 domínios transmembrana da proteína e o *Consensus Transport Motif* (CTM) consiste de uma sequência de transporte.

Fonte: Adaptado de RIBEIRO (2011).

O gene *SLC11a1* representa um modelo interessante para estudos sobre evolução, porque apesar de apresentar polimorfismos variados, se mantém altamente conservado com mais de 97% de identidade, considerando dez espécies de equídeos, inclusive espécies primitivas dessa família animal (Figura 9) (BAYEROVA et al., 2016).

Alguns polimorfismos funcionais importantes foram associados a várias doenças em humanos e outras espécies (VIDAL et al., 1995; BAYEROVA et al., 2016). Mutações nesse gene têm sido associadas com a susceptibilidade às doenças infecciosas como a tuberculose e lepra, e doenças inflamatórias como a artrite reumatóide (ARCHER et al., 2015).

FIGURA 9- ÁRVORE FILOGENÉTICA DA PROTEÍNA SLC11A1 EM ESPÉCIES DE EQUÍDEOS.



Além de equídeos, a árvore contempla também o *Tapirus terrestris* (anta) e *Ceratotherium simum simum* (rinoceronte), e demonstra grande identidade da proteína entre as diversas espécies de equídeos. Em destaque vermelho, a espécie equina *Equus caballus*.

Fonte: Adaptado de BAYEROVA et al. (2016).

### 3.7 A PROTEÍNA SLC11A1 E A FUNÇÃO NO SISTEMA IMUNE

A proteína SLC11a1, codificada pelo gene *SLC11a1*, possui a função de ser carreadora de soluto pertencente à Família 11, com função multi-pass estando localizada nos compartimentos de endossomos tardios e lisossomos de células como monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares sendo rapidamente deslocada para a membrana de fagolisossomos durante a fagocitose (FORBES e GROS, 2001).

A literatura mostra que o gene *SLC11a1* pode ter relevância no processo de resistência do hospedeiro a um patógeno. Foi verificado que a resistência ou a susceptibilidade de camundongos às infecções por parasitos intracelulares como *Leishmania* spp., micobactérias e *Salmonella* spp. é regulada por um locus no cromossomo 1 conhecido como *Ity*, *Lsh* ou *Bcg*. Este locus foi caracterizado por clonagem e foi designado como a proteína do macrófago associada à resistência natural (*NRAMP1*), sendo posteriormente renomeado como soluto transportador da família 11, membro 1, o *SLC11a1* (ALTET et al., 2002; VIDAL et al., 1995).

Esta proteína tem importante influência na atividade antimicrobiana de macrófagos contra parasitos intracelulares, principalmente durante estágios iniciais da infecção (BLACKWELL et al., 1994). Uma das teorias sobre a função desta proteína, presente na membrana de fagolisossomos de macrófagos, sugere que ela transportaria íons ferro para o interior dos fagolisossomos, auxiliando na reação catalítica de Fenton ou Haber-Weiss, que gera radicais hidroxilas altamente tóxicos para bactérias (FRITSCHER et al., 2008). Outra teoria pressupõe que a *SLC11a1* realizaria o transporte de íons para fora do fagolisossomo, diminuindo o conteúdo iônico principalmente de ferro ( $Fe^{2+}$ ), manganês ( $Mn^{2+}$ ) e zinco ( $Zn^{2+}$ ), que são fundamentais para o crescimento de bactérias. Este fato poderia controlar a multiplicação de micro-organismos intracelulares dependentes destes íons (FORTIER et al., 2005).

### 3.8 O PAPEL DO GENE *SLC11a1* NA MEDICINA VETERINÁRIA

Alguns aspectos genéticos da influência do *SLC11a1* têm sido investigados em animais. A presença de regiões microssatélites detectadas na região 3'-UTR do *SLC11a1* foram associadas com a resistência à infecção por brucelose em bovinos e búfalos (FENG, 1996), paratuberculose (Johne's disease) em bovinos (PINEDO, 2009) e à paratuberculose em ovinos (REDDACLIFF, 2005). Esse trabalho, mostrou em dois rebanhos de ovinos da raça Merino alta prevalência do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (REDDACLIFF, 2005). Nesse estudo, foram encontradas relações entre os polimorfismos presentes em genes envolvidos nas reações de defesa do organismo e o fenótipo dos animais, teste de imunidade humoral e teste de hipersensibilidade. Como resultados preliminares, foi possível

associar a presença de determinados alelos no gene *SLC11a1* com a susceptibilidade ou resistência à paratuberculose (REDDACLIFF, 2005).

Uma mutação no aminoácido 169 da proteína SLC11a1, com alternância Gly-Asp de ocorrência natural fez com que ratos se tornassem susceptíveis para *Leishmania donovani*, *Salmonella typhimurium* e *Mycobacterium bovis* (VIDAL et al., 1995). Essa mutação também confere susceptibilidade a outros patógenos em ratos, incluindo *Toxoplasma gondii* (BLACKWELL et al., 1994) e *Candida albicans* (PULITI et al., 1995).

Em cães e ratos os principais estudos mostram a relação do gene *SLC11a1* com infecções por parasitos intracelulares. Em cães, os polimorfismos presentes na região promotora, microssatélites de tamanhos variáveis (dentro do intron 1 deste gene), e a deleção completa do exon 11 (ALTET, 2002) foram associados à susceptibilidade à leishmaniose visceral canina. A partir de ensaios de PCR e ELISA indireto, a ocorrência da leishmaniose e a presença dos alelos 141, 145 ou 149 na região microssatélite, e a variação do número de guaninas da região promotora foram considerados aspectos relevantes para a infecção. Esse estudo sugeriu que a presença de qualquer um destes três alelos associados a 8 ou 9 guaninas na região promotora do gene *SLC11a1* estariam relacionados com a susceptibilidade à leishmaniose visceral canina (RIBEIRO, 2011).

Em galináceos, uma mudança no nucleotídeo da posição 696 foi identificada somente em células susceptíveis à *Salmonella enterica* (HU, 1997). Quanto à paratuberculose em caprinos, provocada pelo *Mycobacterium avium* ssp., foram identificados polimorfismos na região 3'UTR do gene *SLC11a1* que regulam a sua expressão, e conseqüentemente levam à uma sensibilidade dos animais à essa infecção (TAKA et al., 2015). Ainda não se sabe como ocorre, mas esses polimorfismos podem ser responsáveis por interromper uma sequência alvo de miRNA (micro RNA) presente no RNAm (RNA mensageiro) do *SLC11a1* e conseqüentemente provocar o seu silenciamento, mecanismo este, epigenético (TAKA et al., 2015).

A sequência do gene *SLC11a1* é igual em cinco raças distintas de cavalos (Andaluz, Árabe, Hanoveriano, Quarto de Milha e Puro Sangue Inglês), além dos equídeos: asno e zebra, em diferentes estados norte-americanos (HALBERT et al., 2006). Estudos mostraram que as populações de equinos que apresentaram a alteração alélica -57C/T na região 5' UTR do exon 1, apresentaram uma

susceptibilidade à infecção por *Rhodococcus equi*, que acomete principalmente os potros (HALBERT et al., 2006). Em equinos não há estudos que correlacionem o gene *SLC11a1* com ciatostomíneos, assim como a possível regulação epigenética envolvendo infecções parasitárias por nematoides em animais envolvendo o gene *SLC11a1*.

### 3.9 EPIGENÉTICA

A definição de epigenética surgiu na metade do século XX após estudos relacionando bases genéticas e embriológicas. O prefixo *epi*, do grego, por cima, apresenta uma forma de herança que se sobrepõe à herança genética. Epigenética é definida como o estudo das modificações do DNA que são herdáveis e não alteram a sequência de bases nucleotídicas (WADDINGTON, 1942), e que abrange mecanismos bioquímicos com padrões não-Mendelianos de distribuição (JIRTLE, 2007). O epigenoma é dinâmico e varia de célula para célula dentro de um mesmo organismo multicelular (SZYF, 2007).

Qualquer geração que tenha sofrido exposição direta a um insulto ambiental, pode ser afetada de alguma maneira pela epigenética. As gerações subsequentes, que não estavam presentes no momento da exposição podem ainda serem afetadas pela herança epigenética transgeracional, se a exposição ocorreu em um período sensível para as células germinativas (SKINNER, 2011).

Os mecanismos principais pelos quais a epigenética pode alterar a expressão gênica são a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas e os RNAs não-codificantes (EGGER, 2004) sendo a metilação do DNA o mecanismo melhor estudado.

### 3.10 METILAÇÃO DO DNA

A metilação do DNA é considerada como o mecanismo epigenético mais estável e experimentalmente acessível na pesquisa por diferentes tipos de marcadores epigenéticos (WANG et al., 2017).

A metilação do DNA controla várias funções do genoma, sendo essencial durante a morfogênese para que ocorra desenvolvimento e crescimento fetal normal (McGEE et al., 2018). Além disso, podem ser citados a recombinação durante a

meiose, controle da replicação, controle de DNAs exógenos que se inserem no genoma humano como o vírus da Hepatite B, estabilização e manutenção da expressão gênica, regulação da diferenciação celular e inativação do cromossomo X (RAZIN e KAFRI, 1994; YODER et al., 1997; CHENG et al., 2018). A alteração no padrão de metilação na região promotora de um gene pode levar à perda de função desse gene e ser muito mais frequente do que a mutação genética (HERCEG e USHIJIMA, 2010).

A transcrição pode ser fortemente inibida pela metilação do DNA, que impede a ligação de fatores de transcrição e na inacessibilidade da DNA polimerase. Ao contrário, a ausência da metilação promove a transcrição (MIRANDA e JONES, 2007).

A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil ( $\text{CH}_3$ ) é transferido da s-adenosilmetionina (SAM), a qual provém da metionina, ácido fólico ou vitamina B12 que são obtidos a partir da dieta (McGEE et al., 2018), para o carbono 5 de uma citosina (5-meC) que geralmente precede a uma guanina (dinucleotídeo CpG). Esta reação é metabolizada pela ação de uma família de enzimas que recebem o nome de DNA metiltransferases (DNMTs) (LISTER, 2009). As DNA metiltransferases, estão envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas do DNA em processo de replicação e em processos de metilação *de novo*. Enquanto as metilases DNMT1 são conhecidas como enzimas de manutenção, as DNMT3a e DNMT3b são responsáveis pela maioria dos processos de metilação *de novo*, que ocorrem em sítios com nenhum tipo de indicação de metilação, ou seja, sem a presença de metilação prévia (LISTER, 2009).

A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG e tem a importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos do genoma (MORGAN, 2004).

Os dinucleotídeos CpG, aparecem distribuídos pelos genomas de eucariotos e também agrupados em regiões definidas como ilhas CpG (Figura 10). As ilhas CpG são regiões do DNA com 200 pares de bases, contendo pelo menos 50% de bases C e G e com uma relação esperado/observado de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG (GARDINER e FROMER, 1987). A literatura mostra que a maioria dos dinucleotídeos CpG estão distribuídos ao longo do gene e se encontram metilados, cerca de 3 a cada 4, enquanto as ilhas CpG possuem os dinucleotídeos

desmetilados (BIRD, 2002). Mais de 60% dessas ilhas estão localizadas em regiões promotoras de genes (HACKENBERG et al., 2010).

FIGURA 10- ILHAS DE CpG E CpG ISOLADOS EM UM GENE.

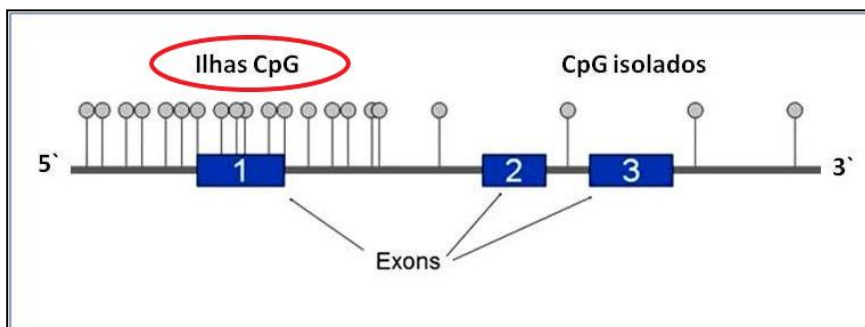


Ilustração de uma ilha de CpG, em que os dinucleotídeos CpG encontram-se em grande número na região promotora em relação ao corpo do gene.

Fonte: Adaptado de <http://lifesequencing.blogspot.com.br/p/analise-de-metilacao-por-sequenciamento.html> (2018)

Há evidências emergentes que sugerem que fatores epigenéticos são importantes para o entendimento das variações individuais na resposta inflamatória (WILSON, 2008) e podem influenciar na imunidade humana e animal.

Para avaliar a metilação do DNA existem diversas técnicas. Porém, a técnica de sequenciamento do DNA após o tratamento com bissulfito de sódio é considerada como padrão ouro para a análise de metilação. Esta técnica é considerada precisa e sensível para estudar os padrões de metilação em sítios de CpG. Esta técnica permite a diferenciação das citosinas não metiladas das citosinas metiladas através da amplificação do DNA por PCR e da análise subsequente dos produtos de PCR (ZILBERMAN e HENIKOFF, 2007). Na reação de PCR das seqüências selecionadas e que foram tratadas pelo bissulfito, as citosinas não metiladas amplificam como timinas, enquanto as citosinas metiladas amplificam como citosinas. O estado de metilação do DNA pode ser determinado através do produto direto do PCR ou após o sequenciamento secundário à clonagem (MEŠTROVIĆ, 2014). Há ainda algumas técnicas diferenciadas de análise de metilação do DNA baseadas no tratamento com bissulfito de sódio que são a técnica de COBRA (*Combined Bisulfite-Restriction Analysis*), MSP (*Methylation-specific polymerase chain reaction*) e MS-SNuPE (*Methylation-Sensitive Single Nucleotide Primer Extention*) (VERMA, et al. 2003; MEŠTROVIĆ, 2014). Além dos métodos baseados no tratamento do DNA com bissulfito de sódio, há outros métodos de

análise da metilação do DNA como o uso de endonucleases de restrição, que são enzimas que cortam a molécula de DNA através do reconhecimento de sequências nucleotídicas específicas, e o método MeDIP (*Methylated DNA immunoprecipitation*), na qual as citosinas metiladas são imunoprecipitadas através da ação de anticorpos monoclonais (MEŠTROVIĆ, 2014).

### 3.11 INFLUÊNCIA DA EPIGENÉTICA NA MEDICINA VETERINÁRIA

A epigenética tem o potencial de ser muito utilizada na criação animal, pois é fonte de informações quanto à herdabilidade de características importantes e quanto a ocorrência de doenças (TRIANAPHYLLOPOULOS et al., 2016).

Há exemplos de eventos epigenéticos que envolvem os animais domésticos (FEENEY et al., 2014). Um deles é a relação da metilação do DNA e a produção de leite bovino (VANSELOW et al., 2006). A  $\alpha$ 1-caseína é a proteína mais abundante do leite de vaca e é expressa somente durante a lactação nas células epiteliais mamárias. Durante uma lactação saudável, o gene da  $\alpha$ 1-caseína encontra-se hipometilado garantindo a sua expressão. As vacas com mastite têm a produção de leite diminuída, devido à diminuição na síntese de caseína. Em um estudo realizado com vacas da raça Holandesa com mastite artificialmente induzida por bactérias *Escherichia coli*, mostrou que a infecção bacteriana na glândula mamária altera o padrão de metilação do gene da  $\alpha$ 1-caseína, hipermetilando 3 dinucleotídeos CpG localizados na região promotora, e com isso, reduzindo a expressão da  $\alpha$ 1-caseína, e conseqüentemente reduzindo a produção de leite (VANSELOW et al., 2006).

O estudo realizado sobre a relação da metilação do DNA em células da musculatura esquelética e do fígado de fetos e leitões, com o teor de proteínas na alimentação de porcas da raça German Landrace durante a gestação, mostrou que a metilação do DNA de genes envolvidos no metabolismo da metionina foi maior em fetos cuja mãe teve a dieta rica em proteínas (30% de proteína na matéria seca ou MS) (ALTMANN et al., 2002). Além disso, a expressão de genes envolvidos no metabolismo da metionina na musculatura esquelética foi alterada em fetos cujas mães tiveram alimentação com baixo teor protéico (6% de proteína na MS) quando comparados ao grupo controle. Esse estudo demonstrou que a nutrição de porcas durante a gestação, teve influência no desenvolvimento do tecido hepático e muscular de leitões, devido às diferenças no perfil de metilação de genes envolvidos

no metabolismo da metionina nos filhos das mães que tiveram alimentação rica ou pobre em proteínas durante o período da gestação (ALTMANN et al., 2002).

GIM et al. (2015) desenvolveram um programa chamado *The Horse Epigenome Database* (HEpD), em 2014 na Coreia do Sul. Esse *software* mostra os perfis de metilação de cada gene e as regiões diferentemente metiladas (DMRs) em quatro tecidos (músculo esquelético, coração, pulmão e cérebro) de duas raças de cavalos (PSI e Jeju). A raça PSI foi escolhida por ter sido selecionada intencionalmente para a velocidade e agilidade, e pelos variados estudos sobre genótipo, polimorfismos e transcritos que apresenta. A raça Jeju é popular na Coreia e os animais são usados para corrida e como fonte de alimento. Esse trabalho é uma importante fonte de dados sobre a metilação do DNA em equinos, principalmente para localizar regiões altamente metiladas, e pela possibilidade de fazer comparação entre duas raças distintas.

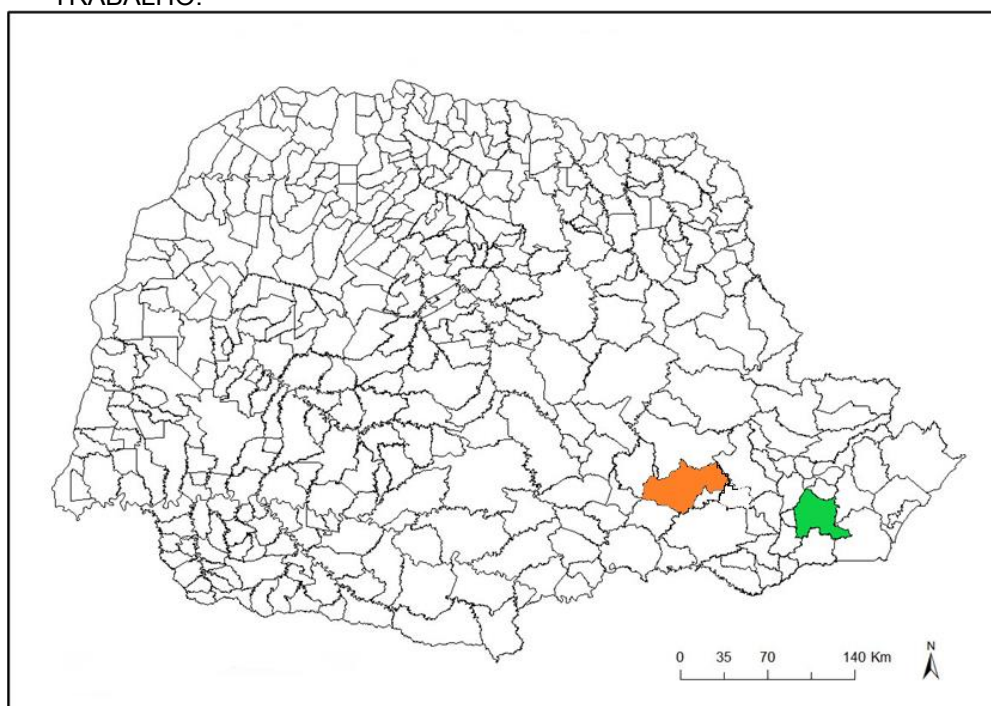
O presente trabalho teve o objetivo de identificar o perfil de metilação de duas ilhas de CpG presentes no gene *SLC11a1* de equinos e relacionar com a contagem de ovos de ciatostomíneos nas fezes, contribuindo ou não para uma diminuição da infecção parasitária.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS E LOCAL DE MANUTENÇÃO

Este trabalho foi realizado com equinos provenientes de duas fazendas (Anexos 1 e 2). Foram amostrados em um primeiro momento 30 cavalos da raça Puro Sangue Inglês (PSI), provenientes de um haras em São José dos Pinhais (Anexo 1). Em um segundo momento foram amostrados 51 animais PSI oriundos da mesma propriedade. Além desses animais, foram utilizados 44 animais da raça Crioulo, provenientes de uma propriedade no município de Palmeira (Anexo 2). Ambas as propriedades estão localizadas em cidades próximas a região metropolitana de Curitiba, no estado do Paraná, Brasil (Figura 11). Ambos os locais possuíam pastagens cultivadas, nutrição individual balanceada, controle sanitário constante e manejo reprodutivo similares. Os animais do estudo, de ambas as raças, compreenderam machos e fêmeas, com ótimo *score* clínico, sendo os animais da raça Crioulo jovens e adultos, e os animais PSI sendo todos potros no primeiro momento, e no segundo momento sendo potros e animais adultos.

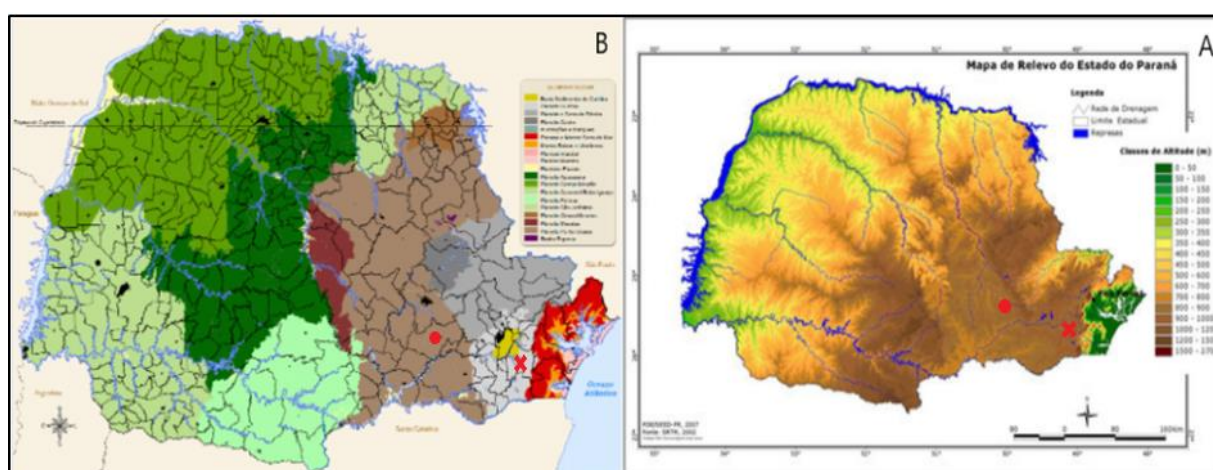
FIGURA 11- MAPA DO ESTADO DO PARANÁ COM A LOCALIZAÇÃO DOS MUNICÍPIOS EM QUE ESTÃO LOCALIZADOS OS LOCAIS DE CRIAÇÃO DOS CAVALOS UTILIZADOS NO TRABALHO.



Em verde, o município de São José dos Pinhais. Em laranja, o município de Palmeira.  
Fonte: O autor (2018).

O município de São José dos Pinhais onde se encontra a propriedade de cavalos PSI está localizado predominantemente no Planalto de Curitiba enquanto que o município de Palmeira está localizado integralmente no Planalto de Ponta Grossa (Figura 12B). Apesar de diferentes formações geomorfológicas, a altitude em que se localizam os dois municípios são similares, variando entre 800 e 1000 metros de altitude acima do nível do mar (Figura 12A). Quanto ao clima, segundo a classificação climática de Köppen, o município de Palmeira é considerado como clima Cfb, que é clima úmido subtropical sem estação de seca com verão moderado. Já São José dos Pinhais, o clima é Cfa, ou seja, clima úmido subtropical sem estação de seca e com o verão quente (ALVARES et al. 2014).

FIGURA 12- MAPAS COM IDENTIFICAÇÃO DOS DIFERENTES RELEVOS E ALTITUDES (A) E A GEOMORFOLOGIA (B) DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.



As duas propriedades (círculo vermelho: Rancho JB de cavalos Crioulo; e o xis vermelho: Haras São José da Serra, de criação de cavalos PSI) estão localizadas em municípios com relevo parecidos, com altitudes predominantes variando entre 800 a 1000 metros acima do nível do mar (cor marrom claro no mapa A). Quanto a geomorfologia, o município de São José dos Pinhais está localizado predominantemente no Planalto de Curitiba (cor cinza claro no mapa B), enquanto o município de Palmeira está localizado integralmente no Planalto de Ponta Grossa (cor marrom claro no mapa B).

Fonte: <http://www.guiageo-parana.com/mapas/geomorfologia.htm>  
<http://www.geografia.seed.pr.gov.br/modules/galeria/detalhe.php?foto=1572&evento=5>

Os animais foram mantidos em pastagem de azevém (*Lolium multiflorum*) e trevo branco (*Trifolium repens*) no inverno e capim bahia (*Paspalum notatum*), capim melador (*Paspalum dilatatum*) e pasto nativo no verão. Além disso, no haras de criação de cavalos PSI, a alimentação foi suplementada com aveia em grãos, alfafa (*Medicago sativa*) e sal mineral protéico. Os potros ficaram com suas mães até completarem 6 meses de vida, quando são separados.

Os animais potros das duas fazendas são desvermifugados com fembendazol a cada 45 dias, dos 2 aos 6 meses de idade. Após isso, os animais são tratados a cada 2 meses com uma associação de ivermectina 0,04% e pamoato de pirantel 38,3%. Os adultos são monitorados através de OPG bimestral e tratamento anti-helmíntico (ivermectina 0,04% e pamoato de pirantel 38,3%) dos animais que apresentam OPG acima de 600.

Todos os animais do estudo apresentaram-se saudáveis no momento da coleta de fezes e sangue, sem a demonstração de qualquer sinal clínico. Na Tabela 1 há informações comparativas entre as duas propriedades de cavalos utilizados na pesquisa.

TABELA 1- QUADRO COMPARATIVO ENTRE AS PROPRIEDADES DOS ANIMAIS UTILIZADOS NO TRABALHO.

	<b>Haras São José da Serra</b>	<b>Rancho JB</b>
Município	São José dos Pinhais	Palmeira
Clima	Cfa	Cfb
Raça dos Animais	PSI	Crioulo
Classificação etária dos animais do trabalho	Potros e éguas	Garanhões, éguas e animais jovens
Sexo dos animais do trabalho	Machos e fêmeas	Machos e fêmeas
Alimentação	Pastagem + grãos + alfafa	Pastagem + grãos + alfafa
Estado clínico dos animais	Todos saudáveis	Todos saudáveis

Legenda: PSI (Puro Sangue Inglês), Cfa (clima subtropical úmido sem estação de seca e com verão quente) e Cfb (clima subtropical úmido sem estação de seca com verão moderado).

Fonte: O autor (2018).

## 4.2 COMITÊ DE ÉTICA

O presente trabalho experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPR (Resolução 86/11 – CEPE) com Parecer nº 026/2014, Banpesq/Thales: 2012014939.

## 4.3 AMOSTRAS DE FEZES E SANGUE

Foram coletados fezes e sangue dos animais PSI em dois momentos. Primeiramente foram coletados fezes e sangue de 30 animais PSI, todos potros de 1 ano de idade. Assim como foram coletados fezes e sangue de 44 animais da raça Crioulo, sendo que esses animais assim como os PSI foram separados em três grupos de acordo com o OPG (valores menores, intermediários e maiores) para a

análise estatística. A coleta de sangue foi realizada por punção da veia jugular e foi transferido para tubos contendo anticoagulante EDTA e para tubos secos. O sangue foi armazenado sob-refrigeração, e processado no mesmo dia da coleta. As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais, armazenadas sob-refrigeração e encaminhadas ao laboratório de Doenças Parasitárias do Setor de Ciências Agrárias da UFPR para a avaliação coproparasitológica pela técnica de Gordon e Whitlock (1939) modificada. Nesse momento, foram selecionados 6 animais da raça PSI e 3 da raça Crioulo, considerando os animais de cada raça com as maiores e com as menores contagens de OPG. Desses animais é que foram feitos os estudos de metilação do gene *SLC11a1*.

Em um segundo momento, foram coletados sangue e fezes dos animais PSI, sendo que foram utilizados os mesmos 30 potros do momento anterior e mais 21 éguas adultas, totalizando 51 animais. Desses animais foi realizado a contagem de OPG; do soro desses animais foi realizado um teste ELISA; e foram realizados a análise de Ht e CDL. Esses animais foram separados em dois grupos para a análise estatística, sendo o grupo dos potros com 30 animais e o grupo das éguas adultas com 21 animais, além disso, assim como os Crioulos, esses animais foram separados em três categorias conforme o OPG (menores, intermediários e maiores) para a realização de análise estatística dos resultados. Foram pesquisados a existência de diferença estatística dos resultados dos indicadores analisados entre os diferentes grupos de cavalos. Das éguas adultas desse grupo também foi analisado o número de prêmios em provas de corrida.

Dos animais Crioulo, foi realizado o teste de ELISA a partir do soro do sangue coletado e centrifugado no primeiro e único momento para os animais dessa raça.

#### 4.4 EXAME COPROPARASITOLÓGICO

O exame coproparasitológico foi realizado segundo a técnica de Gordon e Whitlock (1939) modificada. O processamento foi realizado utilizando 4 g de fezes e 26 ml de solução hipersaturada de açúcar, colocando em câmara McMaster para a contagem de OPG. A visualização e contagem dos ovos foi realizada com microscópio ótico no aumento de 10 ou 20 vezes e fator de conversão de 25 para cada ovo (1 ovo contado: 25 de OPG) (CASTRO et al., 2014). Para a análise

parasitária, foi realizada de algumas amostras a coprocultura pela Técnica de Roberts e O'Sullivan (Anexo 3), com a finalidade de identificar os parasitos presentes nas fezes através de suas larvas.

#### 4.5 TESTE ELISA, HEMATÓCRITO (HT), CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS (CDL) E RESULTADOS DE COMPETIÇÕES ESPORTIVAS

A partir da coleta de sangue dos animais, o soro e o sangue total foram avaliados por diferentes técnicas. Para verificação de título de anticorpos contra as formas larvais encistadas de parasitos ciatostomíneos nos animais das duas raças, foi realizado o teste de ELISA utilizando o soro dos animais. O teste ELISA foi realizado no *Moredun Research Institute* localizado em Edimburgo na Escócia, e a metodologia do teste está descrita no Anexo 4 deste trabalho.

Os valores individuais de hematócrito e contagem diferencial de leucócitos do sangue foram obtidos apenas dos animais da raça PSI. O hematócrito foi medido pela técnica micro hematócrito, através da centrifugação do sangue em centrífuga de micro capilar por 5 minutos a 5.400 g. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada através dos esfregaços sanguíneos e coloração das lâminas com o protocolo Panótipo Rápido. Ambos os exames foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da UFPR.

Para os equinos PSI, foi analisado através do *Stud book* brasileiro (<http://abcpcc.com.br/>), o número de vitórias e participações com destaque em provas de corrida no Brasil. O *Stud book* é uma ferramenta *online*, presente na página da Associação Brasileira de Criadores e Proprietários do Cavalo de Corrida. Nessa consulta, foram consideradas as participações nas principais provas de corrida do país e a colocação até o quinto lugar.

#### 4.6 ESCOLHA DO GENE DE ESTUDO A PARTIR DA ANÁLISE DO GENOMA DE EQUINO

A partir do banco de dados do epigenoma de equino *The Horse Epigenome Database* (HEpD) e de dados do *GenBank*, foram escolhidos diferentes genes, sendo o critério de inclusão, os que possuíam alguma descrição na literatura relacionada a infecções e infecções parasitárias (Tabela 2).

TABELA 2- GENES PESQUISADOS QUANTO À SUA FUNÇÃO DE DEFESA NO ORGANISMO DO EQUINO, APRESENTANDO RELAÇÃO COM O PARASITISMO.

Genes Pesquisados	Função do gene
CYCS cytochrome c, somatic [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 100053958	Citocromo C
PTGS2 prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 791253	Síntese de Prostaglandina
GPT glutamic-pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 100064717	Alanina Aminotransferase
ORC1 origin recognition complex subunit 1 [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 100061980	Complexo Ribossomal
KIT v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 100009704	Receptor de Tirosina Quinase
SCN4A sodium channel, voltage gated, type IV alpha subunit [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 100049793	Transporte de íons sódio
ALAD aminolevulinatase dehydratase [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 100052763	Aminolevulinato Desidratase
GYS1 glycogen synthase 1 (muscle) [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 100054723	Síntese de Glicogênio
GH1 growth hormone 1 [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 100034180	Hormônio do Crescimento
COMP cartilage oligomeric matrix protein [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 100033911	Matriz protéica da cartilagem
CYP19A1 cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 100009712	Citocromo P450
EDNRB endothelin receptor type B [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 100033875	Receptor de Endotelina
DRB MHC class II DR-beta chain [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 100052364	MHC classe 2
VEGFA vascular endothelial growth factor A [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 100033839	Fator de crescimento vascular endotelial
COL2A1 collagen, type II, alpha 1 [ <i>Equus caballus</i> (horse) ] Gene ID: 791241	Síntese de colágeno tipo 2
<b>SLC11A1 solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter), member 1 [ <i>Equus caballus</i>(horse) ] Gene ID: 100033912</b>	<b>Carreadora de solutos</b>

Legenda: Gene *SLC11a1* em negrito, foi o gene escolhido para o presente trabalho.

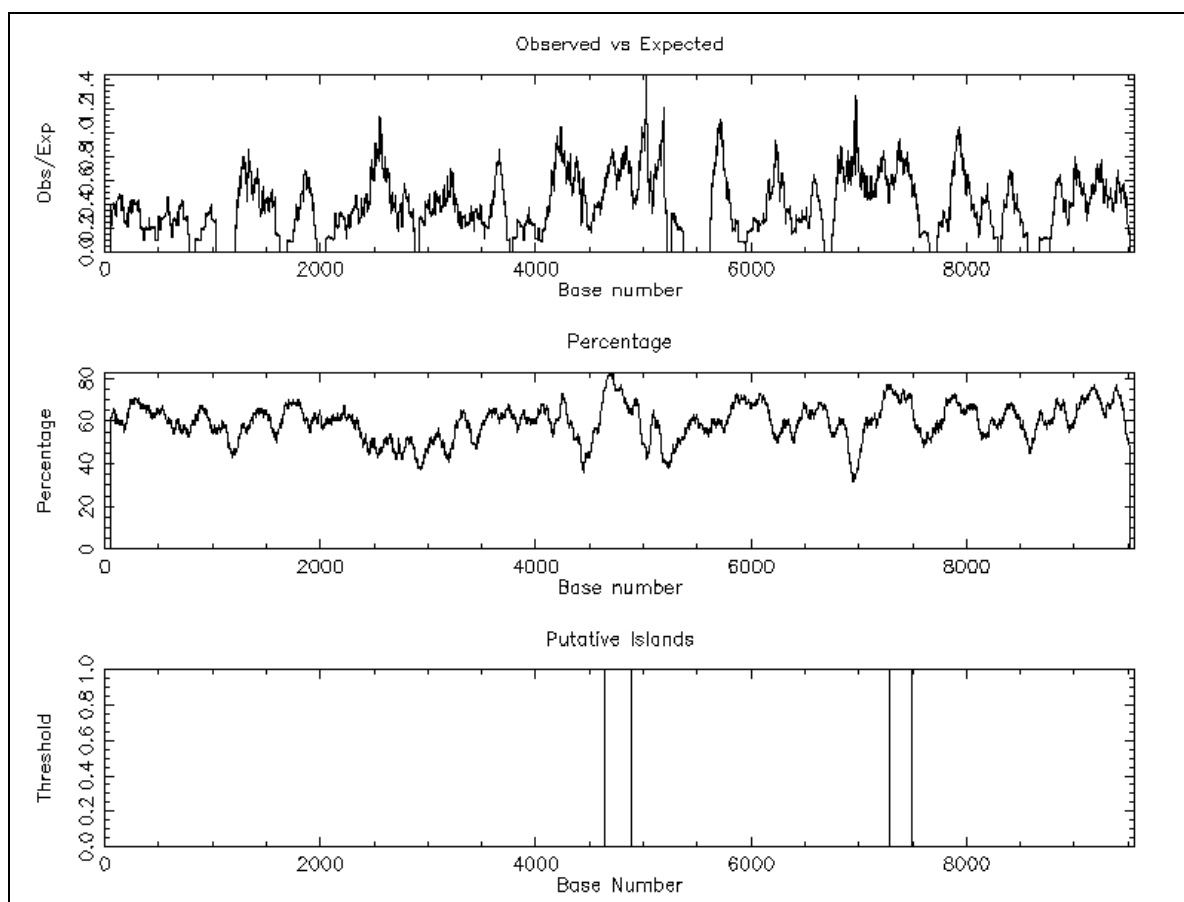
Fonte: O autor (2018)

Para cada gene da lista acima, a sequência foi acrescida de 1000 pb a jusante e a montante e analisada para a identificação e busca de ilhas de CpG. O gene *SLC11a1*, além de estar intimamente relacionado à resposta imune e a resistência e/ou susceptibilidade do hospedeiro para patógenos, foi escolhido por apresentar ilhas de CpG dentro dos critérios estipulados por GARDINER e FROMER (1987). Critérios estes, sendo importantes para que o gene possa ser regulado por mecanismos de metilação do DNA.

#### 4.7 ANÁLISE *IN SILICO* DO GENE *SLC11a1*

A sequência de DNA do gene *SLC11a1* (sequência de referência NC\_009149.2) foi obtida do *National Center of Biotechnology Info* - NCBI. Para verificar a presença de ilhas de CpG, foi utilizado o *software* livre CpGPlot, disponível na página do grupo *European Bioinformatics Institute*- EBI (CpGPLOT, 2008). Esse *software* considera como ilhas de CpG os fragmentos com mais de 200 pares de bases, contendo pelo menos 50% de C e G; e uma razão entre a frequência observada e a esperada de dinucleotídeos CG superior ou igual a 0,6 (GARDINER-GARDEN e FROMMER, 1987) (Figura 13).

FIGURA 13- ANÁLISE DO GENE *SLC11a1* PELO CPGPLOT, DO NUCLEOTÍDEO 01 AO 9561, QUANTO AOS CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DE UMA ILHA CpG.



Os três gráficos indicam de cima para baixo, respectivamente, a razão entre o que é observado e o que é esperado de dinucleotídeos CpG (deve ser >0.60); o percentual de nucleotídeos C e G (deve ser >50,0%) e o tamanho da ilha quanto ao número de nucleotídeos (deve ser >200).

Fonte: Adaptado de CpGPLOT (2018).

#### 4.8 EXTRAÇÃO DE DNA DA CAMADA DE LEUCÓCITOS

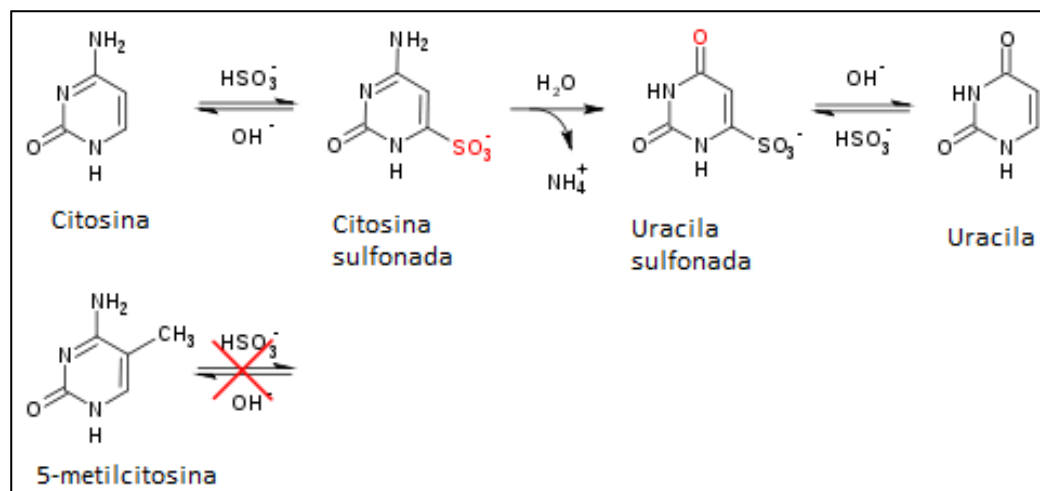
A partir de 5 mL de sangue extraído, os tubos com EDTA foram centrifugados por 5 minutos a 2.800 g e a camada de leucócitos foi transferida para um tubo de 1,5 mL e congelada a -20 °C. Para a extração do DNA leucocitário, foi utilizado o *Mini Spin Plus 250* (Biopur) de acordo com o protocolo do fabricante. Após este procedimento, foram determinadas as concentrações das amostras de DNA (ng/ $\mu$ L) e seu grau de pureza com *Qubit 2.0 Fluorometer* (Invitrogen, USA).

#### 4.9 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

Cerca de 1000 ng de DNA extraídos dos leucócitos foi submetido ao tratamento com o bissulfito de sódio para se fazer a análise de metilação. O método empregado para tratar o DNA com bissulfito de sódio corresponde a uma adaptação do método de JERÓNIMO et al. (2001). Para o tratamento de DNA com bissulfito de sódio, foi utilizado o *EpiTect Bisulfite kit*, Qiagen (Hilden, Germany) segundo protocolo fornecido pelo fabricante.

Este tratamento consiste de uma reação química no qual as citosinas presentes no DNA são convertidas em uracilas (Figura 14), enquanto as citosinas metiladas permanecem como citosinas, sendo posteriormente submetido à amplificação por PCR com oligos desenhados, considerando o processo de conversão. Portanto, após a reação de PCR de sequenciamento se observa a substituição das citosinas não metiladas por timinas.

FIGURA 14- DIAGRAMA SOBRE O TRATAMENTO DO DNA DA AMOSTRA COM BISSULFITO DE SÓDIO.



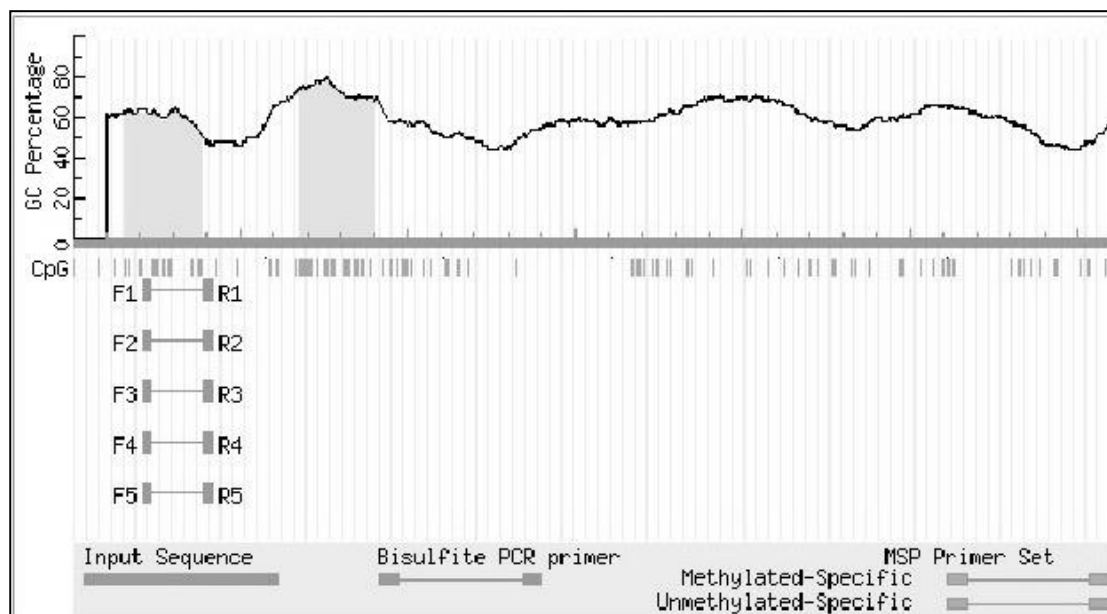
A citosina não metilada recebe o grupo sulfito ( $\text{SO}_3^-$ ) sendo transformada em citosina sulfonada. Esta sofre a reação de deaminação (perda de  $\text{NH}_4^+$ ) formando a uracila sulfonada, a qual passa pelo processo de dessulfonação alcalina, liberando o grupamento sulfito. Entretanto, quando a citosina é metilada ela se torna refratária a este tratamento, permanecendo citosina ao fim da reação.

Fonte: Adaptado de <https://www.neb.com/applications/epigenetics/dna-methylation-analysis/bisulfite-conversion> (2018).

Basicamente, esse tratamento consistiu na conversão mediada pelo bissulfito de sódio das citosinas não-metiladas; ligação do DNA tratado com a sílica presente na membrana de uma coluna; lavagem e dessulfonação do DNA ligado à membrana; lavagem para remoção do agente de dessulfonação (hidróxido de sódio) e eluição do DNA. O DNA tratado foi alíquotado e armazenado a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.10 AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CpG DO GENE *SLC11a1*

Os fragmentos das ilhas de CpGs do gene *SLC11a1* foram amplificados por PCR estando os oligonucleotídeos flanqueando as ilhas identificadas. Os iniciadores utilizados para estas regiões foram planejados a partir da sequência de nucleotídeos, após o tratamento com bissulfito utilizando o programa *Methprimer* (Methprimer, 2008) (Figura 15).

FIGURA 15- ILUSTRAÇÃO DAS ILHAS 1 E 2 DE CpG DO GENE *SLC11a1* DE EQUINOS.

A barra em cinza claro identifica as duas ilhas de CpG do gene *SLC11a1* através do Programa *Methprimer*. Este programa identifica oligos para realizar a reação de PCR de fragmentos de DNA tratados com Bissulfito de sódio.

Fonte: *Methprimer* (2018).

As reações de PCR foram realizadas utilizando tampão 1 X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 5 U/μL *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen, Löhne, Germany), 0,4 μM oligonucleotídeos universal e reverso, DNA previamente tratado com bissulfito de sódio e água ultrapura em um volume final de 20 μL. Para a amplificação dos fragmentos da Ilha 1, foi utilizado a condição de reação de desnaturação inicial por 5 minutos a 95 °C para liberação do sítio ativo da enzima utilizada; seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos. Ao final da ciclagem, as moléculas foram estendidas por 5 minutos a 72 °C (Figura 16).





#### 4.12 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA

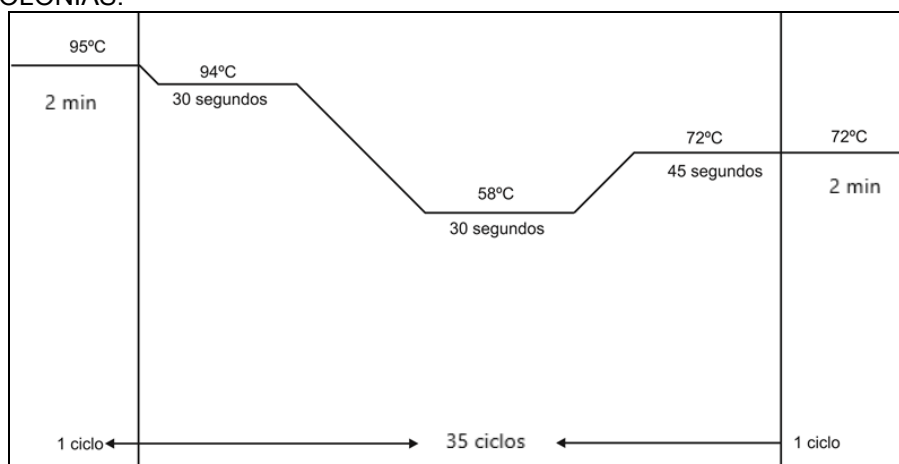
Para amplificar ainda mais os fragmentos de DNA estudados, o produto de ligação foi transformado por eletroporação em bactérias *E. coli* DH10B eletrocompetentes conforme descrito por SAMBROOK e RUSSEL (2001).

Após a eletroporação, a suspensão de células foi plaqueada em meio LA (Luria Bertani e ágar) contendo estreptomicina 20 µg/mL, ampicilina 250 µg/mL, IPTG 45 µg/mL e X-Gal 25 µg/mL para a seleção dos clones por alfa complementação. O meio continha ampicilina cuja resistência foi disponibilizada pelo vetor, com a finalidade de evitar o crescimento de outras bactérias sem o vetor (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

Para a confirmação da clonagem foram selecionadas colônias isoladas de cada placa. Cada colônia foi coletada com um palito estéril e semeada em uma nova placa (placa mãe) e submetida a uma reação de PCR, com os oligonucleotídeos da ilha de CpG correspondente em questão para confirmar a presença do inserto. Este procedimento foi realizado como controle da clonagem, uma vez que existiam possibilidades de haver clones falsos positivos.

Para as reações de PCR foram utilizados tampão 1 X (Invitrogen, Löhne, Germany), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 5 U/µL *Taq polimerase* (Invitrogen, Löhne, Germany), 0,4 µM oligonucleotídeos universal e reverso e água ultrapura em um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram desnaturação por 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos. Ao final da ciclagem as moléculas foram estendidas por 2 minutos a 72 °C (Figura 19).

FIGURA 19- CONDIÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA DE UMA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIAS.



Fonte: O autor (2018).

#### 4.13 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Oito clones positivos na reação de PCR foram submetidos à extração de DNA plasmidial com o *Kit PureLink Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen, Löhne, Germany). Esta quantidade de clones já é bem preconizada em estudos com humanos, mostrando ser o suficiente para a representatividade alélica. Para isto, os clones positivos e confirmados pelo PCR foram inoculados em 3 mL de meio Luria Bertani (LB), contendo os antibióticos estreptomicina 20 µg/mL e ampicilina 250 µg/mL, e incubados a 37 °C, sob agitação aproximada de 15.000 giros (C25Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, NJ, USA) por cerca de 16 horas. Da cultura crescida, as bactérias foram concentradas por centrifugação e, em seguida, lisadas sob condições alcalinas, na presença de RNase A. O lisado foi neutralizado e o DNA plasmidial foi ligado à membrana de sílica de uma coluna. A coluna foi lavada e o DNA foi eluído em tampão com baixa concentração de sal conforme o protocolo do *Kit PureLink Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen, Löhne, Germany). O DNA extraído e purificado foi armazenado a -20 °C.

#### 4.14 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E POLIACRILAMIDA

O DNA obtido dos leucócitos do sangue e o DNA plasmidial extraído das colônias de bactérias foram visualizados em géis de agarose 0,8%, corados com brometo de etídeo 0,2 µg/mL. Os produtos das reações de PCR após o tratamento

com bissulfito de sódio, e os produtos das reações de PCR de colônias foram avaliados em géis de poliacrilamida.

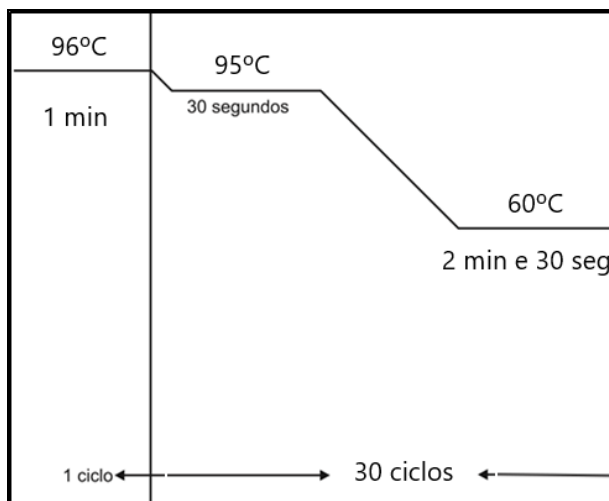
Os géis de poliacrilamida 8% foram feitos utilizando-se uma solução de acrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, TEMED a 0,1% (Life Technologies) como doador de elétrons da reação e persulfato de amônio (APS) a 0,1% como catalisador da reação. As eletroforeses foram conduzidas em aparato de gel médio a 120 V por aproximadamente 1 hora. A revelação dos resultados foi feita pela impregnação com nitrato de prata. Para a fixação, cada gel de aproximadamente 56 cm<sup>2</sup> foi incubado por três minutos em 50 mL de solução fixadora (0,75% de ácido acético glacial, 10% de etanol absoluto), sob agitação à temperatura ambiente. A esta solução foi adicionado 1 mL de nitrato de prata (10%) e o gel foi incubado por mais 10 minutos. Após impregnação do DNA com prata, o fixador foi desprezado e o gel foi lavado com água corrente. Para a revelação, foram adicionados 50 mL de solução reveladora (hidróxido de sódio 3%) seguida de 0,7 mL de formaldeído 37%. O gel foi incubado sob agitação até o aparecimento de uma coloração castanho escura ao DNA impregnado. Após a revelação, o gel foi incubado em 50 mL de solução fixadora por 10 minutos, lavado com água destilada e, a seguir, foi seco a temperatura ambiente em papel celofane transparente. Este método de coloração é mais sensível em relação à agarose, sendo importante para a avaliação dos resultados tanto positivos quanto negativos das amostras analisadas (brometo de etídeo tem sensibilidade na ordem de nanograma e a coloração por prata na ordem de picograma de DNA).

#### 4.15 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Após a obtenção do DNA plasmidial foi dada continuidade à reação de sequenciamento. Para isto foi realizada a técnica de terminação com dideoxynucleotídeos descrita por SANGER, NICKLEN e COULSON (1977) utilizando-se o *Big Dye Terminator Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), segundo as instruções do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada em um sistema contendo 1 µL de *Big Dye Terminator* v3.0; 1 µL de tampão *Save Money* 2,5 X (200 mM TrisHCl, pH 8,5; 5 mM MgCl<sub>2</sub>), 10 pmol de iniciador reverso M13 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), cerca de 300 a 500 ng de DNA plasmidial e água ultrapura em um sistema de 10 µL. As condições utilizadas no termociclador foram de 96 °C por 1

minuto, seguido por 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 2 minutos e 30 segundos (Figura 20).

FIGURA 20- CONDIÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA DA REAÇÃO DE PCR PARA O SEQUENCIAMENTO DO DNA.



Fonte: O autor (2018).

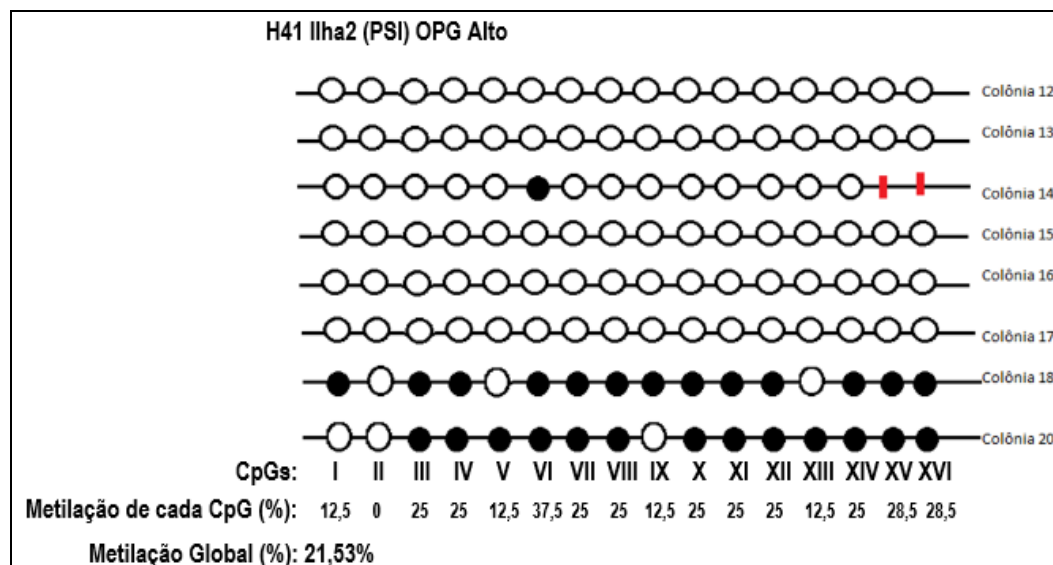
Os produtos amplificados, foram precipitados em acetato de amônio 7,5 M e etanol absoluto, lavados em etanol 70%, deixados para secar a 37°C e submetidos a eletroforese capilar no sequenciador ABI 3500 XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

A partir do cromatograma obtido na reação de sequenciamento, a sequência nucleotídica dos clones foram comparadas à sequência original. A partir do sequenciamento com o auxílio do *software* livre *BioEdit Sequence Alignment Editor*, as sequências dos clones foram alinhadas utilizando o programa *ClustalW*.

#### 4.16 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO

Foram analisadas as sequências e comparadas quanto à presença de dinucleotídeos CG (quando metilados) ou TG (quando não metilados). A partir destes resultados, foram gerados gráficos, analisando e calculando o percentual de metilação (Figura 21). Após isso, essas informações foram relacionadas com o valor de OPG de cada grupo de animais.

FIGURA 21- EXEMPLO DO PERFIL DE METILAÇÃO DE UMA AMOSTRA QUE CORRESPONDE A COLÔNIAS QUE CONTÉM O FRAGMENTO DE DNA DA ILHA 2 DE CpG DO ANIMAL PSI 41.



Os círculos pretos representam os CpGs metilados e os brancos representam os CpGs não metilados. Os CpG contidos na sequência estão indicados em algarismos romanos. Os valores de metilação individual para cada CpG estão marcados abaixo, e a partir destes valores, é calculado perfil de metilação global do fragmento para determinada condição. A metilação global para essa amostra foi de 21,53%.

Fonte: O autor (2018).

#### 4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar se existe diferença na quantidade de casos de metilação do DNA em referência às ilhas 1 e 2 de CpG, foi aplicado o teste qui-quadrado de Pearson para avaliar a hipótese de igualdade na proporção entre os casos de metilação nas ilhas 1 e 2 (PAULINO e SINGER, 2006). Para avaliar a possível relação existente entre OPG e a metilação global do DNA para animais com OPG baixo e alto nos casos das ilhas 1 e 2, foi calculado a correlação linear entre as variáveis OPG e metilação (WALPOLE et al., 2009). A mesma técnica foi usada na avaliação das correlações entre as variáveis OPG, sexo, valor do hematócrito, percentagem de neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos, resultado do teste ELISA e o número de prêmios em provas de corrida. Como comparativo, os gráficos na seção de resultados apresentam as relações entre essas variáveis citadas acima. Para a composição das análises e gráficos estatísticos foi utilizado o programa estatístico *R Core Team* (R-Software, 2018).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 QUANTIDADE DE OPG DOS EQUINOS

Dos animais da raça PSI, no primeiro momento (07/07/2015) foram feitos OPG de 30 animais potros (Tabela 3), sendo que foram selecionados 6 desses animais para o estudo de metilação do DNA.

TABELA 3- RESULTADO DA CONTAGEM DE OPG DE ESTRONGILÍDEOS E *PARASCARIS* DOS POTROS PSI DA GERAÇÃO 2014. (continua)

Animais Potros Geração 2014	07/07/15	
	Estrongilídeos	<i>Parascaris</i>
AVANT TOUJOURS	0	0
TCHELONA	40	0
MY PEPPER	50	0
GLAD	90	0
HEY CHRIS	90	0
OLYMPIC FRIST CLASS	90	0
OLYMPIC KISS	90	0
TALE E QUALE	100	0
IDREAMEDIDREAM	120	0
ENGLISH HOME	150	0
M. BLANCH	150	0
OLYMPIC LADY	160	0
TANTO QUANTO	160	0
OP COLONY	180	0
DESEJADA TIME	190	0
SAGACITA	190	0
MESANGE	220	0
SECOND AMERICAN	270	0
TODAS AS FLORES	300	0
GUIRLANDA	330	0
LADY THONG	390	0
IN THE SAND	460	0
MÁQUINA MARAVILHA	540	0
SOLENNITA	570	0
SENSIBILIDADE	830	0
DASH OF LOVE	960	0
PAOLA RUBIA	970	0

TABELA 3- RESULTADO DA CONTAGEM DE OPG DE ESTRONGILÍDEOS E *PARASCARIS* DOS POTROS PSI DA GERAÇÃO 2014. (conclusão)

SCHWARZE CAT	1220	0
JUSTINI HEININ	1300	0
SWEET MIND	1360	0
<b>Média</b>	<b>385,6666667</b>	<b>0</b>

Legenda: desses animais foram selecionados alguns animais com menores OPG de estrongilídeos e alguns com maiores OPG de estrongilídeos para fazer a pesquisa de metilação do DNA.

Fonte: O autor (2018).

Dos animais Crioulo, foram feitos OPG de 44 animais (Tabela 4), sendo selecionados 3 animais para a pesquisa de metilação do DNA.

TABELA 4- RESULTADO DE OPG DE ESTRONGILÍDEOS E DO TESTE ELISA DOS CAVALOS DA RAÇA CRIOULO, COM O NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO, SEXO E IDADE DE CADA ANIMAL. (continua)

Nº de identificação dos cavalos Crioulo	Sexo	Idade (Anos)	OPG de Estrongilídeos	ELISA
77	F	14	2080	18,58
78	F	25	200	12,15
79	F	25	690	10,93
80	F	16	820	49,91
81	F	12	1630	19,39
82	M	5	0	18,03
83	M	6	0	14,92
84	M	8	0	12,15
85	M	6	0	11,99
86	M	7	0	7,00
87	F	21	1470	12,21
88	F	11	620	11,00
89	F	14	1340	11,72
90	F	18	1420	90,54
91	F	21	410	30,49
92	F	18	1400	20,00
93	F	12	1440	63,96
94	M	6	1270	38,83
95	F	5	1020	40,66
96	F	6	0	41,60
97	F	6	1270	62,65
98	F	22	1260	13,84
99	F	5	1020	104,21
100	F	10	1180	27,09
101	F	16	580	18,28

TABELA 4- RESULTADO DE OPG DE ESTRONGILÍDEOS E DO TESTE ELISA DOS CAVALOS DA RAÇA CRIOULO, COM O NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO, SEXO E IDADE DE CADA ANIMAL. (conclusão)

102	F	6	2340	51,34
103	F	15	1880	33,75
104	F	17	610	49,81
105	F	4	10	71,94
106	F	19	520	28,22
107	F	3	250	91,91
108	F	3	690	66,08
109	F	2	520	112,72
110	M	11	0	82,93
111	F	10	0	41,37
112	F	4	0	32,41
113	M	4	0	18,30
114	F	13	320	11,18
115	F	5	10	55,20
116	F	4	1680	45,05
117	M	3	0	10,78
118	F	8	0	17,65
119	M	11	0	10,04
120	M	7	0	11,37

Fonte: O autor (2018).

O critério de escolha dos animais experimentais levou em consideração valores altos e baixos de OPG de estrongilídeos para cada raça e localidade, não apresentando um valor fixo como linha de corte. Destes grupos, foram selecionados 6 cavalos PSI (sendo 3 com OPG baixo e 3 com OPG alto) e 3 cavalos Crioulo (sendo 1 com OPG baixo e 2 com OPG alto) (Tabela 5).

Para a análise parasitária dos animais foram utilizados os registros dos laudos coproparasitológicos do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná, no qual foram identificados 98% de larvas de ciatostomíneos e 2% de grandes estrôngilos.

TABELA 5- IDENTIFICAÇÃO DOS CAVALOS SELECIONADOS PARA A PESQUISA DE METILAÇÃO DO DNA SEPARADOS POR RAÇA, E OS RESPECTIVOS VALORES DE OPG (OVOS POR GRAMA DE FEZES).

Identificação CAVALOS PSI	OPG de Estrongilídeos	Identificação CAVALOS CRIOULO	OPG de Estrongilídeos
<b>60</b>	40	<b>86</b>	0
<b>46</b>	50		
<b>36</b>	90		
Média	60	Média	0
<b>33</b>	960	<b>81</b>	1630
<b>51</b>	970	<b>77</b>	2080
<b>41</b>	1300		
Média	1076	Média	1855

Legenda: PSI (Puro Sangue Inglês) e Crioulo, separados em duas colunas. À esquerda encontra-se o código do animal e à direita o seu valor de OPG (ovos por grama de fezes) de eststrongilídeos. Em negrito, os animais utilizados no trabalho, sendo seis PSI e três Crioulo.

Fonte: O autor (2018).

Em um segundo momento (05/11/2015), dos animais da raça PSI, foram realizados OPG a partir das fezes, e a partir do sangue foi realizado Hematócrito e Contagem Diferencial de Leucócitos, e do soro foi realizado um teste de ELISA (Tabela 6). Esse grupo foi composto de 51 animais, sendo potros e éguas adultas.

## 5.2 RESULTADOS DE ELISA, HEMATÓCRITO, CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS E A RELAÇÃO COM RESULTADOS DE OPG

Para os animais da raça PSI, foram relacionados os valores de OPG de 05/11/2015 aos valores de hematócrito e contagem diferencial de leucócitos (Tabela 6), os quais foram realizados com sangue coletado no mesmo dia em que foi feito o exame de OPG.

Esse mesmo grupo de animais da raça PSI também foram submetidos à análise dos títulos de anticorpos pelo teste de ELISA para ciatostomíneos encistados na mucosa intestinal. O teste de correlação foi realizado entre os valores obtidos do OPG, ELISA, os resultados do hematócrito e da contagem diferencial de leucócitos.

TABELA 6- RESULTADOS DE OPG DE ESTRONGILÍDEOS DOS ANIMAIS PSI (DATA 05/11/2015), RESULTADOS DE HEMATÓCRITO E CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS (04/11/2015), RESULTADOS DO ELISA DO SORO DO SANGUE COLETADO NESTA DATA, ALÉM DA IDENTIFICAÇÃO, DO SEXO E DA IDADE DE CADA UM.

Identificação	Nome do animal	Sexo	Idade	OPG 5/11/15	ELISA	Ht 4/11/15	Neut. Segm. 4/11/15	Neut. Bast.	Linfócito	Eosinófilo	Monócito	Basófilo
32 G14	AVANT TOUJOURS	F	1	520	38,91	37	52	0	43	4	1	0
33 G14	DASH OF LOVE	F	1	50	70,91	40	59	0	39	2	0	0
34 G14	DESEJADA TIME	F	1	770	38,71	35	60	0	38	2	0	0
35 G14	ENGLISH HOME	M	1	720	74,15	38	50	0	49	1	0	0
36 G14	GLAD	M	1	480	47,94	38	73	0	26	1	0	0
37 G14	GUIRLANDA	M	1	310	72,40	46	58	0	41	1	0	0
38 G14	HEY CHRIS	M	1	190	108,01	39	48	0	51	1	0	0
39 G14	IDREAMEDIDREAM	M	1	730	66,01	42	64	0	34	0	1	1
40 G14	IN THE SAND	M	1	410	22,53	37	55	0	44	1	0	0
41 G14	JUSTINI HEININ	F	1	260	40,53	37	54	0	46	0	0	0
42 G14	LADY THONG	F	1	220	20,87	42	50	0	47	3	0	0
43 G14	M. BLANCH	M	1	940	23,33	41	65	0	34	1	0	0
44 G14	MÁQUINA MARAVILHA	F	1	70	110,26	38	51	0	47	2	0	0
45 G14	MESANGE	M	1	110	15,96	36	60	0	37	1	2	0
46 G14	MY PEPPER	M	1	140	25,13	41	58	0	42	0	0	0
47 G14	OLYMPIC KISS	M	1	780	88,39	38	72	0	27	0	0	1
48 G14	OLYMPIC FRIST CLASS	F	1	510	72,18	37	52	0	44	3	1	0
49 G14	OLYMPIC LADY	M	1	490	27,16	38	66	0	32	1	1	0
50 G14	OP COLONY	M	1	280	12,14	36	70	0	27	3	0	0
51 G14	PAOLA RUBIA	F	1	50	51,39	48	58	0	40	1	1	0
52 G14	SAGACITA	F	1	480	53,93	41	52	0	45	3	0	0
53 G14	SCHWARZE CAT	F	1	40	94,26	38	64	0	34	2	0	0
54 G14	SECOND AMERICAN	M	1	1100	53,91	44	58	0	42	0	0	0
55 G14	SENSIBILIDADE	F	1	390	18,77	42	64	0	36	0	0	0
56 G14	SOLENNITA	F	1	1270	60,00	37	48	0	52	0	0	0
57 G14	SWEET MIND	F	1	580	64,50	38	70	0	28	1	1	0
58 G14	TALE E QUALE	M	1	220	42,13	36	61	0	36	3	0	0
59 G14	TANTO QUANTO	F	1	440	37,05	37	55	0	45	0	0	0
60 G14	TCHELONA	F	1	330	62,98	39	58	0	39	2	1	0
61 G14	TODAS AS FLORES	M	1	190	28,39	37	66	0	33	1	0	0
62 Égua	AVANT TOUJOURS	F	8	160	21,69	42	64	0	29	7	0	0
63 Égua	DASH OF LOVE	F	5	470	13,75	40	55	0	40	4	0	1
64 Égua	DESEJADA TIME	F	8	0	8,37	35	71	0	26	2	0	1
66 Égua	GLAD	F	7	0	12,37	34	71	0	25	4	0	0
67 Égua	GUIRLANDA	F	11	0	10,28	39	58	0	41	1	0	0
68 Égua	HEY CHIRS	F	10	0	12,08	40	60	0	37	3	0	0
69 Égua	IDREAMEDADREAM	F	9	680	30,41	39	67	0	31	1	0	1
70 Égua	IN THE SAND	F	16	280	18,41	39	53	0	46	1	0	0
71 Égua	JUSTINI HEININ	F	8	20	11,20	39	58	0	40	2	0	0
74 Égua	MLLE BLANCHE	F	7	390	21,46	37	63	0	34	3	0	0
75 Égua	MY PEPPER	F	8	240	15,34	35	66	0	29	5	0	0
76 Égua	OLIMPIC KISS	F	7	0	50,31	X	x	x	x	x	x	x
78 Égua	OLIMPIC FIRST CLASS	F	9	1240	19,41	37	62	0	35	2	1	0
79 Égua	PAOLA RUBIA	F	13	0	6,52	35	49	0	50	1	0	0
81 Égua	SCHWARZE CAT	F	11	1890	22,68	38	70	0	28	2	0	0
82 Égua	SECOND AMERICAN	F	10	0	14,44	38	53	0	44	3	0	0
83 Égua	SENSIBILIDADE	F	11	30	25,69	38	67	0	28	5	0	0
84 Égua	SOLENNITÁ	F	10	0	24,10	36	32	0	51	16	0	1
85 Égua	SWEET MIND	F	22	0	7,62	X	x	x	x	x	x	x
86 Égua	TALE E QUALE	F	20	10	44,94	X	x	x	x	x	x	x
89 Égua	TODAS AS FLORES	F	12	100	68,44	34	48	0	47	5	0	0

Legenda: OPG=ovos por grama de fezes; S=sexo; Ht=hematócrito; Segm= neutrófilos segmentados; Bast= neutrófilos bastonetes; Linf= linfócitos; Eos= eosinófilos; Mon= monócitos; Bas=basófilos. Ht referência=32 a 52%; Segm referência=30 a 65%; Bast referência=0 a 2%; Linf referência=25 a 70%; Eos referência=0 a 11%; Mon referência=1 a 7%; Bas referência=0 a 3%. Os animais estão separados por idade, estando na parte de cima os animais potros com 1 ano de idade e na parte de baixo as éguas adultas.

Fonte: O autor (2018).

Analisando os resultados da tabela acima, separando os animais PSI em dois grupos, sendo o grupo dos animais potros (Geração 2014) e o grupo das éguas adultas, foi comparado os resultados para analisar a existência de diferença estatística (Tabela 7) entre esses dois grupos. Foi observado diferença estatística entre o grupo dos potros e o grupo das éguas adultas para os resultados de ELISA, hematócrito e de eosinófilos.

TABELA 7- VALOR DE PROBABILIDADE (p) DOS RESULTADOS DE OVOS POR GRAMA DE FEZES (OPG), ELISA, HEMATÓCRITO (Ht), NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS E EOSINÓFILOS ENTRE DIFERENTES CATEGORIAS; POTROS E ANIMAIS ADULTOS DA RAÇA PURO SANGUE INGLÊS.

COMPARACAO ENTRE FATORES	VALOR DE p
OPG entre grupo de animais potros e grupo de animais adultos	0,159
ELISA entre grupo de animais potros e animais adultos	0,00001
Ht entre grupo de animais potros e grupo de animais adultos	0,045
Segmentados entre grupo de animais potros e grupo de animais adultos	0,928
Eosinófilos entre grupo de animais potros e grupo de animais adultos	0,037

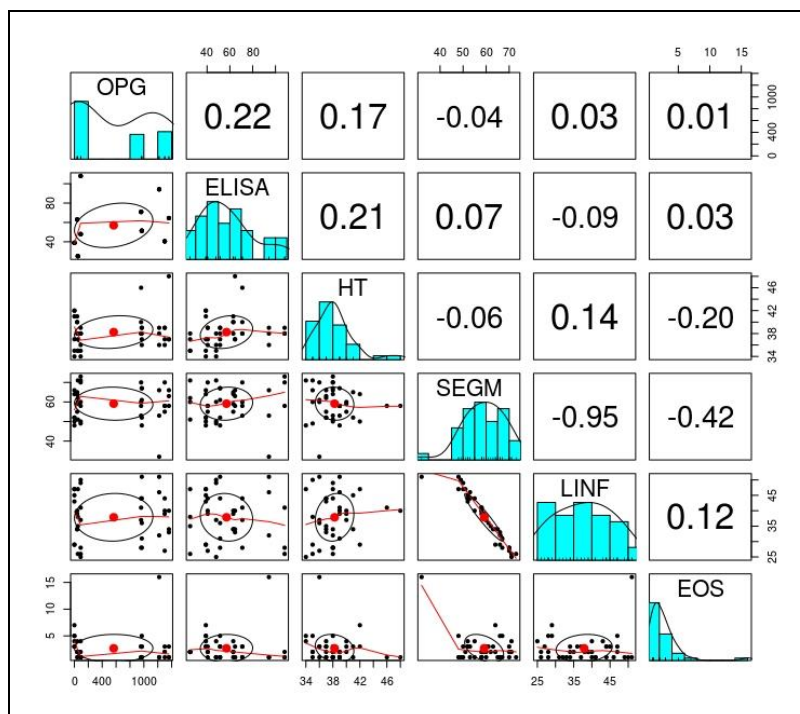
Legenda: OPG=ovos por grama de fezes; Ht=hematócrito.

Fonte: O autor (2018).

Foi realizada a análise de correlação entre os resultados dos exames de OPG, ELISA, Ht e CDL dos animais PSI (Figura 22). Os resultados obtidos mostraram que nos cavalos PSI (n=51) houve uma correlação fraca de  $R=0,22$  entre o ELISA e OPG. Houve uma fraca correlação de  $R=0,17$  entre os valores de OPG e de Ht nessa população de cavalos. Relacionando os resultados de OPG com neutrófilos segmentados, linfócitos e eosinófilos não foram encontradas correlações.

Considerando os cavalos PSI separados por idade, no grupo dos potros e no grupo das éguas adultas foi observada uma fraca correlação entre OPG e ELISA com  $R=-0,02$  e  $R=0,113$  respectivamente. Separando os animais PSI pelo sexo, tanto o grupo dos machos quanto o grupo das fêmeas apresentaram correlação fraca entre OPG e ELISA com  $R=0,229$  e  $R=0,031$  respectivamente.

FIGURA 22- QUADRO COM AS CORRELAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE OPG, ELISA, Ht E CDL DOS CAVALOS PSI, CONSIDERANDO OS ANIMAIS POTROS E ADULTOS (n=51).



Análise de correlação para os resultados de contagem de ovos por grama de fezes (OPG), ELISA, hematócrito (Ht) e contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos segmentados, linfócitos e eosinófilos) dos cavalos da raça Puro Sangue Inglês. A figura é dividida em um formato matricial com uma triangulação superior, inferior e uma linha diagonal principal. A triangulação superior mostra os valores de correlação entre as variáveis, já a triangulação inferior mostra-nos um possível ajuste de modelo linear e a linha diagonal simples contém histogramas das distribuições dos dados das variáveis. Foi verificada uma correlação fraca entre OPG e ELISA ( $R=0,22$ ) e entre OPG e Ht ( $R=0,17$ ). Entre segmentados e linfócitos há uma correlação negativa forte ( $R=-0,95$ ), pois os valores se complementam opostamente.

Fonte: O autor (2018).

Estudando os animais PSI em separado pela idade, o grupo dos animais jovens apresentou correlações fracas entre o OPG e o ELISA ( $R=-0,02$ ), OPG e Ht ( $R=-0,044$ ), OPG e Segmentados ( $R=0,017$ ), OPG e Linfócitos ( $R=0,029$ ) e entre OPG e Eosinófilos ( $R=-0,304$ ). O grupo das éguas adultas apresentou correlações fracas e moderadas entre os exames OPG e ELISA ( $R=0,113$ ), OPG e Ht ( $R=0,129$ ), OPG e Segmentados ( $R=0,324$ ), OPG e Linfócitos ( $R=-0,293$ ) e entre OPG e Eosinófilos ( $R=-0,235$ ).

Além disso, os animais PSI foram separados em três grupos distintos de acordo com o OPG (Tabela 8), sendo os grupos dos animais com o OPG baixo, intermediário e alto.

TABELA 8- RESULTADOS DE OPG E ELISA DOS CAVALOS PSI E SEPARAÇÃO EM TRÊS GRUPOS DE ACORDO COM O OPG. (continua)

Identificação	Sexo	Idade (anos)	OPG 5/11/15	ELISA	
64 Égua	F	8	0	8,37	1
66 Égua	F	7	0	12,37	1
67 Égua	F	11	0	10,28	1
68 Égua	F	10	0	12,08	1
79 Égua	F	13	0	6,52	1
82 Égua	F	10	0	14,44	1
84 Égua	F	10	0	24,10	1
71 Égua	F	8	20	11,20	1
83 Égua	F	11	30	25,69	1
53 G14	F	1	40	94,26	1
33 G14	F	1	50	70,91	1
51 G14	F	1	50	51,39	1
44 G14	F	1	70	110,26	1
89 Égua	F	12	100	68,44	1
45 G14	M	1	110	15,96	1
46 G14	M	1	140	25,13	1
62 Égua	F	8	160	21,69	1
61 G14	M	1	190	28,39	1
38 G14	M	1	190	108,01	1
42 G14	F	1	220	20,87	1
58 G14	M	1	220	42,13	1
75 Égua	F	8	240	15,34	1
41 G14	F	1	260	40,53	1
50 G14	M	1	280	12,14	1
70 Égua	F	16	280	18,41	1
37 G14	M	1	310	72,40	1
60 G14	F	1	330	62,98	1
55 G14	F	1	390	18,77	2
74 Égua	F	7	390	21,46	2
40 G14	M	1	410	22,53	2
59 G14	F	1	440	37,05	2
63 Égua	F	5	470	13,75	2
36 G14	M	1	480	47,94	2
52 G14	F	1	480	53,93	2
49 G14	M	1	490	27,16	2
48 G14	F	1	510	72,18	2
32 G14	F	1	520	38,91	2
57 G14	F	1	580	64,50	2
69 Égua	F	9	680	30,41	2
35 G14	M	1	720	74,15	2
39 G14	M	1	730	66,01	2
34 G14	F	1	770	38,71	2

TABELA 8- RESULTADOS DE OPG E ELISA DOS CAVALOS PSI E SEPARAÇÃO EM TRÊS GRUPOS DE ACORDO COM O OPG. (conclusão)

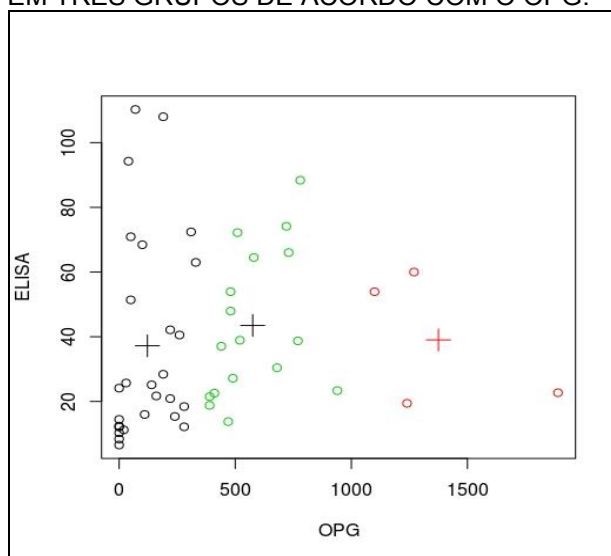
47 G14	M	1	780	88,39	2
43 G14	M	1	940	23,33	2
54 G14	M	1	1100	53,91	3
78 Égua	F	9	1240	19,41	3
56 G14	F	1	1270	60,00	3
81 Égua	F	11	1890	22,68	3

Legenda: OPG=ovos por grama de fezes. Última coluna a direita, (número 1) são os animais com menores OPG (variação de 0 a 330); número 2: os animais com valores intermediários (variação de 390 a 940) e número 3: os animais com os maiores OPG (1100 a 1890).

Fonte: O Autor (2018).

Foi pesquisado a existência de correlação entre o OPG e o ELISA para os três grupos de cavalos PSI. Para o grupo com menores OPG foi obtida uma correlação fraca com  $R=0,189$ ; para os animais com valor intermediário de OPG foi obtida uma correlação moderada com  $R=0,372$  e para os animais com maiores OPG foi obtida uma correlação forte e negativa com  $R=-0,547$ . Além disso, foi pesquisada a existência de diferença estatística entre os resultados de ELISA entre os três grupos. Entre os grupos dos maiores e menores OPG não houve diferença estatística nos valores do teste ELISA com  $P=0,8869$ ; entre o grupo dos intermediários e os maiores OPG, não houve diferença estatística com  $P=0,7207$ ; e entre os grupos dos menores OPG e intermediários não houve diferença estatística com  $P=0,4464$  (Figura 23).

FIGURA 23- GRÁFICO DA CORRELAÇÃO DOS VALORES DE ELISA E OPG DOS CAVALOS PSI, SEPARADOS EM TRÊS GRUPOS DE ACORDO COM O OPG.



Legenda: Em preto os animais que tiveram menores valores de OPG, em verde, os animais que apresentaram valores intermediários de OPG e em vermelho os animais com os maiores valores de OPG. Sinal (+) indica a média dos valores de OPG de cada grupo.

Fonte: O autor (2018).

Os cavalos da raça Crioulo também foram separados por idade (Tabela 9), porém, por se tratar somente de animais adultos foi utilizado a idade de 10 anos como linha de corte entre os grupos.

TABELA 9- RESULTADOS DE OPG DE ESTRONGILÍDEOS DOS ANIMAIS CRIOULO E RESULTADOS DO ELISA DO SORO DO SANGUE, ALÉM DA IDENTIFICAÇÃO, DO SEXO E DA IDADE DE CADA UM. (continua)

Nº de identificação dos cavalos Crioulo	Sexo	Idade (Anos)	OPG de Estrongilídeos	ELISA
109	F	2	520	112,72
107	F	3	250	91,91
108	F	3	690	66,08
117	M	3	0	10,78
112	F	4	0	32,41
113	M	4	0	18,30
105	F	4	10	71,94
116	F	4	1680	45,05
82	M	5	0	18,03
95	F	5	1020	40,66
99	F	5	1020	104,21
115	F	5	10	55,20
83	M	6	0	14,92
85	M	6	0	11,99
94	M	6	1270	38,83
96	F	6	0	41,60
97	F	6	1270	62,65
102	F	6	2340	51,34
120	M	7	0	11,37
86	M	7	0	7,00
84	M	8	0	12,15
118	F	8	480	17,65
111	F	10	0	41,37
100	F	10	1180	27,09
110	M	11	0	82,93
119	M	11	0	10,04
88	F	11	620	11,00
81	F	12	1630	19,39
93	F	12	1440	63,96
114	F	13	320	11,18
77	F	14	2080	18,58

TABELA 9- RESULTADOS DE OPG DE ESTRONGILÍDEOS DOS ANIMAIS CRIOULO E RESULTADOS DO ELISA DO SORO DO SANGUE, ALÉM DA IDENTIFICAÇÃO, DO SEXO E DA IDADE DE CADA UM. (conclusão)

89	F	14	1340	11,72
103	F	15	1880	33,75
80	F	16	820	49,91
101	F	16	580	18,28
104	F	17	610	49,81
90	F	18	1420	90,54
92	F	18	1400	20,00
106	F	19	520	28,22
87	F	21	1470	12,21
91	F	21	410	30,49
98	F	22	1260	13,84
78	F	25	200	12,15
79	F	25	690	10,93

Legenda: OPG=ovos por grama de fezes. Os animais estão separados por idade, estando na parte de cima os animais com menos de 10 anos de idade e na parte de baixo os animais com idade igual ou maior do que 10 anos.

Fonte: O autor (2018).

Comparando os resultados de OPG e de ELISA dos dois grupos de idade distintas, foi observada diferença estatística no valor de OPG com  $P=0,03$ , sendo que os animais com menos de 10 anos apresentaram valores de OPG significativamente menores do que os animais com 10 anos ou mais. Quanto ao ELISA, não houve diferença estatística entre os grupos com  $P=0,154$ . Quanto a análise da correlação entre os exames de OPG e ELISA, o grupo dos animais mais velhos apresentou uma fraca correlação com  $R=0,01$ . Os animais mais novos apresentaram uma correlação moderada com  $R=0,34$ . Separando pelo sexo, os machos e fêmeas apresentaram correlação fraca com  $R=0,26$  e  $R=-0,069$  respectivamente.

Foi avaliada a existência de correlação entre a OPG para estrongilídeos e o valor do teste ELISA para todos os animais da raça Crioulo, sendo que os animais foram separados em três grupos diferentes de acordo com o valor de OPG (Tabela 10).

TABELA 10- RESULTADOS DE OPG E ELISA DOS CAVALOS CRIoulos E SEPARAÇÃO EM TRÊS GRUPOS DE ACORDO COM O OPG. (continua)

Nº de identificação dos cavalos Crioulo	Sexo	Idade (Anos)	OPG de Estrongilídeos	ELISA	
82	M	5	0	18,03	1
83	M	6	0	14,92	2
84	M	8	0	12,15	3
85	M	6	0	11,99	4
86	M	7	0	7,00	5
96	F	6	0	41,60	6
110	M	11	0	82,93	7
111	F	10	0	41,37	8
112	F	4	0	32,41	9
113	M	4	0	18,30	10
117	M	3	0	10,78	11
118	F	8	0	17,65	12
119	M	11	0	10,04	13
120	M	7	0	11,37	14
105	F	4	10	71,94	15
115	F	5	10	55,20	16
78	F	25	200	12,15	17
107	F	3	250	91,91	18
114	F	13	320	11,18	19
91	F	21	410	30,49	20
106	F	19	520	28,22	21
109	F	2	520	112,72	22
101	F	16	580	18,28	23
104	F	17	610	49,81	24
88	F	11	620	11,00	25
79	F	25	690	10,93	26
108	F	3	690	66,08	27
80	F	16	820	49,91	28
95	F	5	1020	40,66	29
99	F	5	1020	104,21	30
100	F	10	1180	27,09	31
98	F	22	1260	13,84	32
94	M	6	1270	38,83	33
97	F	6	1270	62,65	34
89	F	14	1340	11,72	35
92	F	18	1400	20,00	36
90	F	18	1420	90,54	37
93	F	12	1440	63,96	38
87	F	21	1470	12,21	39
81	F	12	1630	19,39	40
116	F	4	1680	45,05	41

TABELA 10- RESULTADOS DE OPG E ELISA DOS CAVALOS CRIoulos E SEPARAÇÃO EM TRÊS GRUPOS DE ACORDO COM O OPG. (conclusão)

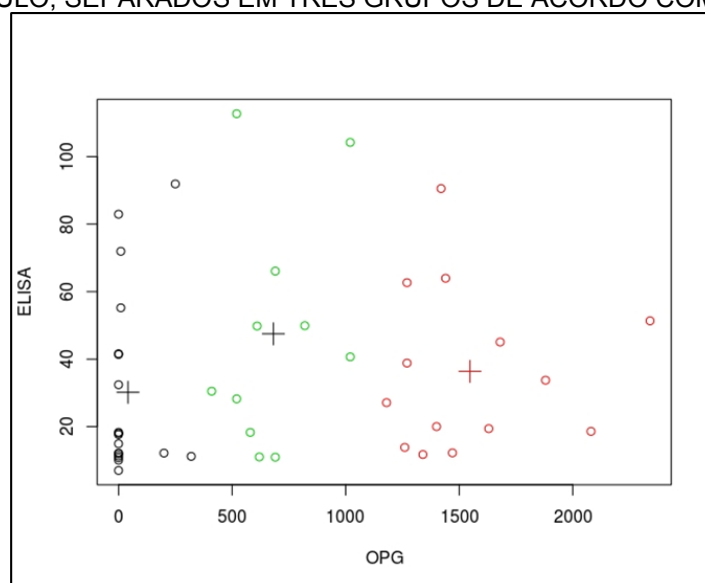
103	F	15	1880	33,75	42
77	F	14	2080	18,58	43
102	F	6	2340	51,34	44

Legenda: OPG=ovos por grama de fezes. Última coluna a direita, 1 a 19 são os animais com menores OPG (variação de 0 a 250); 20 a 30 são os animais com valores intermediários (variação de 410 a 1020) e 31 a 44 são os animais com os maiores OPG (1180 a 2340).

Fonte: O Autor (2018).

Foi pesquisado a existência de correlação entre o OPG e o ELISA para os três grupos de cavalos crioulo, sendo encontrado apenas correlações fracas entre o ELISA e o OPG. Para o grupo com menores OPG foi obtido  $R=0,136$ ; para os animais com valor intermediário de OPG foi obtido  $R=0,280$  e para os animais com maiores OPG  $R=0,025$ . Além disso, foi pesquisada a existência de diferença estatística entre os resultados de ELISA entre os três grupos. Entre os grupos dos maiores e menores OPG não houve diferença estatística com  $P=0,171$ ; entre o grupo dos intermediários e os maiores OPG, não houve diferença estatística com  $P=0,376$ ; e entre os grupos dos menores OPG e intermediários não houve diferença estatística com  $P=0,488$  (Figura 24).

FIGURA 24- GRÁFICO DA CORRELAÇÃO DOS VALORES DE ELISA E OPG DOS CAVALOS CRIOULO, SEPARADOS EM TRÊS GRUPOS DE ACORDO COM O OPG.



Legenda: Em preto os animais que tiveram menores valores de OPG, em verde, os animais que apresentaram valores intermediários de OPG e em vermelho os animais com os maiores valores de OPG. Sinal (+) indica a média dos valores de OPG de cada grupo.

Fonte: O autor (2018).

### 5.3 CORRELAÇÕES ENTRE RESULTADOS DE PROVAS DE CORRIDAS, HEMATÓCRITO, CDL, TESTE DE ELISA E OPG

Na Tabela 11 estão relacionadas as éguas PSI, com seus respectivos prêmios e boas colocações em provas de corrida realizadas no Brasil, além dos resultados de OPG, Ht, CDL e ELISA. A fonte dos dados de provas de corrida é o *Stud book brasileiro*. Foram consideradas apenas as colocações a partir do quinto lugar.

TABELA 11- RESULTADOS DO NÚMERO DE PRÊMIOS EM PROVAS DE CORRIDA PARA ÉGUAS PSI, ALÉM DOS RESULTADOS DE OPG, ELISA, Ht E CDL.

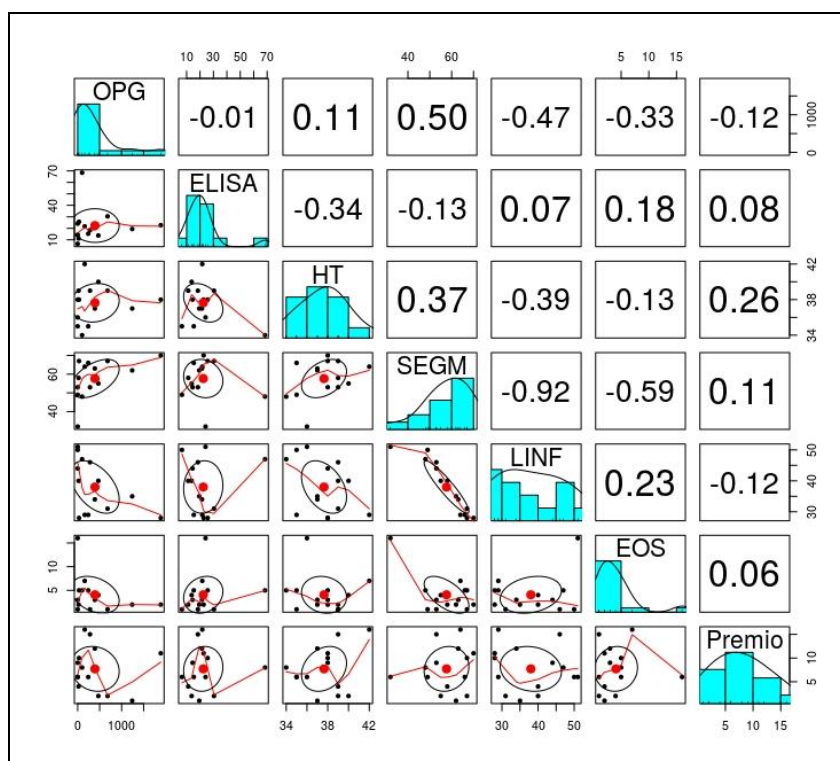
Identificação dos animais	Nome	Sexo	Idade	OPG 05/11/2015	ELISA	Ht 04/11/2015	Segm 04/11/2015	Bast	Linf	Eos	Mon	Bas	Prêmios
63 Égua	DASH OF LOVE	F	5	470	13,75	40	55	0	40	4	0	1	2
66 Égua	GLAD	F	7	0	12,37	34	71	0	25	4	0	0	SEM CAMPANHA REGISTRADA NO BRASIL
76 Égua	OLIMPIC KISS	F	7	0	50,31	X	x	x	x	x	x	x	SEM CAMPANHA REGISTRADA NO BRASIL
74 Égua	MLLE BLANCHE	F	7	390	21,46	37	63	0	34	3	0	0	12
62 Égua	AVANT TOUJOURS	F	8	160	21,69	42	64	0	29	7	0	0	16
64 Égua	DESEJADA TIME	F	8	0	8,37	35	71	0	26	2	0	1	SEM CAMPANHA REGISTRADA NO BRASIL
75 Égua	MY PEPPER	F	8	240	15,34	35	66	0	29	5	0	0	6
71 Égua	JUSTINI HEININ	F	8	20	11,20	39	58	0	40	2	0	0	4
69 Égua	IDREAMEDADREAM	F	9	680	30,41	39	67	0	31	1	0	1	2
78 Égua	OLIMPIC FIRST CLASS	F	9	1240	19,41	37	62	0	35	2	1	0	1
68 Égua	HEY CHIRS	F	10	0	12,08	40	60	0	37	3	0	0	SEM CAMPANHA REGISTRADA NO BRASIL
82 Égua	SECOND AMERICAN	F	10	0	14,44	38	53	0	44	3	0	0	9
84 Égua	SOLENIÁ	F	10	0	24,10	36	32	0	51	16	0	1	6
67 Égua	GUIRLANDA	F	11	0	10,28	39	58	0	41	1	0	0	SEM CAMPANHA REGISTRADA NO BRASIL
81 Égua	SCHWARZE CAT	F	11	1890	22,68	38	70	0	28	2	0	0	11
83 Égua	SENSIBILIDADE	F	11	30	25,69	38	67	0	28	5	0	0	10
89 Égua	TODAS AS FLORES	F	12	100	68,44	34	48	0	47	5	0	0	8
79 Égua	PAOLA RUBIA	F	13	0	6,52	35	49	0	50	1	0	0	6
70 Égua	IN THE SAND	F	16	280	18,41	39	53	0	46	1	0	0	15
86 Égua	TALE E QUALE	F	20	10	44,94	X	x	x	x	x	x	x	23
85 Égua	SWEET MIND	F	22	0	7,62	X	x	x	x	x	x	x	8

Legenda: OPG=ovos por grama de fezes; Ht=hematócrito; Segm=segmentados; Bast=bastonetes; Linf=linfócitos; Eos=eosinófilos; Mon=monócitos e Bas=Basófilos. O número de prêmios está descrito na última coluna à direita.

Fonte: O autor (2018).

Foi observada correlação fraca entre o número de prêmios e OPG com  $R=-0,12$ . Além disso, foram observadas fracas correlações entre o número de prêmios e o ELISA, o Ht, neutrófilos segmentados, linfócitos e eosinófilos, com valores respectivamente de  $R=0,08$ ;  $R=0,26$ ;  $R=0,11$ ;  $R=-0,12$  e  $R=0,06$  (Figura 25).

FIGURA 25- QUADRO COM AS CORRELAÇÕES ENTRE OPG, ELISA, Ht, NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS, LINFÓCITOS, EOSINÓFILOS E NÚMERO DE PRÊMIOS EM PROVAS DE CORRIDA PARA AS ÉGUAS ADULTAS DA RAÇA PSI.



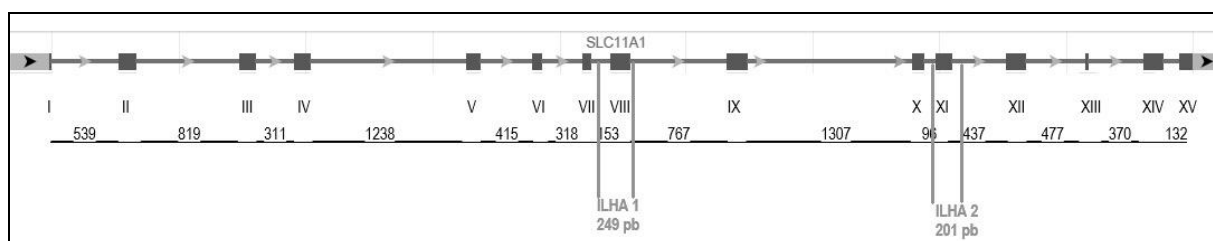
Legenda: Análise de correlação para os resultados de OPG, ELISA, hematócrito, contagem diferencial de leucócitos e número de prêmios em provas de corrida das éguas adultas da raça Puro Sangue Inglês. A figura é dividida em um formato matricial com uma triangulação superior, inferior e uma linha diagonal principal. A triangulação superior mostra os valores de correlação entre as variáveis, já a triangulação inferior mostra-nos um possível ajuste de modelo linear e a linha diagonal simples contém histogramas das distribuições dos dados das variáveis. Foi verificada uma correlação fraca entre OPG e prêmios ( $R=-0,12$ ), entre ELISA e prêmios ( $R=0,08$ ) e entre Ht e prêmios ( $R=0,26$ ). Fonte: O autor (2018).

#### 5.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO: ANÁLISE *IN SILICO* DO GENE *SLC11a1*

Utilizando a sequência de nucleotídeos do gene *SLC11a1* foram avaliadas a presença de ilhas de CpG em 6 animais PSI e 3 de Crioulo. Através do programa CpGPlot foram identificadas duas ilhas de CpG no gene *SLC11a1* em equinos (Figura 13, item 5.7 de material e métodos) localizadas nas regiões de transcritos.

A Ilha 1 de CpG possui 249 pb e compreende o exon 8 e mais região de intron e contém 14 dinucleotídeos CpG; enquanto a Ilha 2 possui 201 pb e está localizada no exon 11 e mais uma parte na região de intron e contém 16 dinucleotídeos CpG (Figura 26).

FIGURA 26- DIAGRAMA DA ESTRUTURA GENÔMICA DO GENE EQUINO *SLC11a1* COM A LOCALIZAÇÃO DOS EXONS, INTRONS E DAS ILHAS DE CpG.



Os quadrados em cinza correspondem aos exons, identificados com algarismos romanos. Os números correspondem ao tamanho dos introns em pb e as linhas verticais indicam o local das ilhas (1 e 2) de CpG do gene e os respectivos tamanhos.

Fonte: GenBank (2018).

## 5.5 EXTRAÇÃO DE DNA DA CAMADA LEUCOCITÁRIA

O DNA extraído do precipitado de leucócitos foi dosado para a obtenção das concentrações das amostras (Tabela 12).

TABELA 12- CONCENTRAÇÃO DE DNA (ng/ $\mu$ L) DAS AMOSTRAS, COM A IDENTIFICAÇÃO DAS RAÇAS DOS CAVALOS

Cavalos PSI	Concentração do DNA	Cavalos Crioulo	Concentração do DNA
32	26,6	77	33,2
33	17,1	81	41,6
36	21	86	53,3
38	40,6	102	8,33
41	41,6	103	10,6
46	13,1	112	31,9
51	21,6	113	44,5
53	24,8	116	13
57	49,2	119	20,6
60	16,3	120	69,3

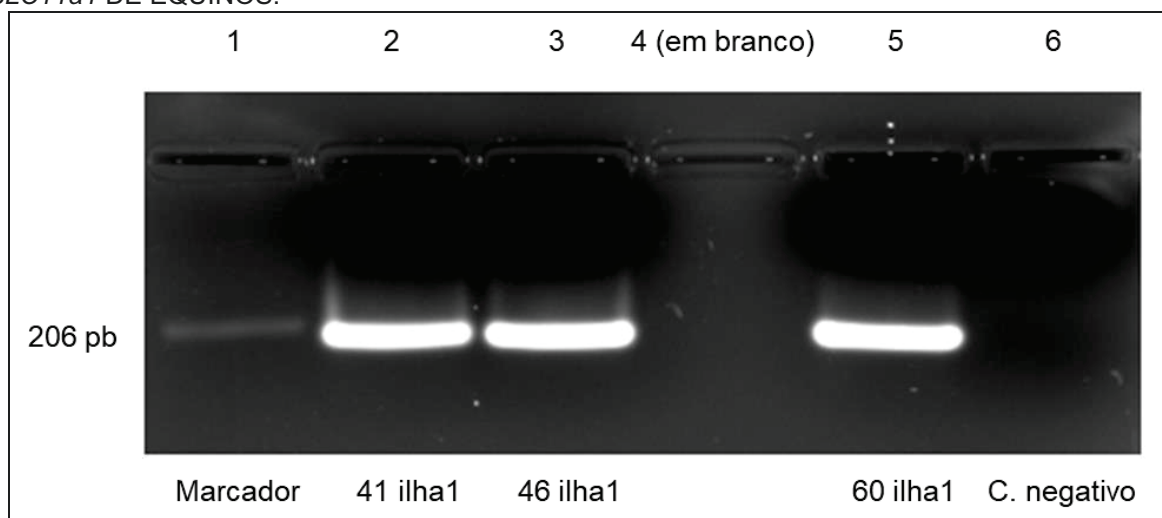
Fonte: O autor (2018)

A partir da obtenção de DNAs com qualidade e quantidade suficientes para dar prosseguimento ao projeto, este foi tratado com bissulfito de sódio para posterior amplificação por PCR.

## 5.6 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GENE *SLC11a1*

A partir do DNA tratado com bissulfito de sódio foi realizada a reação de PCR para as ilhas de CpG avaliadas. A padronização da reação foi caracterizada a partir da visualização dos fragmentos amplificados. A partir da amplificação dos tamanhos desejados para cada ilha de CpG, foi realizada a purificação a partir do gel de agarose (Figura 27).

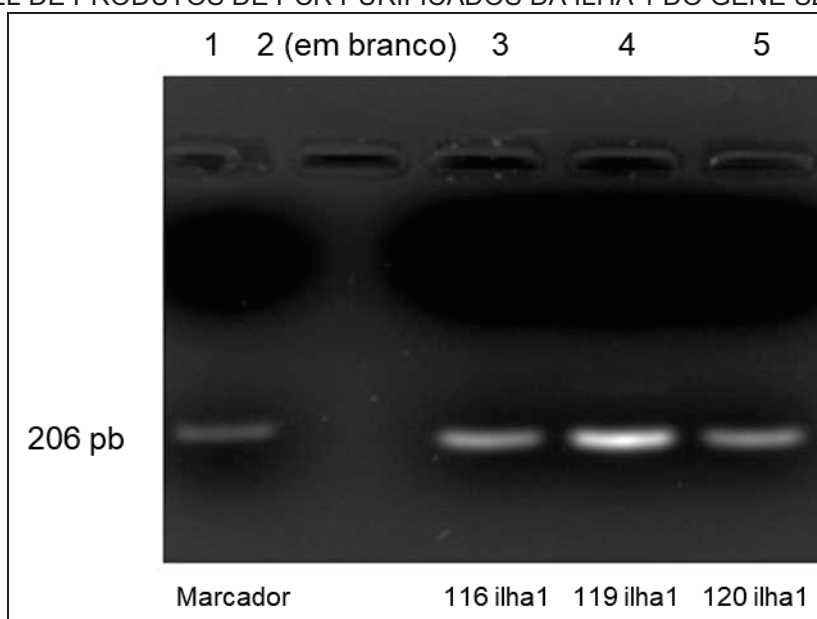
FIGURA 27- GEL DE PRODUTO DE PCR DO FRAGMENTO DE DNA DA ILHA 1 DO GENE *SLC11a1* DE EQUINOS.



A ordem da esquerda para a direita: marcador de tamanho molecular 200 pb, amostras 41, 46 e 60 (ilha 1) de cavalos PSI e controle negativo (sem a adição do DNA na reação de PCR). Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Fonte: O autor (2018).

Após a purificação do DNA, foi realizada nova eletroforese em gel de agarose para verificar a qualidade da purificação (Figura 28).

FIGURA 28- GEL DE PRODUTOS DE PCR PURIFICADOS DA ILHA 1 DO GENE *SLC11a1*.

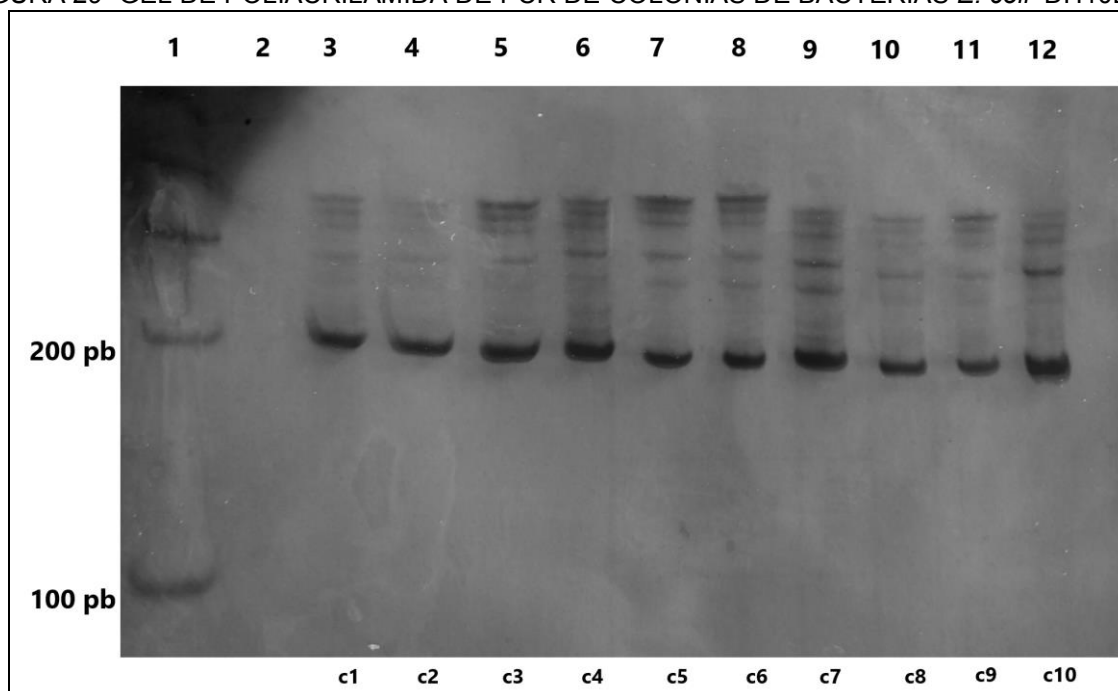
A ordem no gel da esquerda para a direita é marcador de tamanho molecular 200 pb, amostras 116, 119 e 120 da ilha1 (as três amostras são de cavalos da raça Crioulo). Eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Fonte: O autor (2018).

Para a ilha 2 de CpG, algumas amostras tiveram que ser purificadas por mais de uma vez por diferentes motivos, sejam técnicos ou de padronização nas amostras utilizadas, contudo, a amplificação foi adequada em quantidade e qualidade, estando aptas à próxima etapa de purificação. Após a verificação da qualidade de purificação, o fragmento de DNA foi ligado ao vetor e posteriormente transformado.

## 5.7 TRANSFORMAÇÃO, CLONAGEM, EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL E SEQUENCIAMENTO

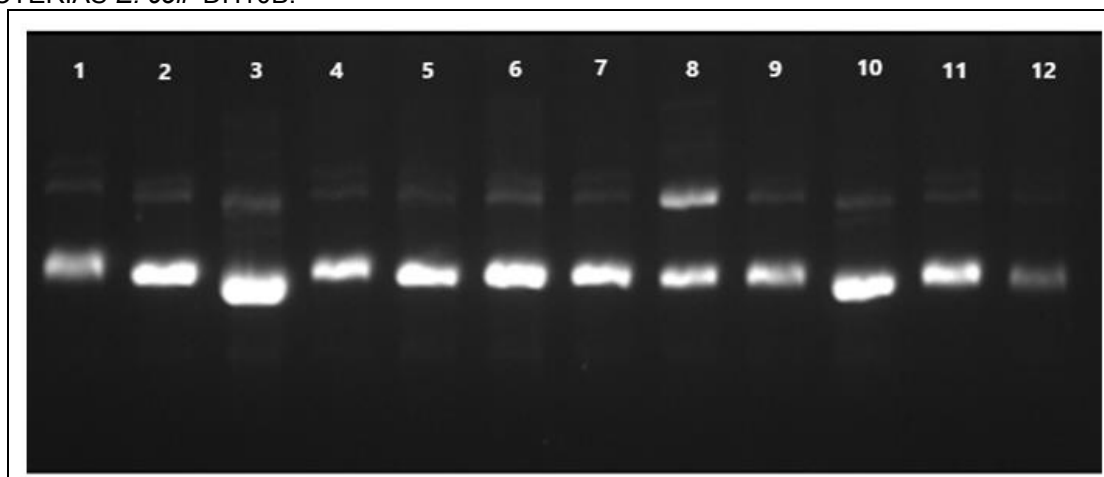
Após a ligação no vetor, as bactérias foram transformadas e selecionadas a partir da distinção entre as colônias brancas e azuis. Esta pré-seleção baseia-se no sistema de  $\alpha$ -complementação proporcionado pelo vetor utilizado na técnica. Posteriormente, as colônias brancas foram submetidas à reação de PCR para a respectiva ilha de CpG (Figura 29). Para cada ligação transformada, foram coletados 8 clones para se obter a representatividade alélica.

FIGURA 29- GEL DE POLIACRILAMIDA DE PCR DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS *E. coli* DH10B.

A ordem da esquerda para a direita: marcador de tamanho molecular 100 pb, colônias 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10 da ilha 1 da amostra 32 (amostra de um cavalo da raça PSI). Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata.

Fonte: O autor (2018).

Após a confirmação pelo PCR foi realizada a extração do DNA plasmidial que pode ser visualizado na Figura 30 abaixo.

FIGURA 30- GEL DE AGAROSE APÓS A EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS *E. coli* DH10B.

Diferentes colônias que continham o fragmento de DNA da Ilha 1 do gene *SLC11a1* inserido no seu DNA. A ordem da esquerda para a direita é: amostra 33 Ilha 1 (colunas 1; 2 e 3); amostra 41 Ilha 1 (colunas 4; 5; 6; 7 e 8); e amostra 60 Ilha 1 (colunas 9; 10; 11 e 12). Essas três amostras são de três cavalos PSI. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Fonte: O autor (2018).

Após a extração do DNA plasmidial, este foi submetido à reação de sequenciamento conforme descrito no item 4.15. Após a obtenção das sequências, estas foram alinhadas com auxílio de programas livres e a substituição ou não dos CGs após o tratamento foram comparados à sequência original. Como era de se esperar, caso o CG permaneça após o tratamento (ver material e métodos item 4.16), o mesmo caracteriza estar metilado, ou caso o CG transforme-se em TG ou CA (dependendo do oligonucleotídeo utilizado na reação de sequenciamento), é sabido que o mesmo se encontrava não metilado (Figura 31).

FIGURA 31- ILUSTRAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE DNA DE UMA DAS AMOSTRAS DA ILHA 2 DO GENE *SLC11a1* APÓS O SEQUENCIAMENTO E ALINHAMENTO ATRAVÉS DO PROGRAMA *ClustalW*.

```

GeneSLC11A1Iilha2M TTTGTAGAGTTTGGGGGCGGGGTTATAGTTCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGGTGAGATCGG
46058H33I2Co12    TTTGTAGAGTTTGGGGGIGGGGTTATAGTTGGGIGGIGGGIGGGIGGGGTGAGATTGG
*****
GeneSLC11A1Iilha2M CGGCGTCGGGGGTTGGGTTGACGAGGTTTTTTTTATAGTACGTGGTGGTTCGTTTCGT
46058H33I2Co12    TGGTGTGGGGGTTGGGTTGATGAGGTT-TTTTTATAGTATGTGGTGGTITGTTTTGT
** **
GeneSLC11A1Iilha2M TTAGGGGTCGTTTTTTCGAGGTTTGTTTTTGTTTTTTTTGTTT-----
46058H33I2Co12    TTAGGGGTTGTTTTTTCGAGGTTTGTTTTTGTTTTTTTTGTTTAAATCACTAGTGAATTCGC
*****

```

A sequência está alinhada com a sequência original. As linhas superiores de cada bloco correspondem a sequência original, no caso, o fragmento de DNA da ilha 2. Na linha superior, estão marcados os 16 dinucleotídeos CpG presentes nesse fragmento. Na linha inferior de cada bloco, está a sequência de uma colônia da amostra 33 (amostra de um cavalo PSI) ilha 2 obtida pelo cromatograma. As marcas na linha abaixo são os CpGs que não estão metilados. Para esta reação foi utilizado o oligonucleotídeo universal, portanto, espera-se a substituição dos CGs não metilados por TG.

Fonte: O autor (2018).

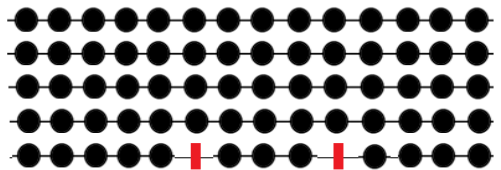
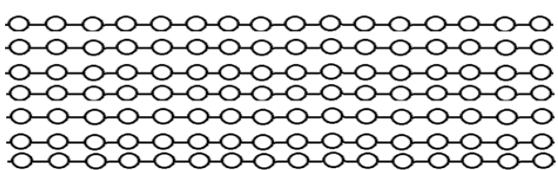
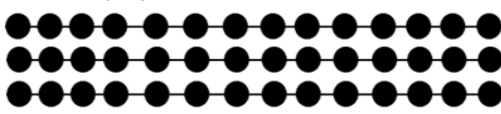
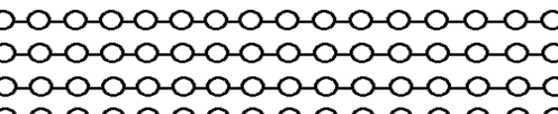
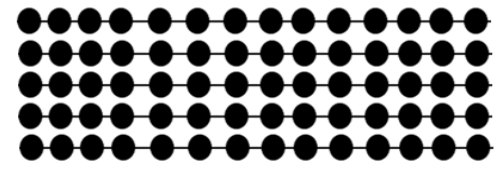
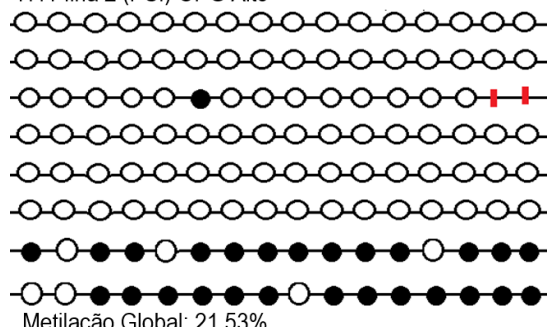
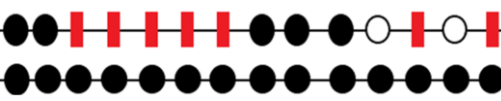
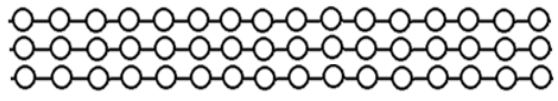
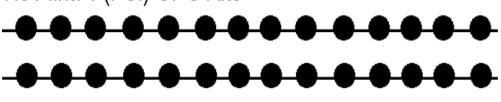
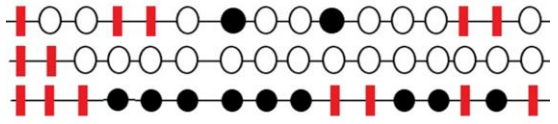
## 5.8 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DAS ILHAS DE CpG 1 E 2 EM PSI E CRIOULO

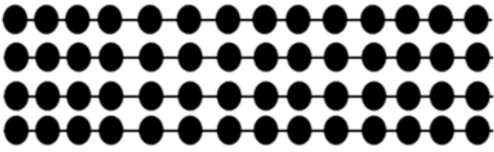
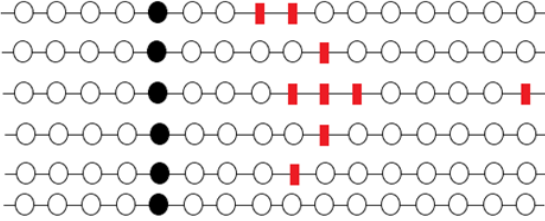
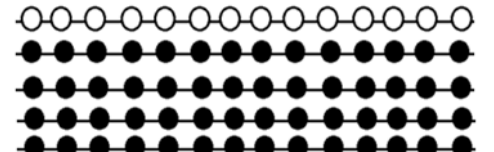
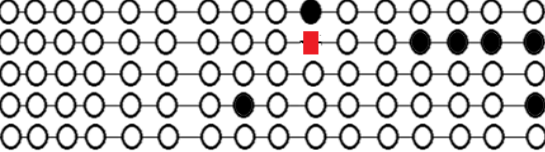
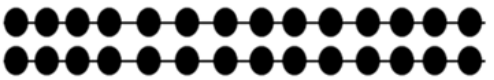
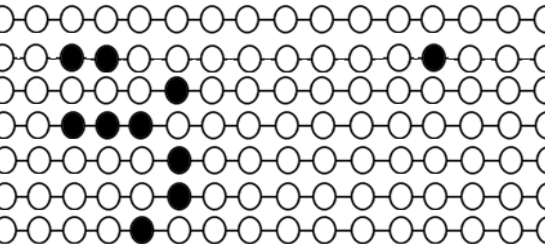
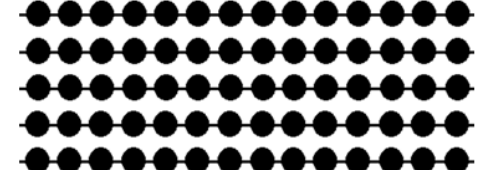
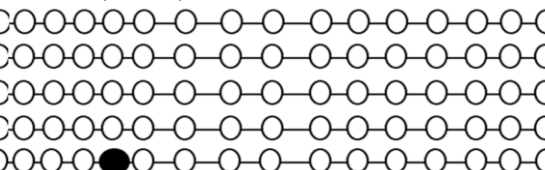
Através da análise dos cromatogramas foi calculado o percentual de metilação para cada CpG do fragmento, obtendo um valor entre as diferentes colônias de uma mesma amostra. Posteriormente, foi calculado o percentual de metilação de uma amostra, considerando todos os dinucleotídeos CpG presentes no fragmento, obtendo o percentual de metilação global da ilha avaliada. Os resultados foram relacionados com a característica fenotípica de OPG de ciatostomíneos de cada cavalo e estão ilustrados nos gráficos e tabelas abaixo.

Os resultados obtidos dos cavalos PSI e Crioulo estão agrupados nas Tabelas 13 e 14. Foram analisadas seis amostras de cavalos PSI e três amostras de

cavalos Crioulo. Todas as amostras de PSI e Crioulo da ilha 1 apresentaram alto valor (>75%) de metilação do DNA. Todas as amostras da ilha 2 apresentaram baixo valor de metilação global do DNA (<30%).

TABELA 13- PERCENTUAL DE METILAÇÃO GLOBAL DO DNA DE CAVALOS PURO SANGUE INGLÊS CUJOS NÚMEROS DE IDENTIFICAÇÃO SÃO: 33; 36; 41; 46; 51 E 60, E CAVALOS CRIOULO CUJOS NÚMEROS DE IDENTIFICAÇÃO SÃO: 77; 81 E 86, SEPARADOS QUANTO A ILHA DE CpG. (continua)

Nº	Ilha 1	Ilha 2
33	<p>H33 Ilha 1 (PSI) OPG Alto</p>  <p>Metilação Global: 100%</p>	<p>H33 Ilha 2 (PSI) OPG Alto</p>  <p>Metilação Global: 0%</p>
36	<p>H36 Ilha 1 (PSI) OPG Baixo</p>  <p>Metilação Global: 100%</p>	<p>H36 Ilha 2 (PSI) OPG Baixo</p>  <p>Metilação Global: 0%</p>
41	<p>H41 Ilha 1 (PSI) OPG Alto</p>  <p>Metilação Global: 100%</p>	<p>H41 Ilha 2 (PSI) OPG Alto</p>  <p>Metilação Global: 21,53%</p>
46	<p>H46 Ilha 1 (PSI) OPG Baixo</p>  <p>Metilação Global: 92,85%</p>	<p>H46 Ilha 2 (PSI) OPG Baixo</p>  <p>Metilação Global: 0%</p>
51	<p>H51 Ilha 1 (PSI) OPG Alto</p>  <p>Metilação Global: 100%</p>	<p>H51 Ilha 2 (PSI) OPG Alto</p>  <p>Metilação Global: 27,08%</p>

60	<p>H60 Ilha 1 (PSI) OPG Baixo</p>  <p>Metilação Global: 100%</p>	<p>H60 Ilha 2 (PSI) OPG Baixo</p>  <p>Metilação Global: 6,25%</p>
77	<p>H77 Ilha 1 (Crioulo) OPG Alto</p>  <p>Metilação Global: 80%</p>	<p>H77 Ilha 2 (Crioulo) OPG Alto</p>  <p>Metilação Global: 9,06%</p>
81	<p>H81 Ilha 1 (Crioulo) OPG Alto</p>  <p>Metilação Global: 100%</p>	<p>H81 Ilha 2 (Crioulo) OPG Alto</p>  <p>Metilação Global: 8,927%</p>
86	<p>H86 Ilha 1 (Crioulo) OPG Baixo</p>  <p>Metilação Global: 100%</p>	<p>H86 Ilha 2 (Crioulo) OPG Baixo</p>  <p>Metilação Global: 1,25%</p>

Legenda: os círculos cheios representam cada CpG metilado, os círculos vazios representam os CpG não metilados e os retângulos vermelhos representam os CpG que apresentaram erro no alinhamento. Cada linha representa uma colônia que teve o DNA sequenciado e analisado. Cada coluna corresponde a um dinucleotídeo CpG. A ilha 1 apresenta 14 CpG, enquanto a ilha 2 apresenta 16 CpG. Abaixo de cada gráfico está descrito o percentual de metilação global (em %) de cada amostra.

Fonte: O autor (2018).

TABELA 14- AMOSTRAS DE ANIMAIS DA RAÇA PSI (Nº 33; 36; 41; 46; 51 E 60) E CRIOULO (Nº 77; 81 E 86) QUE FORAM ANALISADAS QUANTO AO PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL (EM %) E SEPARADAS QUANTO A ILHA DE CpG. A TABELA TAMBÉM INCLUI VALOR DE OPG, IDADE E O SEXO DOS ANIMAIS.

Amostra	Idade (anos)	Sexo	Ilha	Valor de OPG	Metilação Global
H33	1	F	1	960	100
H36	1	M	1	90	100
H41	1	F	1	1300	100
H51	1	F	1	970	100
H60	1	F	1	40	100
H81	12	F	1	1630	100
H86	7	M	1	0	100
H46	1	M	1	50	92,85
H77	14	F	1	2080	80
H51	1	F	2	970	27,08
H41	1	F	2	1300	21,53
H77	14	F	2	2080	9,06
H81	12	F	2	1630	8,92
H60	1	F	2	40	6,25
H86	7	M	2	0	1,25
H33	1	F	2	960	0
H36	1	M	2	90	0
H46	1	M	2	50	0

Fonte: O autor (2018).

Os resultados das amostras dos animais com baixo valor de OPG, ou seja, animais que apresentam uma provável resistência à infecção parasitária para estrongilídeos estão agrupados na Tabela 15.

TABELA 15- PERCENTUAL DE METILAÇÃO (%) DAS AMOSTRAS DE ANIMAIS COM BAIXO OPG PARA CIATOSTOMÍNEOS, SEPARADOS PELAS ILHAS DE CpG DE AMBAS AS RAÇAS.

Amostras de Animais com BAIXO OPG							
ILHA 1				ILHA 2			
PSI		Crioulo		PSI		Crioulo	
Amostra	Metilação	Amostra	Metilação	Amostra	Metilação	Amostra	Metilação
36	100	86	100	36	0	86	1,25
46	92,85			46	0		
60	100			60	6,25		

\*PSI: Puro Sangue Inglês

Fonte: O autor (2018).

As amostras de equinos com alto valor de OPG foram agrupadas na Tabela 16, revelando diferenças no padrão de metilação entre as duas ilhas, assim como evidenciado na tabela anterior.

TABELA 16- RESULTADOS DO PERCENTUAL DE METILAÇÃO (%) DAS AMOSTRAS DE ANIMAIS COM ALTO VALOR DE OPG PARA CIATOSTÓMÍNEOS, SEPARADOS PELAS ILHAS DE CpG DAS DUAS RAÇAS ANALISADAS

<b>Amostras de Animais com ALTO OPG</b>							
<b>ILHA 1</b>				<b>ILHA 2</b>			
<b>PSI</b>		<b>Crioulo</b>		<b>PSI</b>		<b>Crioulo</b>	
Amostra	Metilação	Amostra	Metilação	Amostra	Metilação	Amostra	Metilação
33	100	77	80	33	0	77	9,06
41	100	81	100	41	21,53	81	8,92
51	100			51	27,08		

\*PSI: Puro Sangue Inglês.

Fonte: O autor (2018).

Tanto para as amostras com baixo OPG, quanto para as amostras com alto OPG, os fragmentos da Ilha 1 de CpG (Tabela 17) apresentaram hipermetilação (valor acima de 75% de metilação), enquanto os fragmentos da Ilha 2 (Tabela 18) apresentaram-se hipometilados (<30%). Muito embora as amostragens tenham sido muito pequenas, os dados de metilação foram verificados nos animais PSI e Crioulo e não foram influenciados pela raça; tanto na Ilha 1 com valor de  $P=0,595$  quanto para a Ilha 2 com valor de  $P=0,639$ .

A Tabela 17 apresenta somente resultados de amostras da Ilha 1 de CpG, independentemente da raça dos animais. A metilação global de todas as amostras foi alta, mostrando uma possível regulação por metilação nesta região. Não houve diferença ( $P=1.000$ ) na metilação entre a OPG dos animais, tanto os equinos com OPG baixo quanto os com OPG alto apresentaram-se hipermetilados.

TABELA 17- PERCENTUAL DE METILAÇÃO (%) DAS AMOSTRAS DA ILHA 1 DE CpG DOS EQUINOS COM BAIXOS E ALTOS VALORES DE OPG DAS RAÇAS ANALISADAS

Ilha 1					
Animais com OPG Baixo			Animais com OPG Alto		
Amostra	OPG	Metilação	Amostra	OPG	Metilação
36	90	100	33	960	100
46	50	92,85	41	1300	100
60	40	100	51	970	100
86	0	100	77	2080	80
			81	1630	100
<b>Média</b>		98.21	<b>Média</b>		96
<b>Coefficiente de correlação entre OPG e Metilação</b>		R=-0.090	<b>Coefficiente de correlação entre OPG e Metilação</b>		R=-0.814
<b>Coefficiente de correlação entre todas as amostras da Ilha 1 (valores de OPG) e a metilação</b>					R=-0.480

Fonte: O autor (2018).

Houve correlação forte negativa entre os resultados de OPG e os valores de metilação na Ilha 1 para os cavalos com OPG alto (com R=-0.814). Isso indicou que o maior valor de OPG foi o que apresentou menor metilação global do DNA.

A Tabela 18 agrupa os valores de metilação global das amostras analisadas da Ilha 2 de CpG de ambas as raças. Os fragmentos de DNA da Ilha 2 apresentaram valores baixos de metilação global (<30%). Não foi observado diferença estatística significativa de metilação da Ilha 2 entre as amostras com baixo e alto OPG com P=0.105.

TABELA 18- PERCENTUAL DE METILAÇÃO (%) DAS AMOSTRAS DA ILHA 2 DE CpG DOS EQUINOS COM BAIXOS E ALTOS VALORES DE OPG DAS RAÇAS ANALISADAS

Ilha 2					
Animais com OPG Baixo			Animais com OPG Alto		
Amostra	OPG	Metilação	Amostra	OPG	Metilação
36	90	0	33	960	0
46	50	0	41	1300	21,53
60	40	6,25	51	970	27,08
86	0	1,25	77	2080	9,06
			81	1630	8,92
<b>Coefficiente de correlação entre OPG e Metilação</b>		R=-0.265	<b>Coefficiente de correlação entre OPG e Metilação</b>		R=-0.231
<b>Coefficiente de correlação entre todas as amostras da Ilha 2 (valores de OPG) e a metilação</b>					R=0.470

Fonte: O autor (2018).

Houve correlações fracas entre os valores de OPG e os valores de metilação da Ilha 2, tanto para as amostras de animais com baixa OPG ( $R=-0.265$ ) quanto de animais com alta OPG ( $R= -0.231$ ) (Tabela 18). Considerando todas as amostras da Ilha 2 de CpG, correlacionando os valores de OPG com os resultados de metilação global do DNA foi observada uma correlação moderada com  $R=0,470$ .

A Tabela 19 mostra-nos a quantidade de casos de alta (baixa) metilação para grupos de ilhas. Verificada que a quantidade de metilação baixa encontra-se na Ilha 2, enquanto a Ilha 1 apresentou alta metilação. Essa informação pode ser verificada pela diferença de metilação encontrada entre as ilhas de CpG 1 e 2, mostrando a significância estatística com  $P=0.0001$  para o teste qui-quadrado. A comparação rejeita a hipótese de que não há diferença entre as quantidades de baixa e alta metilação nas ilhas 1 e 2.

TABELA 19- RESULTADO QUANTITATIVO DO NÚMERO DE AMOSTRAS COM BAIXA E ALTA METILAÇÃO DO DNA QUANTO AS ILHAS 1 E 2 DE CpG, MOSTRANDO DIFERENÇA ESTATÍSTICA COM  $p<0,05$ .

	Metilação do DNA	
	Baixa Metilação	Alta Metilação
Número de amostras da Ilha 1	0	9
Número de amostras da Ilha 2	9	0

Fonte: O autor (2018).

A Figura 32 mostra a distribuição dos quartis dos dados, para a metilação em relação à quantidade de OPG alta e baixa, tanto para a Ilha 1, como para a Ilha 2. Observa-se, sob comparação de ambas as figuras, que a metilação para a Ilha 1 foi superior aos dados observados da Ilha 2, confirmando assim a análise qui-quadrado para a diferença entre as proporções das quantidades de metilação nas respectivas ilhas.

FIGURA 32- GRÁFICO DOS RESULTADOS DE METILAÇÃO DAS ILHAS 1 E 2 DE CpG DO GENE *SLC11a1*.

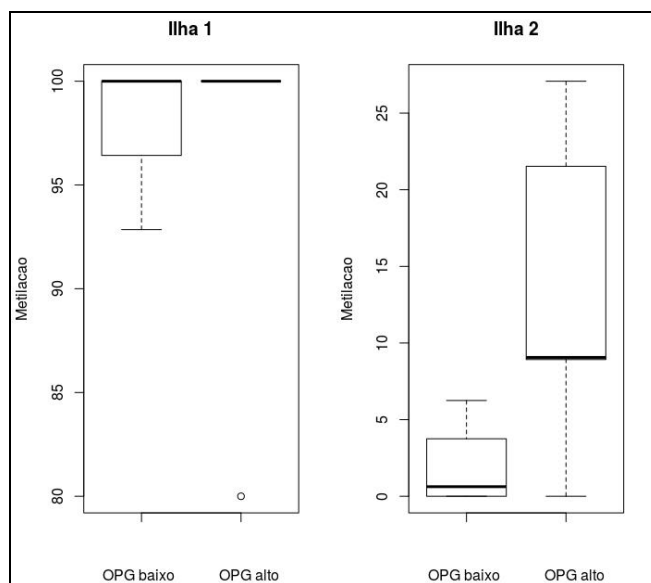


Gráfico do tipo *boxplot*, evidenciando diferença significativa  $p < 0,05$  dos valores de metilação entre as amostras da Ilha 1 e Ilha 2 de CpG. O gráfico evidencia não haver diferença importante entre os valores de metilação das amostras com baixa e alta OPG nas ilhas 1 e 2 de CpG.  
Fonte: O autor (2018).

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados do teste de Gordon e Whitlock (1939) modificado para os valores de OPG de strongilídeos variaram entre 0 e 1360 nos animais da raça PSI, e entre 0 e 2340 nos animais da raça Crioulo, considerando os grupos de animais dos quais foram selecionados alguns cavalos utilizados na pesquisa de metilação do DNA. Os animais, incluindo cavalos Crioulo e PSI, utilizados na pesquisa de metilação do gene *SLC11a1* classificados como baixo OPG apresentaram valores entre 0 e 90 de OPG de strongilídeos, enquanto os animais classificados como alto OPG apresentaram valores entre 960 e 2080 (Tabela 5). BALZAN et al., (2016) em um estudo com 111 cavalos no estado de Santa Catarina, cujos animais não tiveram a raça descrita, encontrou uma variação de 0 e 5600 OPG, com animais que passavam por tratamentos constantes com antiparasitários. Nesse estudo, 100% das propriedades utilizadas foram positivas para a presença de ovos de parasitos strongilídeos. IRALA et al. (2016) trabalharam com 50 animais PSI jovens com idade entre 6 e 9 meses em um estudo para avaliar a eficácia de produtos anti-helmínticos contra ciatostomíneos e encontraram valores de OPG entre 196 a 2336, sendo que nesse estudo, na cultura de larvas houve o crescimento somente de larvas de ciatostomíneos. KOOYMAN et al. (2016) em um trabalho realizado com 24 equinos adultos naturalmente infectados com ciatostomíneos na Holanda, cujos animais não tiveram a raça descrita no artigo, estes autores encontraram uma variação de 0 a 2975 de OPG para strongilídeos, com a identificação predominante de ciatostomíneos pela cultura de larvas.

Para os cavalos da raça PSI, foram comparados os valores dos resultados de OPG dos potros com os valores de OPG das éguas adultas, não obtendo diferença estatística entre os dois grupos ( $P=0,159$ ). Na raça Crioulo os animais foram separados em dois grupos, um com os animais com menos de 10 anos de idade e o outro com os com 10 ou mais anos de idade. Comparando o OPG dos dois grupos houve diferença estatística com  $P= 0,03$ , sendo que os animais mais novos foram os que apresentaram menores valores de OPG. BALZAN et al. (2016), em um trabalho no estado de Santa Catarina, utilizou 111 cavalos com idade variando de 1 a 27 anos, para pesquisar a ocorrência de parasitos gastrintestinais. Assim como os animais PSI do nosso trabalho, esse autor não encontrou relação entre a OPG e a idade dos cavalos. Apesar de dados de campo sugerirem que os equinos adquirem

certa tolerância aos pequenos estrôngilos com a idade, verificados através da redução da carga parasitária e da contagem de ovos nas fezes (KLEI e CHAPMAN, 1999), esse último item não foi encontrado no presente trabalho e nem por BALZAN et al. 2016.

Para avaliar uma possível relação entre a liberação de ovos de ciatostomíneos nas fezes com os valores de hematócrito (Ht) nos animais, o sangue dos cavalos PSI foi utilizado neste trabalho. Nós observamos que os valores de Ht variaram entre 34 e 46% (Tabela 6), ficando dentro do valor de referência estabelecido para a espécie que é de 32 a 53% (LACVET UFRGS, 2018). Comparando o resultado de hematócrito dos potros cuja média foi de 39,1 com os resultados das éguas adultas, cuja média foi de 37,5; houve diferença estatística entre os grupos ( $P=0,045$ ), porém, nos dois grupos os resultados de Ht estão dentro dos valores de referência para a espécie. Isso ocorreu por se tratar de animais bem nutridos e que passam por manejo antiparasitário periódico, além do tipo de infecção parasitária que foi predominantemente provocada por parasitos ciatostomíneos, comprovada pelos resultados de cultura de larvas. Mesmo os animais com valores mais altos de OPG não apresentaram alteração no valor de hematócrito. O hematócrito apresentou fraca correlação com a OPG ( $R=0,17$ ). Isso foi uma observação já esperada na infecção parasitária por ciatostomíneos, visto que esses parasitos não se caracterizam pela hematofagia, não sendo comum a alteração no hematócrito dos animais (BOWMAN, 2010).

Na literatura há relatos da ocorrência de quadros anêmicos com baixo hematócrito associados às altas ou mais graves infecções gastrintestinais por parasitos nematoides em equinos, principalmente as provocadas por parasitos do gênero *Strongylus*, mais comumente conhecidos como grandes estrôngilos (SIPRA et al., 1999). REGO et al. (2009) em um trabalho com 166 equinos, cuja a raça dos animais não foi descrita no artigo, avaliou a prevalência de endoparasitas em animais no município de Curitiba e observou que os animais positivos para parasitos gastrintestinais (foram encontrados quatro tipos de parasitos nas avaliações sendo *Strongylus* sp., *Trichostrongylus*, *Oxyuris* e *Parascaris*), verificados pelas técnicas de Gordon e Whitlock (1939) e pela técnica de Willis e Mollay, apresentaram valores de hematócrito significativamente menores ( $p<0,01$ ) do que os animais que apresentaram resultado negativo no exame coproparasitológico. BERNE (2007) sugere que os animais com graves infecções parasitárias por ciatostomíneos podem

sofrer alterações hematológicas, visto que os ciatostomíneos podem promover remoção de fragmentos da mucosa intestinal no local de alimentação e ulcerações profundas das camadas do intestino.

Na análise da contagem diferencial dos leucócitos (CDL) do sangue dos animais com alto e baixo OPG de *estrongilídeos*, a grande maioria dos valores obtidos de neutrófilos segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos se encontraram dentro dos valores de referência para a espécie equina (LACVET UFRGS, 2018). Na literatura, em geral, foi visto que os animais, inclusive os equinos com altas infecções parasitárias podem apresentar eosinofilia e neutrofilia sem desvio à esquerda (SIPRA et al., 1999; PILO et al., 2012), como foi o caso de alguns animais do presente trabalho. No caso de infecção por ciatostomíneos, principalmente em casos graves ocorre alterações como a eosinofilia e a neutrofilia (LOVE et al., 1999). Em um estudo realizado com 19 equinos, sem raça definida e com idade variando entre 2 e 19 anos, no Rio Grande do Sul sobre a influência do parasitismo intestinal nos parâmetros hematológicos em animais de tração (LHAMAS et al., 2013), mesmo em animais com altas infecções parasitárias, relacionadas com valores altos de OPG, não foram encontrados neutrofilia, eosinofilia e outras alterações na CDL. No presente trabalho, os resultados de neutrófilos segmentados e eosinófilos (Tabela 6) não apresentaram correlação com o OPG de ciatostomíneos respectivamente. Esses resultados corroboram ao da literatura, visto que na maioria dos casos, os autores não encontraram influência da infecção parasitária por ciatostomíneos na CDL em equinos (LHAMAS et al. 2013), assim como é o caso do presente trabalho. Em um estudo retrospectivo com 12 cavalos, sendo os animais de raças variadas incluindo PSI e pônei Shetland e com a idade variando de 7 meses a 6 anos, com infecção comprovada por ciatostomíneos na República Tcheca. Esses cavalos apresentaram quadro clínico variado, com alguns animais apresentando diarreia e cólica. Nesse estudo foi verificado que os resultados de exames laboratoriais como a contagem diferencial de leucócitos apresentou importante variabilidade entre os animais acompanhados, sendo que 8 pacientes apresentaram leucocitose e 1 apresentou eosinofilia (BODECEK et al. 2010). O presente trabalho também apresentou variabilidade de resultados na CDL, em que de um grupo de 51 cavalos, sendo todos da raça PSI e com idade variando entre 1 e 22 anos, apenas um animal

apresentou eosinofilia e onze apresentaram neutrofilia, sendo todos esses casos sem desvio à esquerda.

Para avaliar a possível presença de anticorpos à infecção causada pelos ciatostomíneos, foi realizado para os animais das duas raças o teste ELISA. MITCHELL et al. (2016) desenvolveram o teste de ELISA que detecta IgGs específicas de ciatostomíneos encistados na mucosa intestinal. Para isso, esses autores utilizaram um antígeno identificado previamente por McWilliam et al. (2010) denominado Cy-GALA-1 (*cyathostomin gut-associated larval antigen-1*), o qual é um componente protéico do intestino das larvas de ciatostomíneos. Os pesquisadores observaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) no título de anticorpos entre os animais comprovadamente positivos para a forma encistada e os animais comprovadamente negativos (MITCHELL et al., 2016). Os nossos resultados mostraram que nos PSI os valores dos títulos de anticorpos variaram entre 6,52 e 110,26 enquanto que nos Crioulos estes valores variaram entre 7,0 e 112,72. Foi observada diferença estatística com  $P = 0,00001$  entre os resultados de ELISA dos potros e éguas PSI, sendo que os títulos de imunoglobulinas G das éguas foram consideravelmente menores do que os valores dos potros. Além disso, foi observada uma fraca correlação entre os resultados de OPG e ELISA para os animais PSI, com  $R = 0,22$ . Considerando os cavalos PSI separados em três grupos pelo OPG (OPG baixo, intermediário e alto), não houve diferença estatística entre os valores do teste ELISA entre os três grupos. Porém, ao analisar a correlação dos valores do teste ELISA com os valores de OPG de cada grupo em separado foram obtidos valores diferentes de correlação. No grupo dos animais com menores OPG a correlação entre os dois testes foi fraca com  $R = 0,189$ ; já no grupo dos intermediários a correlação foi moderada com  $R = 0,372$ ; e no grupo dos animais com as maiores OPG a correlação foi forte e negativa com  $R = -0,547$ . Isso ocorreu provavelmente pelo fato dos animais que apresentaram maior OPG, possuírem maior número de parasitos adultos no intestino eliminando ovos e apresentarem menor número de larvas encistadas na mucosa intestinal, gerando títulos menores de imunoglobulinas. Correlacionando os resultados de ELISA dos PSI com os resultados de Ht e CDL, foram observadas correlações fracas.

Os animais da raça Crioulo foram separados em dois grupos de idade (os menores de 10 anos e os com 10 ou mais anos), porém, não foi observada diferença estatística nos valores de ELISA entre os grupos. Além disso, os Crioulos foram

separados em três grupos de acordo com o resultado de OPG, sendo classificados em menores, intermediários e maiores OPG. Correlacionando os valores de OPG desses grupos com os valores de ELISA, foram encontradas correlações fracas com  $R=0,136$  (menores OPG),  $R=0,280$  (OPG intermediários) e  $R=0,025$  (maiores OPG). Comparando os valores de ELISA entre os três grupos de Crioulo, não foram observadas diferença estatística ( $P>0,05$ ) entre os grupos.

A contagem de OPG é um indicador fenotípico da presença de parasitos no intestino, porém, pela OPG não se pode determinar a quantidade de parasitos presentes no animal (grau de infecção). É importante lembrar que cargas substanciais de vermes podem estar associadas a contagens fecais de poucas centenas de ovos apenas por grama (OPG) em razão de baixa fecundidade de vermes adultos, do período pré-patente longo ou da presença de muitos parasitos imaturos (TAYLOR et al., 2010). O teste ELISA das IgG contra as formas larvares encistadas de ciatostomíneos começou a ser desenvolvido por DOWDALL, et al. (2004) e foi aprimorado com o uso de proteínas recombinantes por MITCHELL et al., (2016), apresentando alta especificidade e sensibilidade. O ELISA é um indicador da presença de parasitos ciatostomíneos encistados na mucosa intestinal, sendo uma técnica mais sensível para indicar a presença e a quantidade dessa forma larval no intestino (MITCHELL et al., 2016). Devido a essa diferença de sensibilidade entre as técnicas de OPG e ELISA, e também pelo fato de a OPG buscar os ovos dos parasitos e o ELISA verificar a quantidade de IgGs contra as formas encistadas, ou seja, são testes com objetivos diferentes, era esperado que não houvessem fortes correlações entre os resultados das duas técnicas de diagnóstico.

Já é sabido da alta variação entre os parâmetros hematológicos e a presença de parasitos nos animais (REGO et al. 2009; LHAMAS et al. 2013). Em busca de fatores que poderiam influenciar na susceptibilidade ou resistência às infecções parasitárias em populações homogêneas de animais, avaliou-se o perfil epigenético a partir do DNA do sangue dos equinos. Para isto, através da revisão de literatura, foram utilizadas as ferramentas *The Horse Epigenome Database* (HEpD) e *GenBank* procurando possíveis genes que apresentassem influências na imunidade aos parasitos. Dentre os genes encontrados, o gene *SLC11a1* apresentou-se como possível candidato, uma vez que sua função está diretamente relacionada com a defesa do hospedeiro frente as infecções por bactérias, vírus e parasitos, como o *Toxoplasma gondii* por exemplo (BLACKWELL et al., 1994). Além disso, a análise *in*

*sílico* pelo *software* CpGPLOT, mostrou que este gene apresenta ilhas de CpG, critério este, imprescindível para ser passível da regulação epigenética por metilação do DNA.

A epigenética consiste de mecanismos que regulam a expressão dos genes, sem alterar a sequência nucleotídica (BIRD, 2002). Pesquisas em humanos já possuem um perfil epigenético melhor estabelecido que em animais, mostrando sua colaboração na morfogênese e embriogênese (BIRD, 2002). No surgimento e estabelecimento das patologias humanas há uma intensa influência da metilação do DNA (JONES, 2012). Nos últimos anos tem aumentado o número de pesquisas relacionadas à metilação do DNA em medicina veterinária. BRANDÃO (2017), por exemplo, estudou a metilação do gene *ESR1* com diferentes manifestações de tumores mamários em cadelas. Contudo, pouco se sabe sobre a influência epigenética nos animais, especialmente em equinos.

Na medicina humana há referências de trabalhos desenvolvidos com amostras de tumores de mama em mulheres brasileiras. Em alguns desses trabalhos foram observados que é comum apenas uma ou algumas ilhas de CpG de um gene tenham perfil de metilação importante para a expressão em determinada patologia, e conseqüentemente para a manifestação de um fenótipo. Esses estudos mostraram que enquanto umas ilhas de CpG influenciam na expressão de um gene por exemplo, outras ilhas de CpG do mesmo gene não participam da regulação da sua expressão (SENISKI et al., 2009; RAMOS et al., 2010). Isso demonstra que nem toda ilha de CpG participa da regulação da expressão de um gene, por isso há a preferência em estudar genes que tenham maior número de ilhas de CpG.

O gene *SLC11a1* possui duas ilhas de CpG, ambas são intragênicas, e são localizadas em exons na sua maior parte e em região de introns em menor proporção. É observado na literatura que as ilhas de CpG podem estar localizadas em exons, introns ou em ambos e podem interferir de diferentes maneiras na regulação da expressão (LEE et al., 2014). Curiosamente, a maioria das ilhas de CpG em equinos da raça PSI estão localizadas em regiões intergênicas (LEE et al. 2014), diferentemente do que foi encontrado com as duas ilhas de CpG estudadas nesse trabalho. Na literatura foi relatado ainda que as ilhas de CpG localizadas em região intragênica e que estão metiladas encontram-se na maior parte das vezes em região de introns (LEE et al. 2014; GIM et al. 2015).

No presente trabalho as duas ilhas de CpG do gene *SLC11a1* apresentaram perfis opostos de metilação do DNA. Enquanto a ilha de CpG 1 apresentou-se hipermetilada em todas as amostras analisadas (>75%), a ilha 2 apresentou-se hipometilada em todas as amostras (<30%), havendo uma diferença estatística significativa ( $P=0.0001$ ) entre esses resultados.

GIM et al. (2015) ao estudar o perfil de metilação em genes de cavalos PSI antes e depois de fazerem exercícios físicos, encontrou diferentes padrões de metilação em diferentes regiões genômicas. WNUK et al. (2014) também encontrou diferentes padrões de metilação do DNA dentro do gene *IGF2*. O objetivo deste autor era examinar alterações na metilação global do DNA associadas com o desenvolvimento e a idade dos equinos. Os estudos com epigenética demonstraram que ocorrem variações individuais dos fenótipos dos animais, e que podem ser influenciadas por metilação do DNA também em equinos. Novos estudos com outros genes poderiam ajudar a elucidar o papel da metilação nestas ilhas de CpG.

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais amplamente estudado, e está associada com a repressão da transcrição, porém, isso não ocorre em todos os casos (DINDOT e COHEN, 2013). É necessário estudos que envolvam a expressão gênica do gene *SLC11a1* para sabermos se a diferença de metilação encontrada entre as ilhas influenciam na sua expressão, e se tem relação com alguma manifestação fenotípica.

As amostragens deste trabalho foram animais de duas raças distintas, PSI e Crioulo, de propriedades diferentes, com manejo alimentar e sanitário relativamente similares para exclusão das características ambientais, permanecendo apenas as características intrínsecas de cada raça e idade. Os perfis de metilação entre as duas raças mostraram-se semelhantes para as ilhas de CpG 1 e 2 ( $P=0.595$  e  $P=0.639$  respectivamente), sugerindo assim, que o fator “raça” não tenha influenciado significativamente nos resultados. LEE et al. (2014), ao comparar o padrão de metilação do genoma entre um cavalo PSI e um cavalo da raça Jeju em quatro tipos de tecidos diferentes (músculo esquelético, coração, pulmão e cérebro), observou que algumas regiões do genoma apresentaram diferença importante entre as duas raças. YANG et al. (2011) observou diferentes padrões de metilação em sete tecidos, entre eles músculo e fígado, da raça de suíno Laiwu (raça indígena chinesa com características específicas) quando comparado a animais de outras raças. Ressalta-se a importância de estudos que analisem a diferença de metilação

entre animais de diferentes raças, pois podem fornecer informações sobre divergências evolutivas que ocorreram ao longo do tempo e sobre evidências quanto à aptidão de cada raça (LEE et al., 2014).

Não foram observadas diferenças importantes na metilação do DNA entre os animais com baixo e alto OPG, exceto pela metilação entre as ilhas. Na ilha de CpG 1 não houve diferença estatística na metilação do DNA entre as amostras de cavalos com OPG baixo e alto ( $P=1.000$ ). Além disso, foi observada uma correlação forte negativa entre os resultados de OPG (dos animais com alto OPG) e metilação ( $R=-0,814$ ), ou seja, nessa população, o animal que apresentou o maior OPG apresentou também a menor metilação. Contudo, esta afirmativa ainda é precoce uma vez que apenas uma amostra foi capaz de influenciar este resultado. Estes dados sugerem até o momento, que, aparentemente, a metilação da ilha 1 não teria influência na expressão do gene *SCL11a1*. Na ilha 2 não houve diferenças estatísticas significativas da metilação entre as amostras de cavalos com OPG baixo e alto ( $P=0,105$ ). Houveram correlações fracas entre os valores de OPG e os valores de metilação da ilha 2, tanto para as amostras de animais com baixa e alta OPG ( $R=-0,265$  e  $R=-0,231$ , respectivamente) (Tabela 18). Contudo, está claro que a ilha 2 possui maior influência sobre a expressão de *SCL11a1* uma vez que esta ilha se apresenta desmetilada nas condições de alto e baixo OPG, sendo esta diferença significativa (Figura 32). É possível também inferir que na medida em que há aumento no valor de OPG, a metilação da ilha 2 também aumenta em alguns casos específicos (Tabela 18), mostrando que pode existir um estímulo da expressão gênica através da infecção parasitária. A presença ou o aumento de parasitos ciatostomíneos poderia ser capaz de estimular a presença da proteína importante sinalizadora de processos imunológicos. A proteína SLC11a1 tem muitos efeitos pleiotrópicos na ativação de macrófagos na presença de organismos intracelulares patogênicos no hospedeiro, incluindo a regulação da interleucina-1 $\beta$ , óxido nítrico sintase induzida (iNOS), complexo de histocompatibilidade classe II (MHC II), Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), liberação de óxido nítrico (NO) e fluxo de L-arginina (ARIAS et al., 1997; SOO et al., 1998; BLACKWELL et al., 2000). Essa sutil sinalização via metilação de alguns CGs e a desmetilação de outros já é reportado no gene da *IL-2* em humanos. Os autores descrevem que desmetilação rápida da região, contendo apenas 3 supostos CpGs regulatórios seria o primeiro evento necessário para o estímulo da transcrição, e que, em seguida, seriam

desencadeados os eventos subsequentes. Estes autores sugerem que a desmetilação destes CpGs produziria picogramas da IL2, uma interleucina de memória, que levariam à rápida produção de outras citocinas inflamatórias auxiliando na reposta imune (MURAYAMA et al., 2006).

Para avaliarmos se a presença de altas contagens de OPG poderia interferir na aptidão física dos animais, e pelo fato dos equinos da raça PSI estarem situados em haras de criação e preparo de animais de corrida, foram obtidos das éguas adultas os dados de vitórias e as colocações em provas de corrida realizadas no Brasil através do *Stud Book* Brasileiro. O número de prêmios conquistados por cada égua variou entre 1 a 23. Esse resultado apresentou fraca correlação com os valores de OPG ( $R=-0,12$ ) (Figura 25). Esses valores mostraram que não houve uma relação direta entre o OPG e o número de prêmios conquistados. Conforme ROSANOVA et al. (2012), o qual estudou a prevalência parasitológica em equinos Crioulo criados em pastagens no estado do Tocantins, existe significativo comprometimento do desempenho dos animais, provocados pelo alto grau de parasitose intestinal. Pode haver algum tipo de comprometimento no desempenho dos animais pela presença de parasitos ciatostomíneos, mas que no caso das éguas PSI utilizadas nesse trabalho, não chegou a afetar o rendimento delas em provas de corrida.

O hematócrito das éguas PSI teve fraca correlação com o número de prêmios ( $R=0,26$ ). A literatura relata que é esperado que animais sob intenso exercício, devem apresentar a taxa de hematócrito maior, uma vez que este índice serve como medida da capacidade de exercício já que o volume total de hemácias é determinante da capacidade de carrear oxigênio (ROSE e HODGSON, 1994). O hematócrito aumenta linearmente com o aumento da intensidade do exercício, sendo que em cavalos PSI pode chegar a 61% (EVANS, 2000), o que favorece a um melhor desempenho físico dos animais.

É importante também considerar que o sangue de animais potros, os quais estão iniciando sua vida de competidores, foi obtido antes do processo de ganho de marcas de competidores (cerca de 2 anos antes); e que os parâmetros de ELISA, OPG e metilação abordam características precoces a este evento. Mas é interessante relatar, que características como a resistência aos parasitos, seja pela contagem de ovos, taxa de anticorpos ou mesmo a presença de proteínas importantes para o seu controle (também por mecanismos epigenéticos) parece ser

determinante, já que os dados podem ser obtidos antes do evento de corridas e seus prêmios. Isto poderia então ser utilizado como uma ferramenta biológica na seleção de animais antes mesmo do início dos treinamentos.

Os resultados de ELISA apresentaram fraca correlação com o número de prêmios das éguas PSI com  $R=0,08$ . Esse resultado demonstrou que o título de anticorpos para larvas de ciatostomíneos não influenciou no número de prêmios conquistados pelas éguas, corroborando os resultados de OPG. Já eram esperados estes eventos, já que não há indícios na literatura de que a presença de anticorpos contra infecção parasitária tenha alguma influência sob a aptidão física em animais ou mesmo em humanos, contudo, é fácil relacionarmos as taxas de imunoglobulinas inflamatórias sobre a influência negativa ao processo de aptidão física (AUSTIN, 2001). É sabido que citocinas inflamatórias em altas quantidades na corrente sanguínea podem desencadear aumento do estresse oxidativo, lesões de reperfusão ou mesmo acentuar a inflamação em humanos (WINKELMAN, 2007). Indivíduos saudáveis apresentam uma quantidade quase inexistente de IL1, e qualquer presença desta citocina inflamatória, como no caso em exercícios intensos (DINARELLO, C.A, 2005), elevaria a taxa de outras citocinas e moléculas pró-inflamatórias, como a IL2, IL6 e IL8. A síntese de IL6 no exercício é dependente da produção de  $TNF\alpha$ , que a recruta para a circulação pelos adipócitos (PETERSEN e PEDERSON, 2004). A mesma IL6 se gerada a partir dos músculos, reduz a produção de  $TNF\alpha$  diminuindo a destruição da miosina (WINKELMAN, C. 2007). A proteína SLC11a1 com seu papel pleiotrópico (BLACKWELL et al., 2000), se em grandes quantidades na circulação poderia aumentar o estado inflamatório dos animais, contribuindo para uma pior performance nos treinos. Assim, não é de se admirar que a mesma possua uma regulação epigenética muito forte, uma vez que a secreção da proteína SLC11a1 possui um papel protetivo na secreção de outras citocinas pró-inflamatórias, atuando na resistência/susceptibilidade às doenças. Sendo assim, é de extrema importância que ocorra uma estrita regulação da sua produção em mínimas doses.

Analisando os resultados obtidos no trabalho, principalmente a diferença de metilação observada entre as ilhas de CpG 1 e 2, é possível sugerir que a ilha de CpG 1 teria uma função de reprimir fortemente a transcrição de *SLC11a1* enquanto a ilha de CpG 2 sofreria alterações de baixa intensidade. Desse modo a quantidade da proteína produzida seria em baixíssimas quantidades, para que, quando

houvesse necessidade para a ativação da resposta imune contra os ciatostomíneos, haveria um controle restrito pela alta densidade de metilação da ilha 1, a qual antecede a ilha 2. Dosagens da proteína seriam interessantes para a confirmação desta hipótese, assim como a de outras citocinas inflamatórias destes animais. Contudo, é possível afirmar que existe um controle por metilação do DNA do gene *SLC11a1* e este processo precisa ser melhor estudado.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que existem correlações fracas entre exames e índices distintos como OPG, hematócrito, contagem diferencial de leucócitos, teste ELISA para detecção de anticorpos de ciatostomíneos e o número de prêmios em provas de corrida. O presente trabalho foi inédito na área da epigenética em medicina veterinária, sendo possível determinar que o gene *SLC11a1* em equinos apresentou duas ilhas de CpG, a Ilha 1 com 14 CpGs e a Ilha 2 com 16 CpGs. Os dados obtidos das sequências analisadas quanto à metilação dos dinucleotídeos CpG, permite-nos concluir a existência de diferença de percentual de metilação global entre os fragmentos de DNA das amostras da Ilha 1 e da Ilha 2, sendo que a Ilha 1 apresentou hipermetilação e a Ilha 2 hipometilação. Essa diferença de percentagem de metilação não é atribuída à diferença de valores de OPG alto e baixo, e nem à diferença de raça dos animais. Quanto à característica pesquisada, o valor de OPG de ciatostomíneos, não foi encontrado alguma relação com os padrões de metilação obtidos dos fragmentos de DNA pesquisados. Os resultados obtidos no trabalho permitem concluir sobre a possibilidade de haver regulações epigenéticas no gene *SLC11a1* em equinos, apesar de não podermos saber no momento a real existência e como seria essa regulação. Isso motiva a continuação de pesquisas com esse gene nessa área da ciência e nessa espécie animal, para saber realmente se há alguma regulação epigenética nesse gene, e se sim, qual seria o efeito para os animais.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAVALO CRIOULO (ABCCC). 2017. Disponível em: <[http://www.cavalocrioulo.org.br/studbook/cavalo\\_crioulo](http://www.cavalocrioulo.org.br/studbook/cavalo_crioulo)> Acesso em: 05 jan 2018.

ALTET, L.; FRANCINO, O.; SOLANO-GALLEGU, L.; RENIER, C.; SANCHEZ, A. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. **Infect. Immun.** v. 70, p. 2763–71, 2002.

ALTMANN, S.; MURANI, E.; SCHWERIN, M.; METGES, C. C.; WIMMERS, K. Maternal dietary protein restriction and excess affects offspring gene expression and methylation of non-SMC subunits of condensin I in liver and skeletal muscle. **Epigenetics**. v. 7, p. 239–52, 2012.

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, nº. 6, p. 711–28, 2014.

ARCHER, N. S.; NASSIF, N. T.; O'BRIEN, B. A. Genetic variants of *SLC11A1* are associated with both autoimmune and infectious diseases: systematic review and meta-analysis. **Genes Immun.** v. 4, p. 275-83, 2015.

ARIAS, M.; ROJAS, M.; ZABALETA, J.; RODRIGUEZ, J. I.; PARIS, S. C.; BARRERA, L. F.; GARCIA, L. F. Inhibition of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by Bcg(r) and Bcg(s) macrophages correlates with nitric oxide production. **J Infect Dis.** v. 176, p. 1552–8, 1997.

ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell. Mol. Life. Sci.** v. 59, p. 241–57, 2002.

AUSTIN, S. M. Gastreterologia. In: SAVAGE, C. J. (Ed.). **Segredos em Medicina de Equinos**. Porto Alegre : Artmed, 2001. p. 152-70.

BAILEY, E.; BROOKS, S. A. **Horse Genetics**. 2. ed. Boston: CABI, 2013.

BALZAN, A.; CAZAROTTO, C. J.; GROSSKOPF, R. K.; MACHADO, G.; TONIN, A. A.; SILVA, A. S. Occurrence of gastrointestinal helminths in horses and risk factors for infection. **Comp. Clin. Pathol.** 2016.

BARBOSA, O. F.; ROCHA, R. F.; SILVA, G. S.; SOARES, V. E.; VERONEZ, V. A.; OLIVEIRA, G. P.; LANDIM, V. J. C. Survey on Cyathostominae nematodes (Strongylidae, Strongylidae) in pasture bred horses from São Paulo State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n. 1, p.21-26, 2001.

BAYEROVA, Z.; JANOVA, E.; MATIASOVIC, J. Positive selection in the *SLC11A1* gene in the family Equidae. **Immunogenetics**. v. 68, p. 353, 2016.

BERNE, M. E. A. Parasitoses gastrintestinais de equinos. In: RIET-CORREA. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2 ed. São Paulo: Varela Editora, 2007, p.134-146.

BEVILAQUA, C. M. L.; RODRIGUES, M. L. A.; CONCORDET, D. Identification of infective larvae of some common nematode strongylids of horses. **Revue Méd Vét**, v. 144, p. 989-95, 1993.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & development**. v.16, p.6-21, 2002.

BLACKWELL, J. M.; GOSWAMI, T.; EVANS, C. A. W. *SLC11A1* (formerly NRAMP1) and disease resistance. **Cell Microbiol**. v. 3, p. 773–84, 2001.

BLACKWELL, J. M.; SEARLE, S.; GOSWAMI, T.; MILLER, E.N. Understanding the multiple functions of Nramp1. **Microbes Infect**. v.2, p. 317–21, 2000.

BLACKWELL, J. M.; ROBERTS, C.W.; ROACH, T. I. A.; ALEXANDER, J. Influence of macrophage resistance gene Lsh/Ity/Bcg (candidate Nramp) on *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Clin. Exp. Immunol**. v. 97, p. 107–12, 1994.

BODECEK, S.; JAHN, P.; DOBESOVA, O.; VAVROUCHOVA, E. Equine cyathostomosis: case reports. **Veterinarni Medicina**. v. 55, n. 4, p. 187–93, 2010.

BOWMAN, D. D. **Georgis Parasitologia veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2010.

BRANDÃO, Y. O. **Perfil de metilação do gene *ESR1* em tumores de mama de canino (*Canis familiaris*)**. Dissertação (Mestrado em Patologia, Parasitologia e Microbiologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

CANEVER, R. J. **Diagnóstico da resistência anti-helmíntica em ciatostomíneos de equinos por meio de testes in vivo e in vitro**. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

CASTRO, L. L. D.; ABRAHÃO, C. L. H.; MARTINEZ, A. D.; VIGNE, G. L. D.; YOSHITANI, U. Y.; ANTUNES, J.; MOLENTO, M. B. Avaliação da câmara mini-flotac e McMaster para quantificação de ovos de nematódeos gastrintestinais em equinos. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2014.

CHENG, Q.; ZHAO, B.; HUANG, Z.; SU, Y.; CHEN, B.; YANG, S.; PENG, X.; MA, Q.; YU, X.; ZHAO, B.; KE, X. Epigenome-wide study for the offspring exposed to maternal HBV infection during pregnancy, a pilot study. **Gene**. v.S0378-1119, n. 18, p. 30263-4, 2018.

CLARK, S. J.; HARRISON, J.; PAUL, C. L.; FROMMER, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Research**. v. 22, n. 15, p. 2990–7, 1994.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). Estudo do complexo agronegócio cavalo. Brasília, 2004. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/en/documentos/texto/estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo-resumo-coletanea-estudos-gleba.aspx>> Acesso em: 22 mai 2017.

COLE, J.; MORRIS, P.; DICKMAN, M. J.; DOCKRELL, D. H. The therapeutic potential of epigenetic manipulation during infectious diseases. **Pharmacology & Therapeutics**. v.167, p.85-99, 2016.

CONDER, G. A.; CAMPBELL, W. C. Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. **Advances in Parasitology**. v. 35, p. 1-83, 1995.

CORNING, S. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. **Parasites & Vectors**, Suppl 2:S1, 2009.

CRAIG, T. M.. Evidence of ivermectin resistance by *Parascaris equorum* on a Texas horse farm. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 27, n. 2, p. 67-71, 2007.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1B. **Crit Care Med.** v.33, n. 12, p.460–2, 2005.

DINDOT, S. V.; COHEN, N. V. Epigenetic regulation of gene expression: emerging applications for horses. **Journal of Equine Veterinary Science.** v. 33, p. 288-94, 2013.

DOWDALL, S. M.; PROUDMAN, C. J.; KLEI, T.R.; MAIR, T.; MATTHEWS, J. B. Characterisation of IgG (T) serum antibody responses to two larval antigen complexes in horses naturally- or experimentally-infected with cyathostomins. **International Journal of Parasitology.** v. 34, p. 101-8, 2004.

EGGER, G.; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature.** v. 429, n. 6990, p. 457-63, 2004.

EVANS, D. L. Overview of Equine Exercise Physiology and Biochemistry. In: EVANS, D. L. (Ed.) **Training and Fitness in Athletic Horses.** Rural Industries Research and Development Corporation. cap. 2, p.10-32, 2000.

FEENEY, A.; NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Epigenetics and transgenerational inheritance in domesticated farm animals. **Journal of Animal Science and Biotechnology.** v. 5, p. 48, 2014.

FENG, J.; LI, Y.; HASHAD, M.; SCHURR, E.; GROS, P.; ADAMS, L. G.; TEMPLETON, J. W. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*NRAMP1*) gene. **Genome Research.** v. 6, p. 956-64, 1996.

FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C. A.; MORRIS, S. C.; MADDEN, K. B.; GAUSE, W. C.; URBAN, J. F. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: Lessons from studies with rodent models. **Annual Rev. Immunol.** v.15, p.505-33, 1997.

FORBES, J. R.; GROS, P. Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (*Slc11a1*) and Nramp2 (*Slc11a2*) expressed at the plasma membrane. **Blood.** v. 102, p. 1884–92, 2013.

FORTIER, A.; MIN-OO, G.; FORBES, J.; LAM-YUK-TSEUNG, S.; GROS, P. Single gene effects in mouse models of host: pathogen interactions. **Journal of leukocyte biology,** v.77, p.868-77, 2005.

FRITSCHER, G.; NAIRZA, M.; THEURLA, I.; MAIRA, S.; BELLMANN-WEILERA, R.; BARTONB, H.C.; WEISS, G. Modulation of macrophage iron transport by Nramp1 (Slc11a1). **Immunobiology**. v. 212, p. 751-7, 2008.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **J. Mol. Biol.** v. 196, n. 2, p. 261-82, 1987.

GILES, C. J.; URQUHART, K. A.; LONGSTAFFE, J. A. Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): A report of 15 clinical cases. **Eq. Vet. J.** v. 17, p. 196-201, 1985.

GIM, J.; LEE, S.; KIM, D.; JEONG, K.; HONG, C. P.; BAE, J.; MOON, J.; CHOI, Y.; CHO, B.; CHO, H.; BHAK, J.; KIM, H. HEpD: A database describing epigenetic differences between Thoroughbred and Jeju horses. v.560, p.83- 8, 2015.

GOVONI, G.; VIDAL, S.; CELLIER, M.; LEPAGE, P.; MALO, D.; GROS, P. Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse Nramp1 gene in macrophages. **Genomics**, v.1, p.09-19, 1995.

HACKENBERG, M.; BARTUREN, G.; CARPENA, P.; LUQUE-ESCAMILLA, P. L.; PREVITI, C.; OLIVER, J. L. Prediction of CpG-island function: CpG clustering vs. sliding-window methods. **BMC Genomics**. v.11, p.327, 2010.

HALBERT, N. D.; COHEN, N. D.; SLOVIS, N. M.; FAIRCLOTH, J.; MARTENS, R. J. Variations in equid *SLC11A1* (NRAMP1) genes and associations with Rhodococcus equi pneumonia in horses. **J Vet Intern Med**. v.4, p. 974-9, 2006.

HERCEG, Z.; USHIJIMA, T. Introduction: epigenetics and cancer. **Adv. Genet.** v. 70, p. 1-23, 2010.

HODGKINSON, J. E. Molecular diagnosis and equine parasitology. **Veterinary Parasitology**. v. 136, n. 2, p. 109-16, 2006.

HU, J.; BUMSTEAD, N.; BARROW, P.; SEBASTIANI, G. Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to NRAMP1 and TNC. **Genome. Res.** v. 7, p. 693-704, 1997.

INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEREAL RURAL DO RIO DE JANEIRO (UFRRJ). 2018. Disponível em: <http://r1.ufrj.br/wp/iv/748/tecnica-de-roberts-e-o%E2%80%99sullivan-coprocultura/> Acesso em: 8 mai 2018.

IRALA, M. J. C.; MACHADO, R. B.; EISENKRAMER, P.; KLASENER, T.; COLLARES, G.; LINS, L. **Teste de redução de OPG em potros da raça PSI**. 13ª amostra de iniciação científica São Gabriel, Ediurcamp, Bagé, 2016.

JASKO, D. J.; ROTH, L. Granulomatous colitis associated with small strongyle larvae in a horse. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 185, p. 553-4, 1985.

JERONIMO, C.; USADEL, H.; HENRIQUE, R.; OLIVEIRA, J.; LOPES, C.; NELSON, W. G.; SIDRANSKY, D. J. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. **Natl. Cancer Inst.** v. 93, p. 1747–52, 2001.

JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nat Rev Genet.** v. 8, n. 4, p. 253-62, 2007.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nat Rev Genet.** v.13, p.484-92, 2012.

JONES, P. A.; TAYLOR, S. M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. **Cell.** v.20, p.85-93. 1980.

JONES, P. A.; TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science.** v.293, p.1068–70, 2001.

KAPLAN, R. M. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. **Vet. Res.** v. 33, p. 491–507, 2002.

KLEI, T.K.; CHAPMAN, M. R. Immunity in equine cyathostome infections. **Veterinary Parasitology**, v. 85, p. 123–36, 1999.

KOOYMAN, F. N. J.; VAN DOORN, D. C. K.; GEURDEN, T.; MUGHINI-GRAS, L.; PLOEGER, H. W.; WAGENAAR, J. A. Species composition of larvae cultured after anthelmintic treatment indicates reduced moxidectin susceptibility of immature *Cylicocyclus* species in horses. **Veterinary Parasitology.** v.227, p.77-84, 2016.

LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (LACVET UFRGS). Porto Alegre, 2018. Disponível em: < [https://www.ufrgs.br/lacvet/tabela\\_referencia.php](https://www.ufrgs.br/lacvet/tabela_referencia.php) > Acesso em: 22 nov 2017.

LEE, J.; HONG, C. P.; MOON, J.; JUNG, Y.; KIM, D.; KIM, T.; GIM, J.; BAE, J.; CHOI, Y.; EO, J.; KWON, Y.; SONG, S.; KO, J.; YANG, Y.M.; LEE, H.; PARK, K.; AHN, K.; DO, K.; HA, H.; HAN, K.; YI, J.M.; CHA, H.; CHO, B.; BHAK, J.; KIM, H. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns in horse. **BMC Genomics**. v.15, 2014.

LESTER, H. E.; SPANTON, J.; STRATFORD, C. H.; BARTLEY, D. J.; MORGAN, E. R.; HODGKINSON, J. E.; COUMBE, K.; MAIR, T.; SWAN, B.; LEMON, G.; COOKSON, R.; MATTHEWS, J. B. Anthelmintic efficacy against cyathostomins in horses in Southern England. **Vet. Parasitol.** v. 197, p. 189–96, 2013.

LEVINE, M. A. Domestication and early history of the horse. In: **The domestic horse: The evolution, development and management of it's behaviour**. Cambridge: Cambridge University Press, cap.1, p. 5-22, 2005.

LHAMAS, C. L. **Estudo comparativo dos parâmetros hematológicos e de líquido peritoneal em cavalos de tração naturalmente parasitados e após utilização de anti-helmíntico**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Pampa. Uruguaiana, 2013.

LI, M.; PINKEL, D. Clinical cytogenetics and molecular cytogenetics. **Journal. Zhejiang**, v. 7, n. 2, p. 162-3, 2006.

LI, Y.; TOLLEFSBOL, T. O. DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. **Methods Mol Biol.** v. 791, p. 11–21, 2011.

LICHTENFELS, J. R.; KHARCHENKO, V. A.; DVOJNOS, G. M. Illustrated identification Keys to strongylid parasites (Strongylidae:Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). **Vet. Parasitol.** v.156, p. 4-161, 2008.

LISTER, R.; PELIZZOLA, M.; DOWEN, R. H.; HAWKINS, R. D.; HON, G.; TONTI-FILIPPINI, J.; NERY, J. R.; LEE, L.; YE, Z.; NGO, Q.; EDSALL, L.; ANTOSIEWICZ-BOURGET5, J.; STEWART, R.; RUOTTI, V.; MILLAR, A. H.; THOMSON, J. A.; REN, B.; ECKER, J. R. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**. v.462, n. 7271, p. 315–22. 2009.

LOVE, S.; MURPHY, D.; MELLOR, D. Pathogenicity of cyathostome infection. **Veterinary Parasitology**. v. 85, p. 113–2, 1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 16 mai 2017.

MATIASOVIC, J.; KUBÍCKOVÁ, S.; MUSILOVÁ, P.; RUBES, J.; HORÍN, P. Characterization of the NRAMP1 (*SLC11A1*) gene in the horse (*Equus caballus* L.). **Eur. J. Immunogenet.** v. 5, p. 423-9, 2002.

MCWILLIAM, H. E. G.; NISBET, A. J.; DOWDALL, S. M. J.; HODGKINSON, J. E.; MATTHEWS, J. B. Identification and characterisation of an immunodiagnostic marker for cyathostomin developing stage larvae. **International Journal of Parasitology.** v. 40, p. 265-75, 2010.

MEŠTROVIĆ, T. Detection of DNA Methylation. **News Medical Life Sciences.** 2014. Disponível em: [https://www.news-medical.net/life-sciences/DNA-Methylation-Detection-\(Portuguese\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/DNA-Methylation-Detection-(Portuguese).aspx). Acesso em: 5 abril 2018.

McGEE, M.; BAINBRIDGE, S.; FONTAINE-BISSON, B. A crucial role for maternal dietary methyl donor intake in epigenetic programming and fetal growth outcomes. **Nutrition Reviews.** 2018.

MIRANDA, T. B.; JONES, P. A. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. **J Cell Physiol.** v. 213, p. 384–90, 1997.

MITCHELL, M. C.; TZELOS, T.; HANDEL, I.; MCWILLIAM, H. E. G.; HODGKINSON, J. E.; NISBET, A. J.; KHARCHENKO, V. O.; BURGESS, S. T. G.; MATTHEW, J. B. Development of a recombinant protein-based ELISA for diagnosis of larval cyathostomin infection. **Parasitology.** v.143, p.1055–66, 2016.

MOLENTO, M. B.; ANTUNES, J.; BENTES, R. N.; COLES, G. C. Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. **Vet. Rec.** v. 162, p. 384–5, 2008.

MORGAN, H. D.; DEAN, W.; COKER, H. A.; REIK, W.; PETERSEN-MAHRT, S.K. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. **J. Biol. Chem.** v. 279, n. 50, p. 52353-60, 2004.

MURAYAMA, A.; SAKURA, K.; NAKAMA, M.; YASUZAWA-TANAKA, K.; FUJITA, E.; TATEISHI, Y.; WANG, Y.; USHIJIMA, T.; BABA, T.; SHIBUYA, K.; SHIBUYA, A.; KAWABE, Y.; YANAGISAWA. J. A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory. **The EMBO Journal**. v.25, p1081–92, 2006.

PAIXÃO, T. A.; MARTINEZ, R.; SANTOS, R. L. Polymorphisms of the coding region of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene associated to natural resistance against bovine brucellosis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v.64, n.4, 2012.

PATTERSON, K.; MOLLOY, L.; QU, W.; CLARK, S. DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. **J. Vis. Exp**. v. 56, e. 3170, 2011.

PAULINO, C. D.; SINGER, J. M. **Análise de Dados Categorizados**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

PEREGRINE, A. S.; MOLENTO, M. B.; KAPLAN, R. M.; NIELSEN, M. K. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: Does it really matter? **Veterinary Parasitology**. v. 201, p. 1–8, 2014.

PETERSEN, A. M. W.; PEDERSON B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol**. v.98, p. 1154–62, 2004.

PILO, C.; ALTEA, A.; PIRINO, S.; NICOLUSSI, P.; VARCASIA, A.; GENCHI, M.; SCALA, A. *Strongylus vulgaris* (Looss, 1900) in horses in Italy: Is still a problem? **Veterinary Parasitology**. v. 184, p. 161-7. 2012.

PINEDO, P. J.; BUERGELT, C. D.; DONOVAN, G. A.; MELENDEZ, P.; MOREL, L.; WU, R.; LANGAEE, T. Y.; RAE, D. O. Candidate gene polymorphisms (BoIFNG, TLR4, *SLC11A1*) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle. **Prev. Vet. Med**. v. 91, n. 2-4, p. 189-96, 2009.

PRAKASH, O.; KUMAR, A.; SONWANE, A.; RATHORE, R.; SINGH, R. V.; CHAUHAN, A.; KUMAR, P.; RENJITH, R.; YADAV, R.; BHALADHARE, A.; BAQIR, M.; SHARMA, D. Polymorphism of cytokine and innate immunity genes associated with bovine brucellosis in cattle. **Mol Biol Rep**. v.4, p. 2815–25, 2014.

PRENDERGAST, G. C.; LAWE, D.; ZIFF, E. B. Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. **Cell, Cambridge**. v. 65, p. 395- 407, 1991.

PULITI, M.; RADZIOCH, D.; MAZZOLLA, R.; BARLUZZI, R.; BISTONI, F.; BLASI, E. Influence of the Bcg locus on macrophage response to the dimorphic fungus *Candida albicans*. **Infect. Immun.** v. 63, p. 4170–3, 1995.

R. A Language and Environment for Statistical Computing. R Core Team. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2018. <<https://www.R-project.org>>

RAMOS, E. A. S.; CAMARGO, A. A.; BRAUN, K.; SLOWIK, R.; CAVALLI, I. J.; RIBEIRO, E. M. S. F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; COSTA, F. F.; KLASSEN, G. Simultaneous CXCL12 and ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer. **BMC Cancer.** p 10-23, 2010.

RAZIN, A.; KAFRI, T. DNA methylation from embryo to adult. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.** v. 48, p. 53–81, 1994.

REGO, D. X.; SCHMEIL, B. R. P.; SCHILLER, J. W.; SILVA, M. M.; RAMOS, C. G.; JÚNIOR, P. V. M. Incidência de endoparasitas e ectoparasitas em equinos do município de Curitiba – PR. **Rev. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient.** v. 7, n. 3, p. 281-7. 2009.

RECH, R. R.; OLIVEIRA, F. N.; RAFFI, M. B.; BARROS, C. S. L. Diarréia associada à ciatostomíase em equino. **11º Enapave**, Botucatu, p.133, 2003.

REDDACLIFF, L. A.; BEH, K.; MCGREGOR, H.; WHITTINGTON, R. J. A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease. **Aust. Vet. J.** v. 83, p. 435–41, 2005.

RELF, V. E.; LESTER, H. E.; MORGAN, E. R.; HODGKINSON, J. E.; MATTHEWS, J. B. Anthelmintic efficacy on UK Thoroughbred stud farms. **Int. J. Parasitol.** v. 44, p. 507–14, 2014.

RIBEIRO, E.S. **Polimorfismos dos genes *SLC11a1* e *DLA-DRB1* e susceptibilidade de cães à leishmaniose.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba, 2011.

ROEPSTORFF, A.; NANSEN, P. **Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine.** **FAO Animal Health Manual.** n.3. Roma: Food and Agriculture Organization of The United Nations, 1998.

ROSANOVA, C.; BARROSO, A. S.; MARCOLINI, B. P.; VALADARES, R. R.; RODRIGUES, N. F. R. Determinação da prevalência parasitológica em equinos da raça Crioulo criados em pastagens no estado de Tocantins. **VII CONNEPI (7º Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação)**, 2012.

ROSE, R. J.; HODGSON, D. R. Structural Considerations in Equine Sports Medicine - Hematology and Biochemistry. In: **The Athletic Horse**. W. B. Saunders Company. cap. 5, p. 63-78, 1994.

RYU, S.; PARK, Y. K.; BAI, G. H.; KIM, S. J.; PARK, S. N.; KANG, S. 3'UTR. polymorphisms in the NRAMP1 gene are associated with susceptibility to tuberculosis in Koreans. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.** v. 4, p. 577–80, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 3. ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 74, n. 12, p. 5463-7, 1977.

SANJEEVI, C. B.; MILLER, E. N.; DABADGHAO, P.; RUMBA, I.; SHTAUVERE, A.; DENISOVA, A. Polymorphism at NRAMP1 and D2S1471 loci associated with juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** v. 43, p. 1397–404, 2000.

SENISKI, G. G.; CAMARGO, A. A.; IERARDI, D. F.; RAMOS, E. A. S.; GROCHOSKI, M.; RIBEIRO, E. S. F.; CAVALLI, I. J.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; ZANATA S. M.; COSTA, F. F.; KLASSEN, G. ADAM33 gene silencing by promoter hypermethylation as a molecular marker in breast invasive lobular carcinoma. **BMC Cancer**. v.9, n. 80, 2009.

SIPRA, A.S.; ANWAR, A.H.; KHAN, M.N. Studies on Strongylosis in Equines with Special Emphasis on Hematology and Chemoterapy. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v.2, n.4, p.1634-6. 1999.

SHOEMAKER, R.; DENG, J.; WANG, W.; ZHANG, K. Allele-specific methylation is prevalent and is contributed by CpG-SNPs in the human genome. **Genome Res.** v.20, p.883-9, 2010.

SKINNER, M. K. Role of epigenetics in developmental biology and transgenerational inheritance. **Birth Defects Res C Embryo Today**. v. 93, n. 1, p. 51-5, 2011.

SOO, S. S.; VILLARREAL, R. B.; KHAN, C. M.; HORMAECHE, C. E.; BLACKWELL, J. M. Genetic control of immune response to recombinant antigens carried by an attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain: Nramp1 influences T-helper subset responses and protection against leishmanial challenge. **Infect Immun**. v. 66, p. 1910–7, 1998.

STEINBACH, T.; BAUER, C.; SASSE, H.; BAUMGA“RTNER, W.; REY-MORENO, C.; HERMOSILLA, C.; DAMRIYASA, I.M.; ZAHNER, H. Small strongyle infection: Consequences of larvicidal treatment of horses with fenbendazole and moxidectin. **Veterinary Parasitology**. v.139, p.115-31. 2006.

SZYF, M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. **Toxicol. Sci**. v. 100, p. 7-23, 2007.

TAKA, S.; GAZOULI, M.; SOTIRAKOGLU, K.; LIANDRIS, E.; ANDREADOU, M.; TRIANTAPHYLLOPOULOS, K. Functional analysis of 3'UTR polymorphisms in caprine SLC11a1 gene and its association with *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis infection. **Vet Immunol Immunopathol**. v.167, p.75-9. 2015.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

TIZARD, I. R. Imunidade a parasitas. cap 27. In: TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

TRAVERSA, D.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; DEMELER, J.; MILILLO, P.; SCHURMANN, S.; BARNES, H.; OTRANTO, D.; PERRUCCI, S.; DI REGALBONO, A.F.; BERALDO, P.; BOECKH, A.; COBB, R. Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. **Parasit. Vectors**. v. 2, s. 2, 2009.

TRIANANTAPHYLLOPOULOS, K.A.; IKONOMOPOULOS, I.; BANNISTER, A.J. Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. **Epigenetics & Chromatin**. p.9-31, 2016.

URQUHART, G. M. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

VANSELOW, J.; YANG, W.; HERRMANN, J.; ZERBE, H. DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the alphaS1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of alphaS1-casein synthesis during acute mastitis. **J. Mol. Endocrinol.** v. 37, p. 463–77, 2006.

VERMA, M.; DUNN, B. K.; ROSS, S.; JAIN, P.; WANG, W.; HAYES, R.; UMAR, A. Early detection and risk assessment: Proceedings and recommendations from the Workshop on Epigenetics in Cancer Prevention. **Ann N Y Acad Sci.** v. 983, p. 298-319, 2003.

VIDAL, S.; TREMBLAY, M. L.; GOVONI, G.; GAUTHIER, S.; SEBASTIANI, G.; MALO, D.; SKAMENE, E.; OLIVIER, M.; JOTHY, S.; GROS, P. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. **J. Exp. Med.** v. 182, n. 3, p. 655-66, 1995.

WADDINGTON, C. H. The Epigenotype (1942). **Int. J. Epidemiol.** v. 41, p. 10-3, 2012.

WALPOLE, R. E.; Myers, R. H.; Myers, S. L.; YE, K. **Probabilidade e estatística para engenharia e ciências.** São Paulo: Pearson, 2009.

WANG, H.; WANG, J.; NING, C.; ZHENG, X.; FU, J.; WANG, A.; ZHANG, Q.; LIU, J. Genome-wide DNA methylation and transcriptome analyses reveal genes involved in immune responses of pig peripheral blood mononuclear cells to poly I:C. **Scientific Reports.** v.7, n. 9709, 2017.

WEI, G.; WEI, L.; ZHU, J.; ZHANG, C.; HU-LI, J.; YAO, Z. et al. Global mapping of H3K4me3 e H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. **Immunity.** v.30, p.155-67, 2009.

WILSON, A.G. Epigenetic Regulation of Gene Expression in the Inflammatory Response and Relevance to Common Diseases. **J Periodontol.** v.8, p.1514-9. 2008.

WINKELMAN, C. Inactivity and Inflammation in the Critically Ill Patient. **Crit Care Clin.** v. 23, p. 21–34, 2007.

WNUK, M.; LEWINSKA, A.; GURGUL, A.; ZABEK, T.; POTOCKI, L.; OKLEJEWICZ, B.; PONIEWIERSKA, M. B.; WEGRZYN, M.; SLOTA, E. Changes in DNA methylation patterns and repetitive sequences in blood lymphocytes of aged horses. **Age.** v.36, p. 31–48, 2014.

YANG, C.; ZHANG, M.; NIU, W.; YANG, R.; ZHANG, Y.; QIU, Z.; SUN, B.; ZHAO, Z. Analysis of DNA methylation in various swine tissues. **Plos One**. v. 6, 2011.

YODER, J. A.; WALSH C. P.; BESTOR, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends Genet**. v. 13, p. 335-40, 1997.

ZENG, J.; XIE, L.; LUO, H.; XIE, J. The Epigenetic Modifications of Genes Associated with Tuberculosis Susceptibility and Implications for Epi-Drugs. **Crit. Ver. Eukaryot Gene Expr**. v. 25, p. 349-62, 2015.

ZILBERMAN, D.; HENIKOFF, S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. **Development**. v. 134, p. 3959-65, 2007.

## ANEXOS

### ANEXO 1- HARAS SÃO JOSÉ DA SERRA, SÃO JOSÉ DOS PINHAIS.

Fotos do Haras São José da Serra. Especializado em cavalos PSI, localizado em São José dos Pinhais. Fonte: Carol Abrahão.

FIGURA 33- MANEJO DE CAVALOS PSI NO HARAS SÃO JOSÉ DA SERRA



Fonte: O autor (2018).

FIGURA 34- ÉGUAS PSI DO HARAS SÃO JOSÉ DA SERRA



Fonte: O autor (2018).

## ANEXO 2- RANCHO JB, PALMEIRA.

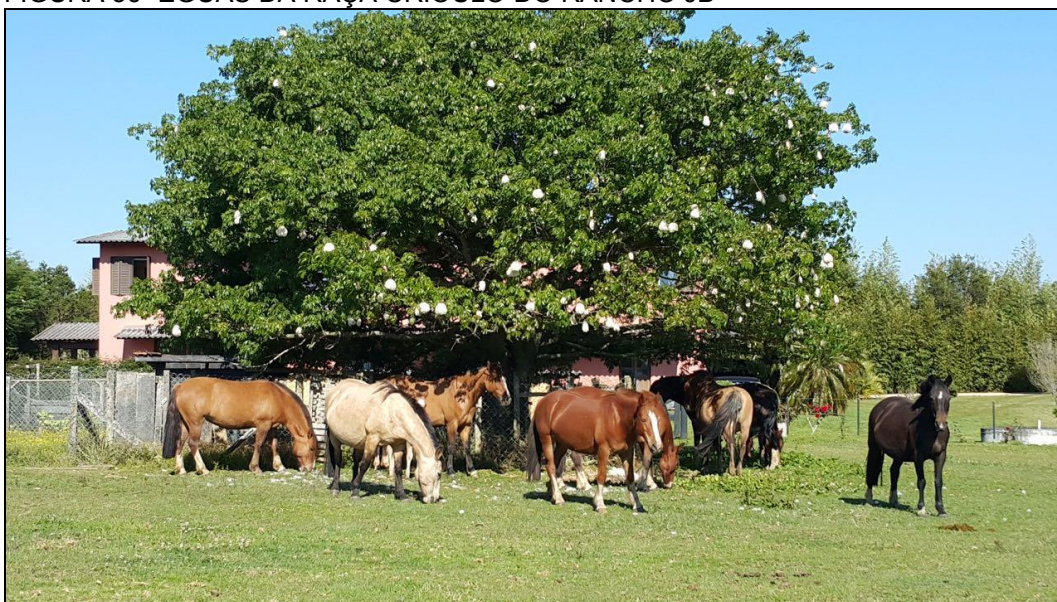
Fotos do Rancho JB, especializado na criação de cavalos Crioulos e localizado no município de Palmeira, PR. Fonte: Marcelo Molento.

FIGURA 35- MANEJO DOS CAVALOS CRIoulos JOVENS DO RANCHO JB



Fonte: O autor (2018).

FIGURA 36- ÉGUAS DA RAÇA CRIOULO DO RANCHO JB



Fonte: O autor (2018).

### ANEXO 3- COPROCULTURA PELA TÉCNICA DE ROBERTS E O'SULLIVAN

#### INDICAÇÃO:

Identificação e contagem de larvas de terceiro estágio de nematóides gastrintestinais de ruminantes e eqüídeos.

#### PROCEDIMENTO:

1. Retirar da amostra 20-30 gramas de fezes, positivas ao McMaster para nematóides da ordem Strongylida, colocando-a em frasco de boca larga e de borda uniforme;
2. Acrescentar vermiculite ou serragem, na proporção aproximada de duas partes de vermiculite para uma de fezes;
3. Misturar as fezes com o vermiculite até que forme uma mistura homogênea, acrescentar água, se necessário, para manter a cultura úmida, tomando o cuidado de não acumular água no fundo;
4. Limpar as bordas do frasco e tampá-lo com uma placa de Petri, colocar um barbante entre a placa e a borda do frasco para que haja aeração da cultura;
5. Manter em estufa tipo para B.O.D. à  $\pm 27^{\circ}\text{C}$  ou à temperatura ambiente, em clima tropical ou temperado, por 7 a 10 dias, umidecer conforme necessidade;
6. Recuperam-se as larvas infectantes, enchendo-se o frasco de cultivo com água corrente e tampando-o com uma placa de Petri e invertendo-o bruscamente sobre a placa;
7. Coloca-se 5 a 10ml de água na parte externa da placa de Petri;
8. Transcorridas 3 a 4 horas, transfere-se, com auxílio de uma pipeta, o conteúdo da placa de Petri para um tubo de ensaio;
9. Deixar o tubo de ensaio repousar em geladeira por 2 a 3 horas ou por mais tempo em temperatura ambiente. Após desprezar o sobrenadante, deixando um volume de 3 a 5ml;
10. Proceder à identificação/contagem das larvas, examinando-as entre lâmina/lâminulas com adição lugol, ao microscópio;
11. As larvas devem ser contadas/identificadas até atingirem cem unidades;
12. Para obter-se a carga parasitária procede-se a correlação entre o OPG e o número de larvas por gênero/espécie.

#### OBSERVAÇÃO:

As larvas recuperadas da cultura e acondicionadas em tubo de ensaio com um volume de  $\pm 4\text{ml}$  de água podem permanecer viáveis para o diagnóstico por aproximadamente 4 meses.

Fonte: Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

#### ANEXO 4- PROTOCOLO DE ELISA.

Protocolo de ELISA (MITCHELL et al., 2016) realizado para verificação da presença e título de anticorpos específicos contra antígenos de formas larvais encistadas de parasitos ciatostomíneos em equinos.

#### **Immunoreactivity of the recombinant GALA proteins assessed by ELISA**

Once the immunogenicity and specificity of each new GALA protein was confirmed by immunoblotting, the ELISA was used to evaluate serum IgG(T) levels to each protein in various groups of equids. First, IgG(T) levels to the GALA proteins were assessed in ponies over a time course of experimental infection (Murphy and Love, 1997). Antigen-specific IgG(T) levels were then assessed in cohorts of horses from the UK (UK+) and from the USA (US+) for which the cyathostomin burden was known and in a cohort of larval cyathostomiasis cases. Serum IgG(T) responses to Cy-GALA-pat were compared in these studies. The ELISA plates (96-well flat bottomed Microlon High binding plates, Greiner Bio-One) were coated with recombinant GALA antigens at  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Each well was coated with  $100 \mu\text{L}$  of antigen in coating buffer ( $0.1 \text{ M}$  carbonate coating buffer, pH 9.6) overnight at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Plates were washed six times with  $0.05\%$  Tween-20 in phosphate buffered saline (PBS) (PBS-T), then blocked using  $200 \mu\text{L}$  block buffer ( $2\%$  soya powder (Infasoy™ Cow and Gate Ltd), w/v in PBS), per well for 1 h at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . All serum dilutions were made in block buffer. The plates were washed three times (as above) and  $100 \mu\text{L}$  sera (diluted 1:800) added to each well and incubated for 2 h at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Each serum sample was tested in triplicate. Plates were washed six times, incubated for 1 h with ( $100 \mu\text{L}$  per well) goat anti-equine IgG(T) whole molecule (Serotec), diluted 1:400 in block buffer. The plates were washed six times, then  $100 \mu\text{L}$  rabbit anti-goat Ig:HRP conjugate (Sigma), diluted 1:500 in block buffer, added to each well and incubated for 1 h at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Reactions were developed by adding  $100 \mu\text{L}$  o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) solution prepared from SIGMAFAST OPD tablets (Sigma) to each well. After 15 min at room temperature,  $50 \mu\text{L}$   $2.5\text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  were added to stop the reactions and the absorbance in each well read at 490 nm. On all plates, aliquots from the same pool of CI sera were tested in triplicate as a control for inter-plate variation. The results derived from all samples were then expressed as the percentage optical density (OD) of the CI sample mean for each plate. Minitab 17 Statistical Software for Windows was used to analyse the data. For the different infected groups (UK+, UKClin+, US+), the group medians of the percentage positivity were compared with those of the cyathostomin free horses (UK- and US-) by the Mann-Whitney test. A P value  $<0.05$  was taken to indicate statistical significance.