

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

CAROLINE VALÉRIO MORAES

**INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE EVENTOS EPIGENÉTICOS EM
Haemonchus contortus E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA AO ANTI-
HELMÍNTICO MONEPANTEL**

São Carlos – SP

2019

CAROLINE VALÉRIO MORAES

**INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE EVENTOS EPIGENÉTICOS EM
Haemonchus contortus E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA AO ANTI-
HELMÍNTICO MONEPANTEL**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Simone Cristina Méo Niciura

São Carlos - SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Carolina Valério Moraes, realizada em 27/02/2019:

Profa. Dra. Simone Cristina Méc Niciura
EMBRAPA

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Profa. Dra. Cintia Hiromi Okino
EMBRAPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus.

À minha orientadora Profa. Dra. Simone Cristina Méo Niciura pela orientação, por todas as correções rápidas e adequadas e por toda ajuda.

Aos pós-graduandos e estagiários do laboratório de Parasitologia Veterinária: Giovanna, Aleman, Isabella, Débora, Amanda, João, Luciana, Matheus, Louyse, Marei e Rafaela, por toda a ajuda com as técnicas parasitológicas e o manuseio com os animais e por deixarem o ambiente de trabalho mais leve e colaborativo.

À Dra. Cintia Hiromi Okino pela ajuda com a extração de RNA e a RT-qPCR.

Ao Dr. Wilson Malagó pela ajuda nos géis de agarose.

À todos os funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste por todo apoio e por proporcionarem um ambiente propício para o desenvolvimento deste trabalho, principalmente aos técnicos Flávia Bressani e Gilberto Agostinho.

À Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur, Msc. Vinícius Marquioni Monteiro e técnica Regina pela ajuda e fornecimento do material necessário para quantificação e gel de proteínas.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular e à secretaria.

À banca de qualificação e de defesa pelos conselhos e contribuições para melhoria deste trabalho.

À Capes pelo apoio financeiro.

À minha família por ser meu alicerce e apoio em tudo o que faço, por me ajudar sempre que podiam e pela paciência.

Ao meu namorado por me acalmar sempre que necessário, pela paciência e por todos os conselhos.

RESUMO

O parasitismo por nematoides gastrintestinais, principalmente por *Haemonchus contortus*, é o maior obstáculo à produção de ovinos. O modo de controle mais utilizado pelos produtores é com o uso de anti-helmínticos, aos quais os parasitas acabam adquirindo resistência. Atualmente, o anti-helmíntico mais efetivo no controle de verminose na maioria dos rebanhos de pequenos ruminantes é o monepantel. Este trabalho investigou os eventos epigenéticos em *H. contortus* envolvidos no seu desenvolvimento assim como no estabelecimento da resistência anti-helmíntica ao monepantel. Uma vez que a epigenética, como a metilação do DNA e as modificações de histonas, contribui para a variação fenotípica, sua importância para a fisiologia de parasitas e para o desenvolvimento da resistência ainda precisa ser esclarecida. Investigações *in silico* sugeriram que não ocorre metilação de DNA em *H. contortus*, mas foram detectados indícios da ocorrência de metilação de tRNA e de modificações pós-traducionais de histonas, confirmadas por ELISA para larvas infectantes (L3). Em ensaios de PCR quantitativo (RT-qPCR), verificou-se alteração da expressão dos genes *dnmt*, *hmt* e *tfjmj*, potencialmente relacionados à maquinaria epigenética, durante o ciclo de vida de *H. contortus* (ovos, larvas L3 e adultos) e aumento da abundância de transcritos para os genes *dnmt* e *hmt* em fêmeas em comparação a machos adultos. Além disso, observou-se, em larvas L3, que a expressão desses genes não foi afetada pelo estado de resistência ao monepantel. Na comparação entre isolados de *H. contortus* sensíveis e resistentes ao monepantel, não foram detectadas alterações na expressão do gene *mptl1* e nem a presença de duas mutações nesse gene (retenção do íntron 15 e exclusão do éxon 12) previamente associadas à resistência na literatura. Os resultados obtidos neste trabalho são relevantes para o ganho de conhecimento sobre os eventos epigenéticos em parasitas. Além disso, uma vez que os níveis de transcrição dos genes da maquinaria epigenética sofreram alterações durante o ciclo de vida de *H. contortus* e, assim, parecem ser determinante para seu desenvolvimento e adaptação às alterações ambientais (dentro e fora do hospedeiro), tais genes podem ser investigados como potenciais alvos de novas drogas para o controle desse nematoide.

Palavras-chave: Metilação do DNA, modificações de histonas, monepantel, resistência anti-helmíntica.

ABSTRACT

Parasitism by gastrointestinal nematodes, mainly by *Haemonchus contortus*, is the major obstacle to sheep production. Anthelmintic treatment is the main method used by farmers to control worms. However, parasites acquire resistance and, currently, monepantel is the most effective available anthelmintic to control parasites in small ruminant flocks. This study investigated the epigenetic events in *H. contortus* involved on its development as well as in the establishment of monepantel resistance. Since epigenetics, such as DNA methylation and histone modifications, contribute to phenotypic variation, its importance for parasite physiology and development of resistance still needs to be clarified. *In silico* analyses suggested that DNA methylation does not occur in *H. contortus*, but we detected tRNA methylation and post-translational histone modifications, which were confirmed by ELISA in infective larvae (L3). By reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) assays, changes in gene expression were detected for *dnmt*, *hmt* and *tfjmj*, which are genes potentially related to the epigenetic machinery, during the life cycle of *H. contortus* (eggs, L3 larvae and adults). An increase in transcript abundance for *dnmt* and *hmt* genes in adult females compared to males was also observed. In addition, the expression of these genes was not affected by the resistance status to monepantel, in L3 larvae. In the comparison between monepantel susceptible and resistant *H. contortus* isolates, no changes in *mptl1* gene expression nor the presence of two mutations described in literature (intron 15 retention and loss of exon 12 in *mptl1*) were detected. The results obtained here are relevant to gain knowledge related to epigenetic events in parasites. In addition, since the transcription levels of genes from the epigenetic machinery were changed during the life cycle of *H. contortus*, they appear to be determinant for worm development and adaptation to environmental conditions (inside and outside the host), and can be further investigated as potential new drug targets for nematode control.

Key words: DNA methylation, histone modifications, monepantel, anthelmintic resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de vida do parasita hematófago <i>Haemonchus contortus</i>	24
Figura 2. Estrutura química do monepantel: [N-[(2S)-2-cyano-1-[5-cyano-2-(trifluoromethyl)phenoxy]propan-2-yl]-4-(trifluoromethylsulfanyl)benzamide].	30
Figura 3. Esquema da interação do anti-helmíntico monepantel com o receptor-alvo em <i>Haemonchus contortus</i>	31
Figura 4. Função das metiltransferases de DNA: DNMT 1 e DNMT 3.	36
Figura 5. Exame de contagem de ovos por grama de fezes (OPG).	43
Figura 6. Ovos de <i>Haemonchus contortus</i> após a recuperação vistos por microscópio (aumento 100x).	44
Figura 7. Coprocultura para recuperação de larvas infectantes (L3) de <i>Haemonchus contortus</i>	45
Figura 8. Larvas no estágio infectante (L3) de <i>Haemonchus contortus</i> recuperadas após 7 a 8 dias de coprocultura vistas por microscópio (aumento 100x).	45
Figura 9. Parasitas adultos macho e fêmea de <i>Haemonchus contortus</i> vistos por lupa (aumento 30x).	46
Figura 10. Disposição de cada anticorpo específico para cada uma das modificações de histona H3 na placa do <i>Epiquik™ Histone H3 Modification Multiplex Assay Kit (Colorimetric)</i> (Epigentek).	49
Figura 11. Esquema da localização de cada <i>primer</i> delineado para a quantificação relativa da expressão do gene <i>mpt1</i> em <i>H. contortus</i>	55
Figura 12. Distribuição das razões CpG observada/esperada (CPG_oe) nas ESTs do transcriptoma de <i>H. contortus</i>	60
Figura 13. SDS-PAGE dos extratos de proteínas de larvas infectantes (L3) de <i>H. contortus</i>	65
Figura 14. Porcentagem de cada modificação de histona H3 detectada por ELISA em larvas L3 de <i>H. contortus</i>	66
Figura 15. Quadro de comparação entre as porcentagens de modificações de histona H3 detectada por ELISA em larvas L3 de <i>H. contortus</i>	67
Figura 16. Gel de agarose 1,5% das amostras de RNA extraído a partir de diferentes estágios do ciclo de vida de <i>H. contortus</i>	69

Figura 17. Ausência de amplificação de amostras de RNA de <i>H. contortus</i> tratadas com DNase.....	70
Figura 18. Curvas de amplificação por qPCR das amostras de cDNA de <i>H. contortus</i> em diferentes estágios do ciclo de vida.	70
Figura 19. Curvas de dissociação da amplificação referente a uma amostra e ao controle negativo para todos os genes analisados em <i>H. contortus</i>	71
Figura 20. Gráficos de comparação entre os níveis de expressão (<i>fold-change</i>) dos genes potencialmente relacionados à maquinaria epigenética de <i>H. contortus</i> em diferentes estágios do ciclo de vida.	74
Figura 21. Gráficos de comparação entre os níveis de expressão (<i>fold-change</i>) dos genes potencialmente relacionados à maquinaria epigenética de <i>H. contortus</i> entre machos e fêmeas adultos.	74
Figura 22. Gráficos de comparação entre os níveis de expressão (<i>fold-change</i>) dos genes potencialmente relacionados à maquinaria epigenética de <i>H. contortus</i> em larvas L3 de <i>H. contortus</i> sensíveis e resistentes ao monepantel.	75
Figura 23. Curva de dissociação da amplificação de cDNA de larvas L3 de <i>H. contortus</i> sensíveis e resistentes ao monepantel, utilizando um par de <i>primers</i> que flanqueia o íntron 15 do mRNA do gene <i>mpt1</i>	76
Figura 24. Gráficos de comparação entre os níveis de expressão (<i>fold-change</i>) do gene <i>mpt1</i> em larvas L3 de <i>H. contortus</i> sensíveis e resistentes ao monepantel.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de cabeças de caprinos e ovinos no Brasil, grandes regiões e Unidades Federativas, em 2017.	22
Tabela 2. Informações sobre os genes e seus <i>primers</i> correspondentes, escolhidos para os ensaios de RT-qPCR.	54
Tabela 3. Quantidade de cDNA utilizada nas reações de RT-qPCR para os grupos de larvas L3 de <i>H. contortus</i> resistentes e sensíveis ao monepantel.	57
Tabela 4. Proteínas de <i>Haemonchus contortus</i> anotadas no UniProt como enzimas acetilases (HAT), desacetilases (HDAC) e metiltransferases (HMT) de histonas.....	61
Tabela 5. Principais proteínas de <i>Haemonchus contortus</i> ortólogas a metiltransferase de DNA do tipo 2 (DNMT2) e acetilases (HAT), desacetilases (HDAC), metiltransferases (HMT) e desmetilases (HDM) de histonas de outros organismos e as espécies com as quais apresentam ortologia.	62
Tabela 6. Quantificação, pelo método de Bradford, de proteínas extraídas de <i>H. contortus</i> nos estágios de larvas L3 e adulto.....	65
Tabela 7. Rendimento da extração de RNA para cada um dos grupos de <i>H. contortus</i> analisados por RT-qPCR.	68
Tabela 8. Valores de <i>threshold</i> , coeficiente de correlação (R^2), inclinação (<i>slope</i>) e Y- <i>intercept</i> da curva padrão obtida para o cálculo de eficiência de cada <i>primer</i> e a porcentagem de eficiência obtida.....	72
Tabela 9. Valores da análise realizada pelo programa <i>Bestkeeper</i> para seleção do gene de referência mais estável de <i>H. contortus</i> em todos os estágios do ciclo de vida.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5mC: 5-metil-citosina

aa: aminoácido

AAD: derivado de aminoacetonitrila

AEBSF: *4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BOD: demanda bioquímica de oxigênio (*biochemical oxygen demand*)

BSA: albumina sérica bovina

BZ: benzimidazol

CARS: *Consortium for Anthelmintic Resistance and Susceptibility*

Cat: catálogo

cDNA: DNA complementar

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

Cl⁻: íon cloro

Cq: ciclo de quantificação

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNMT: metiltransferase de DNA

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

GABA: ácido gama-aminobutírico

GluCIR: receptor de cloreto mediado por glutamato

Gly: glicina

H₂SO₄: ácido sulfúrico

HAT: acetilase de histona

HCl: hidrocloreto

HDAC: desacetilase de histona

HDM: desmetilase de histona

HMT: metiltransferase de histona

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

KCl: cloreto de potássio

MgCl₂: cloreto de magnésio

ML: lactona macrocíclica

mRNA: RNA mensageiro

nAChR: receptor nicotínico de acetilcolina

ncRNA: RNA não-codificante (*non-coding RNA*)

OPG: ovos por grama de fezes

pb: pares de base

PCR: reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

qPCR: PCR quantitativa ou PCR em tempo real

RT-qPCR: PCR quantitativa após transcrição reversa

Rn: fluorescência

RNA: ácido ribonucleico

rRNA: RNA ribossomal

SAM: S-adenosil-L-metionina

SDS: dodecil sulfato de sódio

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único (*single-nucleotide polymorphism*)

TBE: tris-borato-EDTA

TCA: ácido tricloroacético

TE: tampão tris-EDTA

Tris: trisaminometano

tRNA: RNA transportador

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1. Ovinocultura no Brasil.....	21
2.2. O parasita <i>Haemonchus contortus</i>	23
2.2.1. Ciclo de vida.....	23
2.2.2. Hemoncose.....	25
2.2.3. Genética.....	26
2.3. Anti-helmínticos.....	27
2.3.1. Benzimidazóis (BZs).....	28
2.3.2. Imidazotiazóis.....	28
2.3.3. Lactonas macrocíclicas (MLs).....	29
2.3.4. Derivados de aminoacetonitrila (AADs).....	29
2.4. Resistência anti-helmíntica.....	31
2.4.1. Resistência anti-helmíntica ao monepantel.....	33
2.5. Epigenética.....	34
2.5.1. Epigenética em nematoides.....	37
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo central.....	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
4. METODOLOGIA.....	39
4.1. Investigações <i>in silico</i> de ocorrência de metilação do DNA e de modificações de histonas em <i>Haemonchus contortus</i>	39
4.1.1. Análise da razão CpG observada/esperada (GpG _{o/e}) no transcriptoma de <i>Haemonchus contortus</i>	39
4.1.2. Busca por proteínas com potencial função de metilação do DNA e de modificação de histonas em <i>Haemonchus contortus</i>	41
4.2. Procedimentos parasitológicos.....	41
4.2.1. Caracterização dos isolados de <i>Haemonchus contortus</i> utilizados nas análises	41
4.2.2. Infecção artificial e contagem de ovos por grama de fezes (OPG).....	42
4.2.3. Coleta de <i>Haemonchus contortus</i> nos estágios de ovos, larvas infectantes (L3) e adultos.....	43
4.3. Procedimentos laboratoriais.....	46

4.3.1.	Investigação molecular de ocorrência de modificações de histonas em <i>Haemonchus contortus</i>	46
4.3.2.	Expressão de genes relacionados à maquinaria epigenética e à resistência ao monepantel em <i>Haemonchus contortus</i>	51
5.	RESULTADOS	60
5.1.	Investigação <i>in silico</i> de ocorrência de metilação do DNA e de modificações de histonas em <i>Haemonchus contortus</i>	60
5.1.1.	Análise da razão CpG observada/esperada (GpG _{o/e}) no transcriptoma de <i>Haemonchus contortus</i>	60
5.1.2.	Busca por proteínas com potencial função de metilação do DNA e de modificação de histonas em <i>Haemonchus contortus</i>	61
5.2.	Investigação molecular de ocorrência de modificações de histonas em <i>Haemonchus contortus</i>	64
5.2.1.	Quantificação e avaliação da integridade das amostras de proteínas.....	64
5.2.2.	ELISA para modificações de histona H3.....	66
5.3.	Expressão de genes relacionados à maquinaria epigenética e à resistência ao monepantel em <i>Haemonchus contortus</i>	67
5.3.1.	Quantificação e integridade das amostras de RNA	67
5.3.2.	Tratamento com DNase e transcrição reversa.....	69
5.3.3.	Padronização dos <i>primers</i>	71
5.3.3.1.	Eficiência dos <i>primers</i>	72
5.3.4.	Expressão de genes da maquinaria epigenética em <i>Haemonchus contortus</i> durante o seu ciclo de vida	73
5.3.5.	Relação da expressão de potenciais genes da maquinaria epigenética de <i>Haemonchus contortus</i> com a resistência ao monepantel	74
5.3.6.	Caracterização dos isolados resistentes estudados quanto à retenção do íntron 15 e exclusão do éxon 12 no processamento do mRNA do gene <i>mpt11</i> e quanto à expressão desse gene em <i>Haemonchus contortus</i>	75
6.	DISCUSSÃO.....	78
6.1.	Metilação do DNA em <i>Haemonchus contortus</i>	78
6.2.	Metilação de tRNA em <i>Haemonchus contortus</i>	79
6.3.	Modificações de histonas em <i>Haemonchus contortus</i>	80
6.4.	Caracterização dos isolados resistentes estudados quanto à retenção do íntron 15 e exclusão do éxon 12 no mRNA do gene <i>mpt11</i> e quanto à expressão desse gene em <i>Haemonchus contortus</i>	83
7.	CONCLUSÕES.....	86

8. PERSPECTIVAS FUTURAS..... 87

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS E *LINKS* 88

ANEXO 1 - Protocolos no. 06/2015 e no. 03/2017 do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Pecuária Sudeste com aprovação dos experimentos realizados no presente projeto..... 99

APÊNDICE 1 - Proteínas de *Haemonchus contortus* ortólogas a metiltransferases de DNA (DNMT1 e DNMT2) e a acetilases (HAT), desacetilases (HDAC), metiltransferases (HMT) e desmetilases (HDM) de histonas de outros organismos. 101

1. INTRODUÇÃO

O principal obstáculo à produção de ovinos é o parasitismo por nematoides gastrintestinais (GIRÃO; MEDEIROS; GIRÃO, 1992), por trazer prejuízos econômicos relevantes. Dentre os parasitas de maior importância econômica na exploração de pequenos ruminantes, o *Haemonchus contortus* se destaca devido a sua alta prevalência, associada à grande patogenicidade (HANSEN; PERRY, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2001; ATHAYDE *et al.*, 2004).

O principal modo de controle de helmintos é pelo uso de drogas anti-helmínticas. Porém, os parasitas desenvolveram resistência aos fármacos disponíveis no mercado de forma muito rápida (MOLENTO, 2005), o que se tornou um problema crescente. O anti-helmíntico monepantel surgiu como uma solução para rebanhos que apresentavam multiresistência (KAMINSKY *et al.*, 2008a), por ser o anti-helmíntico mais efetivo no combate à verminose na maioria dos rebanhos de pequenos ruminantes. Infelizmente, já existem vários relatos de resistência ao monepantel (SCOTT *et al.*, 2013; MEDEROS; RAMOS; BANCHERO, 2014; VAN DEN BROM *et al.*, 2015; CINTRA *et al.*, 2016; SALES; LOVE, 2016; ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; FLÁVIA DA SILVA *et al.*, 2018), o que mostra a importância de estudar melhor o desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos para esse nematoide gastrintestinal.

O *H. contortus* adquiriu resistência a todas as classes de anti-helmínticos já desenvolvidas (KOTZE; PRICHARD, 2016) e está sendo alvo de estudos de pesquisadores que almejam entender melhor os mecanismos de aquisição da resistência anti-helmíntica. Este trabalho propôs a investigação do envolvimento da epigenética, tanto no controle do desenvolvimento desse parasita, como no estabelecimento da resistência parasitária ao anti-helmíntico monepantel, uma vez que a epigenética influencia e regula a expressão dos genes. Ela é definida como o estudo de alterações estáveis no DNA, não mediadas pela sequência de nucleotídeos, que influenciam a expressão gênica e a diferenciação celular (LIEB *et al.*, 2006; BERGER *et al.*, 2009; FINGERMAN *et al.*, 2013). A epigenética, apesar de estável e herdável, é modificável de maneira reversível e única a cada tipo celular (OHGANE; YAGI; SHIOTA, 2008).

As principais modificações epigenéticas são a metilação do DNA e as modificações de histonas. A metilação do DNA participa na regulação da expressão

gênica levando ao silenciamento genético transcricional e à inativação gênica (MATHEWS; JANUSEK, 2011; HARDY; TOLLEFSBOL, 2011; NICIURA, 2015), no silenciamento de elementos repetitivos, na estabilidade cromossômica e como um sinal epigenético de memória transmitido durante a replicação do DNA (PAULSEN; TIERLING; WALTER, 2008; BLOMEN; BOONSTRA, 2011). Esse evento epigenético ocorre pela ação das metiltransferases de DNA (DNMTs) 1 e 3. As modificações de histonas, como acetilação, metilação, fosforilação, biotinilação e ubiquitinação, ocorrem tipicamente na extremidade N-terminal das histonas e são essenciais durante o desenvolvimento, sendo as duas primeiras as mais estudadas. As metiltransferases (HMTs), desmetilases (HDMs), acetiltransferases (HATs) e desacetilases (HDACs) de histonas são as enzimas que catalisam as principais modificações. De forma geral, a metilação das histonas pode causar tanto ativação quanto repressão da transcrição, e a hiperacetilação resulta na ativação de genes normalmente reprimidos (MATHEWS; JANUSEK, 2011; HARDY; TOLLEFSBOL, 2011; NICIURA, 2015).

Gao e seus colaboradores (2012) demonstraram que as mudas que ocorrem durante o ciclo de vida do parasita *Trichinella spiralis* estão sob controle epigenético. Por ser uma área de pesquisa relativamente nova, são escassos os trabalhos de epigenética em parasitas e também dos seus efeitos sobre a resistência parasitária. Apesar de suposições sobre sua importância (BEECH *et al.*, 2011), ainda não há estudos em *H. contortus* que relatem associação da epigenética à resistência a anti-helmínticos. Dessa maneira, a investigação da ocorrência de metilação de DNA e de modificações de histona em *H. contortus* irá permitir o avanço no conhecimento para posterior elucidação de sua participação no mecanismo de desenvolvimento de resistência anti-helmíntica no parasita.

Os resultados apresentados no presente trabalho podem contribuir para acrescer conhecimento sobre a regulação epigenética no parasita gastrointestinal *Haemonchus contortus* e orientar a busca por tratamentos alternativos ou por alvos de novos fármacos para o controle desse nematoide de pequenos ruminantes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Ovinocultura no Brasil

A ovinocultura é uma atividade econômica em ascensão no Brasil devido ao crescimento do mercado consumidor de carne ovina e à viabilização social e econômica de pequenas e médias propriedades rurais (GALLO, 2007; GIANLORENÇO, 2013). Essa atividade teve início, no Brasil, com a colonização pelos portugueses. Pequenas ovelhas foram trazidas com interesse basicamente na produção de lã e de carne, para suprir a necessidade dos colonizadores (COSTA; SIMÕES; RIET-CORREA, 2011). De acordo com o IBGE, em 2017, o rebanho ovino brasileiro era composto por 17.976.367 animais, sendo que a região Nordeste possui o maior número de cabeças, seguido pela região Sul, como mostra a Tabela 1 (IBGE, 2017). No Brasil, a produção a partir do rebanho ovino em 2017 foi de 78.105 toneladas de carne (FAO, 2017) e 9.367.451 quilogramas de lã (IBGE, 2017).

O parasitismo por nematoides gastrintestinais é o principal obstáculo à produção de ovinos, por provocar perdas econômicas, produtivas e sanitárias (GIRÃO; MEDEIROS; GIRÃO, 1992), com prejuízos estimados, por ano, em 2 milhões de reais na região sul do Rio Grande do Sul - Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2017), 42 milhões de dólares na América do Sul (WALLER, 2006), 436 milhões de dólares australianos na Austrália (LANE *et al.*, 2015) e 2 bilhões de dólares na América do Norte (GILLEARD, 2013). As helmintoses podem causar redução nas taxas de ganho de peso e no peso e valor de carcaça em cordeiros pelo uso de anti-helmínticos com baixa eficácia (MILLER *et al.*, 2012), podendo levar à anemia e até à morte dos animais, somado aos gastos gerados com medicamentos e antiparasitários. Além disso, quando infectados, os ovinos não conseguem aproveitar adequadamente os nutrientes dos alimentos ingeridos e, conseqüentemente, não convertem em peso, leite ou lã o que consomem (URQUHART *et al.*, 1998; ATHAYDE *et al.*, 2005).

Haemonchus contortus, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides papillosus* e *Oesophagostomum colubianum* são os endoparasitas que apresentam maior prevalência e maior intensidade de infecção, sendo considerados os nematoides de maior importância econômica na exploração de pequenos ruminantes

(COSTA; VIEIRA, 1984). A elevada prevalência associada à grande patogenicidade (HANSEN; PERRY, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2001; ATHAYDE *et al.*, 2004) faz de *H. contortus* a principal espécie endoparasita de ovinos e caprinos em áreas de clima tropical e temperado (URQUHART *et al.*, 1998; BESIÉ *et al.*, 2016; EMERY; HUNT; JAMBRE, 2016).

Tabela 1. Número de cabeças de caprinos e ovinos no Brasil, grandes regiões e Unidades Federativas, em 2017.

Brasil, Grande Região e UF	Rebanho Caprino	Rebanho Ovino
Brasil	9.592.079	17.976.367
Norte	164.597	656.251
Rondônia	13.382	101.858
Acre	11.679	88.957
Amazonas	15.210	41.016
Roraima	10.827	29.029
Pará	83.234	252.514
Amapá	2.279	3.048
Tocantins	27.986	139.829
Nordeste	8.944.461	11.544.939
Maranhão	356.302	276.795
Piauí	1.227.508	1.212.003
Ceará	1.075.850	2.249.769
Rio Grande do Norte	469.900	851.160
Paraíba	613.919	572.688
Pernambuco	2.157.149	2.193.303
Alagoas	59.710	264.268
Sergipe	23.680	161.221
Bahia	2.960.443	3.763.732
Sudeste	161.412	622.959
Minas Gerais	74.482	177.045
Espírito Santo	10.761	44.268
Rio de Janeiro	13.476	45.097
São Paulo	62.693	356.549
Sul	230.932	4.258.309
Paraná	121.906	561.712
Santa Catarina	31.189	259.290
Rio Grande do Sul	77.837	3.437.307
Centro-Oeste	90.677	893.909
Mato Grosso do Sul	29.359	344.413
Mato Grosso	29.917	399.163
Goiás	28.385	129.066
Distrito Federal	3.016	21.267

Fonte: IBGE, 2017.

2.2. O parasita *Haemonchus contortus*

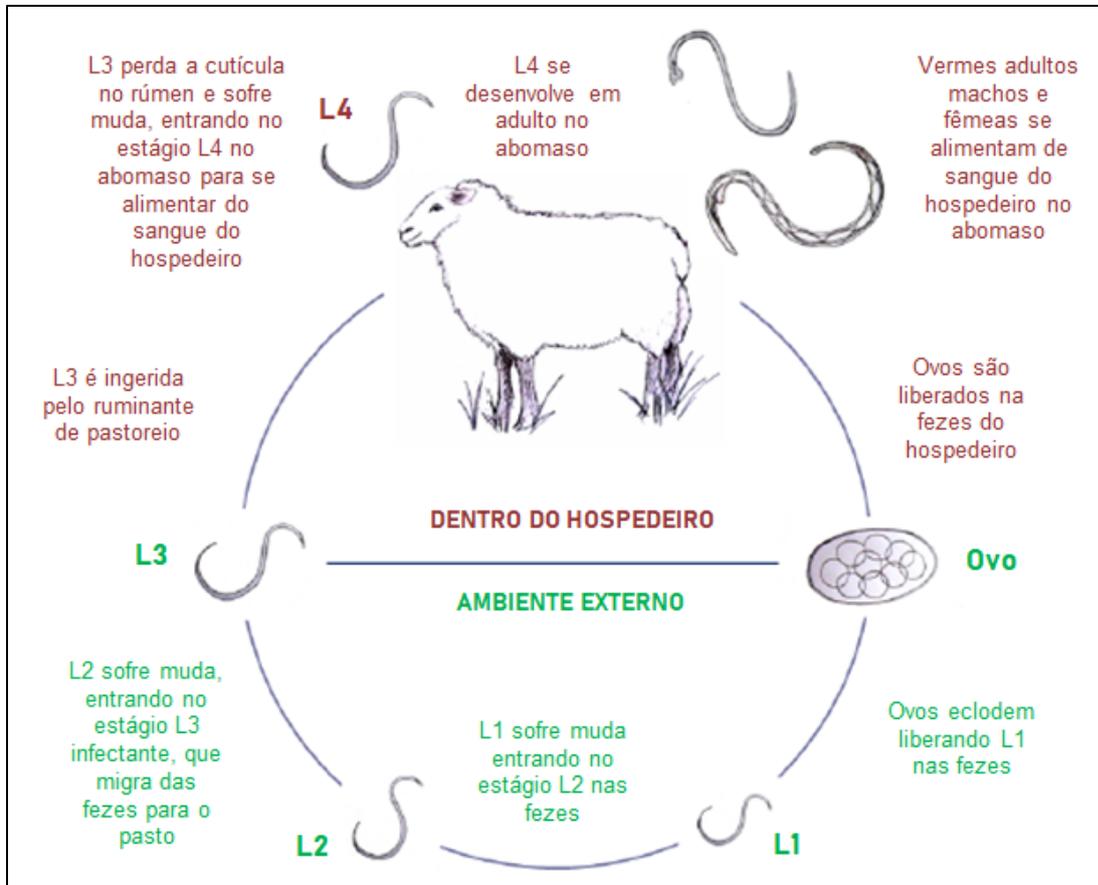
H. contortus é um verme hematófago altamente prolífico (cada fêmea produz de 3 a 15 mil ovos por dia) que parasita o abomaso de ruminantes, como ovinos e caprinos (OLIVEIRA *et al.*, 2001; ATHAYDE *et al.*, 2004).

2.2.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida de *H. contortus* é direto e está representado na Figura 1. O período de pré-patência, tempo que decorre da penetração do agente etiológico até o aparecimento das primeiras formas detectáveis do agente etiológico, é de duas a três semanas em ovinos (URQUHART *et al.*, 1998; ATHAYDE *et al.*, 2005; CASEY, 2014). Os vermes adultos vivem apenas alguns meses e reproduzem-se sexualmente no hospedeiro. As fêmeas produzem milhares de ovos por dia que são eliminados nas fezes do hospedeiro. Em condições ideais de temperatura e umidade, os ovos eclodem e as larvas surgem. Essas larvas são do primeiro estágio (L1) e alimentam-se de bactérias presentes nas fezes do hospedeiro. Entre 8 e 12 horas, essas larvas sofrem muda e perdem a cutícula. Após a muda, as larvas do segundo estágio (L2) crescem rapidamente e continuam a se alimentar de bactérias e após uma segunda muda, as larvas entram no terceiro estágio (L3). Isso ocorre cerca de 5 dias após os ovos serem liberados nas fezes. Essas larvas retêm a cutícula do segundo estágio como uma bainha protetora ou de cobertura, o que protege a larva L3 de condições climáticas desfavoráveis. A bainha também cobre a cavidade bucal, impedindo que as larvas se alimentem e, dessa forma, elas sobrevivem com a energia armazenada enquanto passam da massa fecal para a vegetação. Uma vez na vegetação, essas larvas são ingeridas por animais de pastoreio, como ovelhas e cabras, sendo esse estágio, portanto, o estágio infectante do ciclo de vida de *H. contortus*. Ao serem ingeridas, as larvas L3 vão para o trato gastrointestinal, onde perdem a cutícula, entrando no quarto estágio (L4) cerca de 2 dias após a infecção. As larvas L4 apresentam atividade hematófaga e capacidade de reprodução, iniciando a fase parasitária. Durante essa fase, as larvas desenvolvem uma cápsula bucal que parece um cone truncado (CASEY, 2014). O revestimento estomacal e intestinal, ou a mucosa, do hospedeiro torna-se irritado e

inflamado, pois as larvas perfuram a mucosa e sugam o sangue dos vasos (URQUHART *et al.*, 1998; ATHAYDE *et al.*, 2005).

Figura 1. Ciclo de vida do parasita hematófago *Haemonchus contortus*.



Legenda: em vermelho, fase parasitária, dentro do hospedeiro; em verde, fase de vida livre, fora do hospedeiro. Fonte: Adaptação de LAING *et al.*, 2013.

Cerca de 4 a 6 dias após a infecção, L4 machos apresentam a extremidade posterior inchada e grossa e a cauda curta, cônica e lisa enquanto as fêmeas têm cauda mais longa e afunilada. Mais tarde, ainda em L4, a cavidade bucal varia ligeiramente de forma e adquire aparência mais arredondada e com paredes mais espessas. O macho tem extremidade posterior mais distinta: romba e com os espículos e a bursa visíveis. Nas fêmeas, a formação da vagina, útero e ovário pode ser observada. Entre 9 e 12 dias após a infecção, as larvas mudam uma última vez para o estágio pré-adulto (L5). A cavidade bucal parece com a de um adulto maduro e contém a lanceta dorsal, que é curva e tem dois pontos em forma de espinhos. No macho, os espículos são visíveis, e a bursa está bem desenvolvida e, na fêmea, a abertura vulvar é mais distinta e os ovários e o útero também estão bem

desenvolvidos na fase pré-adulta. Após crescimento, as larvas L5 desenvolvem-se em adultos maduros. As fêmeas adultas apresentam os tubos do ovário enrolados em volta do intestino e o útero com ovos. Já os machos apresentam espículos muito distintos com ganchos e tubo genital bem definido, que frequentemente contém uma massa de espermatozoides. Os adultos machos e as fêmeas aparecem normalmente 18 dias após a infecção, mas podem demorar até 21 dias para serem completamente adultos. Os vermes adultos encontram-se na região posterior do fundo do abomaso mais próximo ao piloro, enquanto as L4 encontram-se na região anterior (URQUHART *et al.*, 1998; CASEY, 2014).

2.2.2. Hemoncose

A infecção por *H. contortus* leva a uma patologia, denominada hemoncose, e sua patofisiologia e os sinais clínicos associados estão relacionados à anemia desenvolvida devido à atividade hematófaga do parasita, que se inicia no quarto estágio larval (L4). A anemia pode ser detectada 10 a 12 dias após a infecção e estima-se que cada verme adulto provoque perda de 30 a 50 μ L de sangue por dia (URQUHART *et al.*, 1998; EMERY; HUNT; JAMBRE, 2016; BESIER *et al.*, 2016).

A taxa de ingestão de larvas infectantes e a habilidade do hospedeiro em repeli-las e recuperar a perda de sangue determinam a severidade da hemoncose. Essa patologia pode ser caracterizada de três formas, dependendo da intensidade da infecção e da resposta do hospedeiro ao parasita: hiperaguda, aguda e crônica (BESIER *et al.*, 2016).

A forma hiperaguda é relativamente rara e ocorre quando há infecções de até 30.000 parasitas (URQUHART *et al.*, 1998). É caracterizada pela perda massiva de sangue, levando à gastrite hemorrágica e anemia terminal. Em casos de morte, ocorre repentinamente, sem sinal de enfermidade e, na necropsia, são evidenciados grande número de vermes em diferentes estágios de desenvolvimento e hemorragia na superfície da mucosa do abomaso, tornando incontestável o diagnóstico (BESIER *et al.*, 2016).

A forma aguda é marcada pelo desenvolvimento de anemia significativa em período relativamente longo. Essa anemia é caracterizada por diminuição progressiva do volume globular durante as duas primeiras semanas de infecção e estabilização de hematócrito em níveis baixos no decorrer das semanas seguintes,

devido ao aumento da eritropoiese. Porém, a deficiência de ferro e a proteinemia levam à redução do hematócrito, e a morte pode ocorrer dentro de 4 a 6 semanas de infecção, dependendo da taxa de ingestão de larvas. Podem ser encontrados cerca de 2.000 a 20.000 vermes por ovelha, e cerca de 50.000 ovos por grama de fezes. Na necrópsia, observa-se a carcaça pálida com ascite e edema submandibular, resultado da proteinemia causada pela atividade hematófaga do *H. contortus*. A mucosa do abomaso apresenta sinais óbvios de ataque parasitário com pequenas lesões hemorrágicas. As alterações histopatológicas associadas incluem danos traumáticos à superfície da mucosa e evidência de resposta imunológica celular (URQUHART *et al.*, 1998; BESIÉR *et al.*, 2016).

Por fim, a forma crônica é caracterizada por infecções persistentes, mas com número menor de parasitas de *H. contortus*. Não se percebe a infecção crônica até que a nutrição se torne insuficiente, como em épocas de seca em que há deficiência de nutrientes no pasto ou falta de alimento. A capacidade do hospedeiro de se recuperar da anemia e de tolerar os efeitos patogênicos torna-se reduzida, e os sinais clínicos estão mais associados à perda de peso, fraqueza e inapetência do que à anemia (URQUHART *et al.*, 1998; BESIÉR *et al.*, 2016). Esse tipo de infecção é usualmente acompanhado por infecções com outros helmintos (BESIÉR *et al.*, 2016).

2.2.3. Genética

O genoma de *H. contortus* foi sequenciado a partir de dois isolados susceptíveis aos anti-helmínticos: MHco3(ISE).N1, com montagem do genoma de 370 Mb e predição de 21.799 genes codificadores de proteínas (LAING *et al.*, 2013); e McMaster, com predição de genoma de 320 Mb e 23.610 genes codificadores de proteínas (SCHWARZ *et al.*, 2013). O genoma do parasita *H. contortus* é diploide e apresenta composição cromossômica $2n = 11$, XO em machos e $2n = 12$, XX em fêmeas (REDMAN *et al.*, 2008).

Esse nematoide possui reprodução dioica e poliândrica, em que cada fêmea acasala-se com pelo menos 4 machos. Devido à poliandria e ao grande tamanho efetivo da população, esse nematoide possui alta diversidade genética (GILLEARD, 2013; EMERY; HUNT; JAMBRE, 2016; DEY *et al.*, 2018). Gilleard (2013) estimou que, considerando taxa de 2,1 mutações por genoma por geração, prolificidade de

2.000 ovos por fêmea parasita por dia, parasitismo de cada hospedeiro por 500 fêmeas e rebanho ovino com 500 animais infectados, serão produzidos 500 milhões de ovos de *H. contortus* por dia. Dessa maneira, existe a possibilidade de que uma nova mutação ocorra em cada nucleotídeo do genoma do parasita a cada dia, nesse rebanho. Se aliado à alta capacidade de gerar mutação, os parasitas estiverem sob pressão de seleção pelo uso de anti-helmínticos, as mutações de resistência podem aumentar em frequência e fixarem-se na população (GILLEARD, 2013).

2.3. Anti-helmínticos

O principal modo de controle de helmintos é pelo uso de anti-helmínticos. No Brasil, há cinco classes de anti-helmínticos comerciais: benzimidazóis, imidazotiazóis, salicilanilidas, lactonas macrocíclicas e derivados de aminoacetonitrila (AADs). No mercado internacional, há ainda os espiroindóis (KAMINSKY *et al.*, 2013), os quais não foram licenciados para a venda no Brasil até o momento. A escolha do anti-helmíntico para uso nos rebanhos baseia-se em custo, disponibilidade, controle concomitante de outros parasitas e eficácia, mas, há alguns anos, foi reportado predomínio do uso das lactonas macrocíclicas nos rebanhos ovinos do estado de São Paulo (VERÍSSIMO *et al.*, 2012).

Os primeiros anti-helmínticos utilizados foram o sulfato de cobre, em 1881, e o tetracloreto de carbono, em 1926. Posteriormente, em 1940, a fenotiazina e a piperazina começaram a ser utilizadas para o controle de nematoides gastrointestinais. Duas décadas depois, iniciou-se o desenvolvimento de anti-helmínticos de amplo espectro de atividade, que eram bastante vantajosos em relação aos primeiros existentes, por serem mais seguros e eficazes contra uma ampla variedade de helmintos nematoides, pela possibilidade de administração em esquemas versáteis e por apresentarem menor toxicidade (ADAMS, 2003; SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2014). Surgiram então anti-helmínticos de amplo espectro de três grupos farmacológicos com diferentes mecanismos de ação: os benzimidazóis, os imidazotiazóis e as lactonas macrocíclicas (MARTIN, 1997). Nas duas últimas décadas, foram desenvolvidos dois medicamentos novos: o monepantel (do grupo dos AADs) e o derquantel (do grupo dos espiroindóis). Eles são eficazes mesmo em rebanhos com resistência aos demais grupos de anti-helmínticos (KAMINSKY *et al.*, 2008b; LITTLE *et al.*, 2011). Antes do

desenvolvimento desses novos produtos, o estado de resistência era alarmante no mundo todo (KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012), e, em muitas propriedades, nenhum produto químico era eficaz no controle dos helmintos gastrintestinais de ovinos (VERÍSSIMO *et al.*, 2012).

Os anti-helmínticos de amplo espectro são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, sendo que, de forma geral, estão divididos em dois grupos: os que agem nos canais iônicos da membrana celular (atuando de forma rápida) e os que agem nos processos bioquímicos celulares (atuando lentamente) (LECOVÁ *et al.*, 2014). De forma geral, podem interferir na produção de energia, na coordenação neuromuscular e na dinâmica microtubular, causando eliminação dos parasitos devido à inanição ou à paralisia (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2014).

2.3.1. Benzimidazóis (BZs)

Os anti-helmínticos do grupo dos benzimidazóis surgiram com o desenvolvimento do tiabendazol, em 1961 (ADAMS, 2003; HOLDEN-DYE; WALKER, 2007). O mecanismo de ação desse grupo consiste na afinidade a uma proteína estrutural, a β -tubulina. O anti-helmíntico, ao se ligar à β -tubulina, impede sua dimerização com a α -tubulina, interferindo no seu padrão de polimerização para formação dos microtúbulos (ADAMS, 2003; SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2014). Uma vez que os microtúbulos são essenciais para vários processos celulares, os benzimidazóis interrompem processos vitais para função celular e, conseqüentemente, provocam *déficit* energético por destruição das células intestinais e inibição da produção de ovos (ADAMS, 2003; SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2014).

2.3.2. Imidazotiazóis

Os imidazotiazóis foram comercializados a partir de 1965. O tetramisole foi o primeiro princípio ativo desse grupo, seguido pelo levamisole. Essas substâncias são absorvidas pela cutícula do helminto e atuam em seus receptores nicotínicos sinápticos e extrassinápticos das membranas das células musculares, induzindo a abertura dos canais iônicos. Essa abertura leva ao aumento da condução de sódio e provoca a despolarização da membrana. São, portanto, considerados agonistas

colinérgicos, e provocam contração muscular e paralisia espástica dos parasitas, que são posteriormente eliminados do hospedeiro (MARTIN, 1997; HOLDEN-DYE; WALKER, 2007; SPINOSA; GÓRNIAK; BERNARDI, 2014).

2.3.3. Lactonas macrocíclicas (MLs)

As lactonas macrocíclicas constituem a mais importante família de anti-helmínticos, devido a sua grande utilização. São bastante aceitas no mercado por razões econômicas e devido à alta eficácia, ao amplo espectro de ação e à baixa toxicidade. Além disso, é o único grupo de anti-helmínticos que pode ter ação endectocida (MCCAVERA; WALSH; WOLSTENHOLME, 2007; PRICHARD; ROULET, 2007). Elas penetram nos parasitas supostamente por absorção transcuticular ou por via oral nos helmintos hematófagos (SPINOSA; GÓRNIAK; BERNARDI, 2014).

Esse grupo de medicamento atua especificamente em receptores de canais iônicos de cloreto mediados por glutamato (GluCIRs) expressos em neurônios e células musculares dos nematoides (CULLY *et al.*, 1994; KOTZE *et al.*, 2014), potencializando esses canais de forma irreversível. O aumento da permeabilidade de íons Cloro (Cl⁻) leva à inibição da atividade neuronal e contração muscular, promovendo paralisia e morte do parasita (KOTZE *et al.*, 2014). Em baixas concentrações, potencializa o efeito do glutamato, e em altas concentrações, abre os canais mediados diretamente pelo glutamato (MARTIN, 1997).

As lactonas macrocíclicas também atuam, de forma secundária, nos receptores de canais iônicos de cloreto mediados por ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina (Gly), quando em concentrações muito altas (ADELSBERGER; LEPIER; DUDEL, 2000; KOTZE *et al.*, 2014).

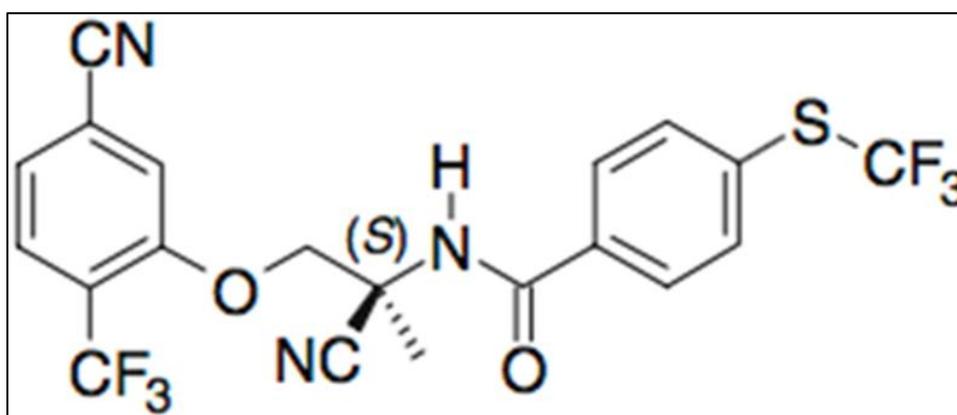
2.3.4. Derivados de aminoacetonitrila (AADs)

O grupo de anti-helmínticos derivados de aminoacetonitrila surgiu recentemente como uma solução para rebanhos que apresentavam multiresistência (KAMINSKY *et al.*, 2008a), o que representa um problema global crescente. O monepantel é o representante desse grupo, e foi introduzido no mercado na Nova Zelândia, em 2009 (HOSKING *et al.*, 2010) e, no Brasil, em 2012.

2.3.4.1. Monepantel

O medicamento monepantel (fórmula química mostrada na Figura 2) é eficiente contra nematoides multi-resistentes, devido ao seu diferente modo de ação (RUFENER *et al.*, 2009; KOTZE *et al.*, 2014).

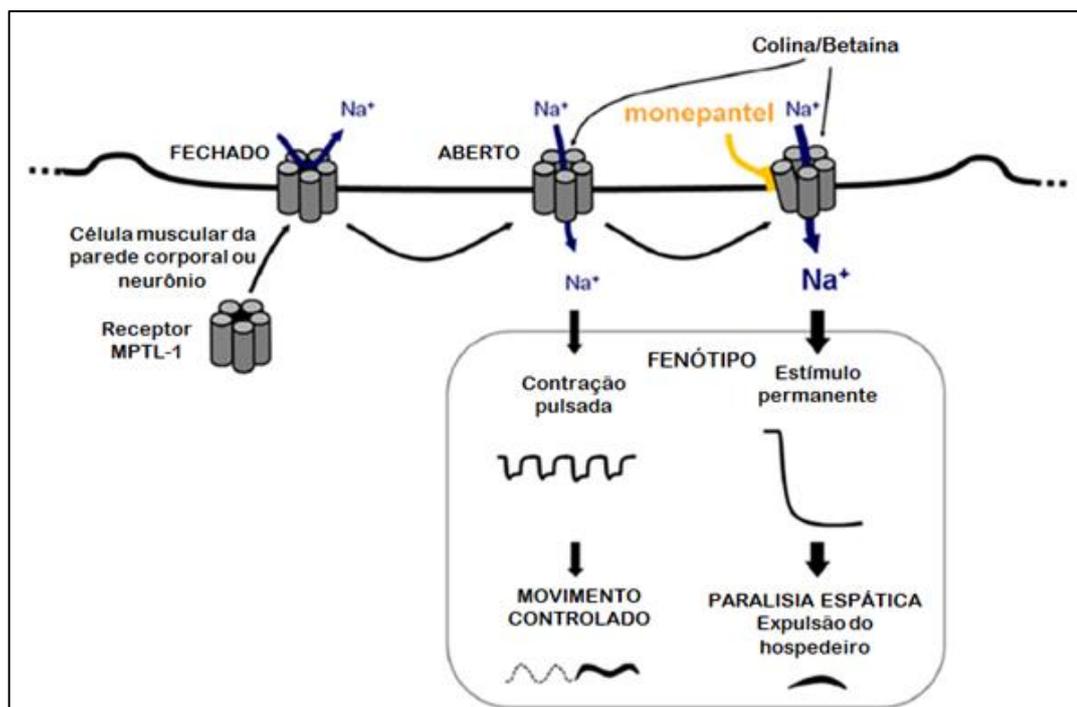
Figura 2. Estrutura química do monepantel: [N-[(2S)-2-cyano-1-[5-cyano-2-(trifluoromethyl)phenoxy]propan-2-yl]-4-(trifluoromethylsulfanyl)benzamide].



Fonte: ABONGWA *et al.*, 2017.

Essa molécula no receptor nicotínico nAChR da subfamília DEG-3, encontrado apenas em nematoides. Em *H. contortus*, o monepantel liga-se à subunidade MPTL-1 desse receptor e leva à sua abertura de maneira irreversível (BAUR *et al.*, 2015). A Figura 3 mostra a interação do monepantel com o receptor-alvo em *H. contortus*, o Hco-MPTL-1 (KOTZE *et al.*, 2014), agindo como agonista desse canal iônico, levando à hipercontração e consequente paralisia espástica do nematoide (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2014). Após estudo com outras espécies de nematoides, Rufener e seus colaboradores (2010) sugeriram que, além do MPTL-1, a subunidade DES-2 pode ser um alvo secundário do anti-helmíntico.

Figura 3. Esquema da interação do anti-helmíntico monepantel com o receptor-alvo em *Haemonchus contortus*.



Fonte: Adaptação de KOTZE *et al.*, 2014.

Como citado anteriormente, os imidazotiazóis também agem como agonistas de nAChR. Porém, esse grupo atua em subunidades distintas do receptor (RUFENER *et al.*, 2010).

Foi verificado que o monepantel possui baixa toxicidade e boa tolerabilidade para ruminantes, com meia vida terminal de 215 horas (KAMINSKY *et al.*, 2008a). O fabricante do medicamento (Novartis Saúde Animal) recomenda carência de 7 dias para abate e não recomenda a utilização em animais produtores de leite para consumo humano.

2.4. Resistência anti-helmíntica

A resistência é um evento evolutivo no qual alguns indivíduos sobrevivem aos tratamentos, reproduzem-se e transmitem seus genes à próxima geração (ECHEVARRIA, 1996; GRIFFITHS *et al.*, 1998). Como consequência, após poucas gerações, a frequência de indivíduos resistentes aumenta na população (BLACKHALL; PRICHARD; BEECH, 2008) e leva à falha nos tratamentos anti-helmínticos (BEECH, 2008).

Cavalcante e colaboradores (2009) definiram resistência parasitária como o fenômeno que impede um fármaco de manter a mesma eficácia contra os parasitas, se utilizado nas mesmas condições e após um determinado período de tempo. Já Coles e colaboradores (1992) sugeriram que a resistência está presente quando a eficácia da dose terapêutica normal está abaixo de 95%.

A maioria dos produtores não adota o esquema de vermifugação seletivo ou estratégico e não realiza de forma adequada a alternância dos grupos químicos. Com isso, os parasitas desenvolvem resistência aos fármacos disponíveis no mercado muito rapidamente (MOLENTO, 2005). Como o processo de desenvolvimento dos fármacos anti-helmínticos leva muito mais tempo que o processo de surgimento da resistência, e ainda a reversão da resistência é extremamente lenta ou até impossível (ROOS *et al.*, 2004), é imprescindível retardar o aparecimento da resistência, a fim de que os anti-helmínticos permaneçam efetivos por períodos mais longos. Dessa maneira, além da utilização correta dos anti-helmínticos, estratégias devem ser buscadas para o controle da verminose e para a detecção precoce da resistência. Coles *et al.* (2006) publicaram uma revisão contendo vários métodos utilizados para detecção de resistência anti-helmíntica, tais como: teste de redução na contagem de ovos nas fezes, teste de eclodibilidade de ovos, teste de desenvolvimento larval, testes moleculares, testes de eficácia controlados e testes *in vitro*.

Os primeiros relatos do surgimento de resistência anti-helmíntica foram feitos em 1964, logo após a comercialização do tiabendazole (PRICHARD, 1994). Gopal, Pomroy e West (1999) fizeram o primeiro relato de resistência à ivermectina em um isolado de *T. colubriformis* na Nova Zelândia.

Sczesny-Moraes, Bianchin e Silva (2010) relataram que os primeiros registros de resistência a anti-helmínticos no Brasil surgiram nos anos 60, tendo o primeiro caso ocorrido no Rio Grande do Sul, em 1967, com resistência de *H. contortus* ao tiabendazole. Amarante *et al.* (1992) constataram resistência múltipla ao oxfendazol, levamisol e ivermectina na maioria das propriedades estudadas no Estado de São Paulo, sendo *Trichostrongylus* resistente ao levamisol e *Haemonchus* aos três anti-helmínticos testados (oxfendazol, ivermectina e levamisol).

H. contortus tem propensão muito alta para desenvolver resistência a anti-helmínticos. É a espécie parasita que desenvolveu resistência mais rapidamente e em que a resistência é mais difundida (KAPLAN, 2004; GILLEARD, 2013). O *H.*

contortus já adquiriu resistência a todas as classes de anti-helmínticos desenvolvidas (KOTZE; PRICHARD, 2016) e graças a essa propensão e também à sua importância econômica, seus mecanismos, genética, diagnóstico e manejo da resistência anti-helmíntica são bastante estudados (PRICHARD, 2001; GILLEARD, 2006; WOLSTENHOLME; KAPLAN, 2012).

2.4.1. Resistência anti-helmíntica ao monepantel

O monepantel foi desenvolvido em 2008 na Nova Zelândia e era o medicamento mais efetivo contra nematoides multi-resistentes às classes de anti-helmínticos disponíveis no mercado (HOSKING *et al.*, 2010; KAMINSKY *et al.*, 2011; GEORGE *et al.*, 2012; SAGER *et al.*, 2012). Porém, assim como para as antigas classes de anti-helmínticos (JAMES; HUDSON; DAVEY, 2009), recentemente foram relatados os primeiros casos de resistência ao monepantel em caprinos na Nova Zelândia (SCOTT *et al.*, 2013) e em ovinos no Uruguai (MEDEROS; RAMOS; BANCHERO, 2014) e na Holanda (VAN DEN BROM *et al.*, 2015). Atualmente, existem outros relatos de resistência ao monepantel na Austrália (SALES; LOVE, 2016), no Brasil (CINTRA *et al.*, 2016; ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; FLÁVIA DA SILVA *et al.*, 2018) e no Reino Unido (HAMER *et al.*, 2018).

Scott *et al.* (2013) observaram, em caprinos e ovinos, eficácia de 0% do monepantel para *Teladorsagia circumcincta*, 9,0% para *Trichostrongylus colubriformis* e 48% para *Oesophagostomum venulosum*. Ainda, não foi demonstrada nenhuma eficácia contra *Capillaria spp*, *Trichuris spp* e *Strongyloides spp*. Porém, não existem relatos de atividade do monepantel contra esses parasitas.

Já Mederos, Ramos e Banchero (2014), no Uruguai, realizaram o teste de redução de ovos nas fezes para investigar a suspeita de ineficiência do anti-helmíntico em duas criações de ovinos. Nesse caso, o principal helminto envolvido foi *Haemonchus spp*.

O terceiro relato de resistência ao monepantel ocorreu na Holanda (VAN DEN BROM *et al.*, 2015) em uma criação de ovinos. Nesse país, o monepantel foi introduzido em 2011 e em 2014 essa propriedade já estava tendo problemas com cordeiros doentes e mortalidade de 131 animais após 10 dias do tratamento. Após teste de redução de ovos nas fezes foi observada eficácia de 0%, e, na coprocultura, 100% das larvas obtidas eram de *Haemonchus spp*.

Nos três trabalhos que pesquisaram e confirmaram resistência anti-helmíntica do monepantel em helmintos parasitas de animais a campo (SCOTT *et al.*, 2013; MEDEROS; RAMOS; BANCHERO, 2014; VAN DEN BROM *et al.*, 2015) não foram realizados estudos moleculares para melhor entendimento do mecanismo genético da resistência.

A resistência ao monepantel foi registrada em condições experimentais em *Caenorhabditis elegans* e *H. contortus*, antes da sua introdução em 2009. Foi induzida a resistência *in vitro* com exposição das larvas a subdosagens do medicamento e o mecanismo de ação proposto estava relacionado aos genes das subunidades do receptor nAChR. Assim, foi sugerido que mesmo que esse medicamento tenha demonstrado ser altamente efetivo, seria importante utilizá-lo de forma consciente e associado a outras medidas de controle para evitar o aparecimento da resistência (KAMINSKY *et al.*, 2008a).

Recentemente, o gene *mptl-1* foi examinado em isolados susceptíveis ou altamente resistentes ao monepantel e foi encontrada uma mutação muito frequente em larvas L3 resistentes: a retenção do íntron 15, levando à formação de um *stop codon* prematuro e à produção de uma proteína truncada. O sequenciamento do íntron 15 a partir do DNA genômico de larvas L3 mostrou poucos SNPs nos isolados susceptíveis. Já nos isolados resistentes, 66% dos parasitas também apresentaram poucos SNPs, e o restante apresentou, no mínimo, 17 SNPs. Além desta, outras mutações foram encontradas: exclusão dos éxons 4 e 12, deleção de 2 nucleotídeos na junção éxon 15 – éxon 16, um SNP no éxon 7 e uma deleção de um único nucleotídeo no éxon 7 (BAGNALL *et al.*, 2017).

Os estudos moleculares que objetivam entender melhor os mecanismos de aquisição da resistência anti-helmíntica são muito importantes, pois permitem a produção de drogas com novos alvos para o controle parasitário e identificação de marcadores moleculares para o monitoramento da resistência.

2.5. Epigenética

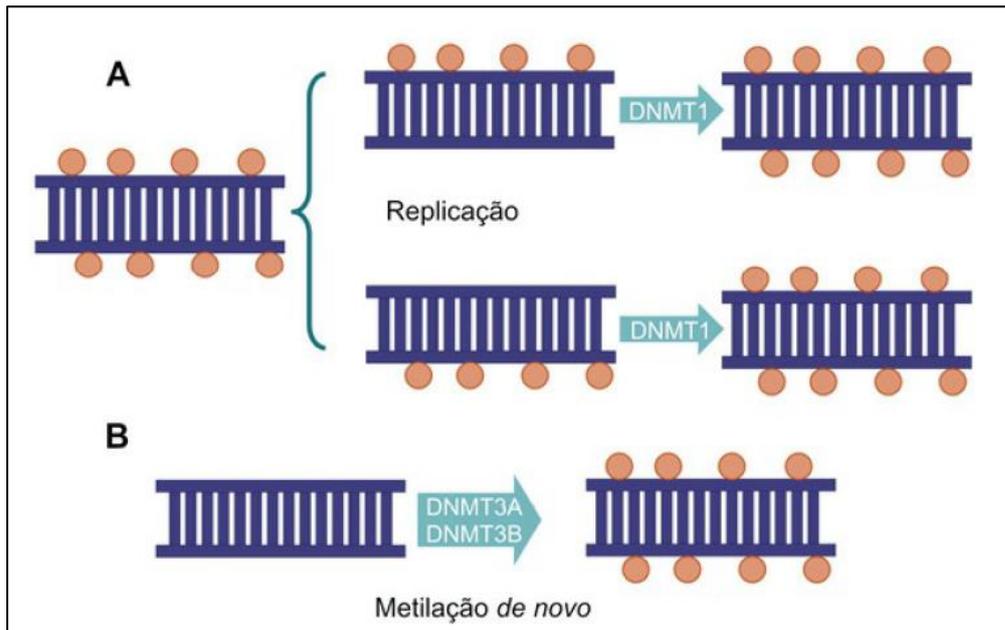
As modificações epigenéticas são responsáveis pelo controle da expressão dos genes e pela diferenciação celular e tecidual. O termo epigenética foi inicialmente utilizado por Conrad Waddington, em 1942, para descrever as interações de genes com o meio ambiente (TOST, 2008). Atualmente, a epigenética é definida como o

estudo de alterações estáveis, que produzem um fenótipo herdável, que influenciam a expressão gênica, mas que não são mediadas pela sequência de DNA (LIEB *et al.*, 2006; BERGER *et al.*, 2009; FINGERMAN *et al.*, 2013). A epigenética, apesar de estável e herdável, é modificável de maneira reversível e única a cada tipo celular (OHGANE; YAGI; SHIOTA, 2008). Assim, apesar de todas as células de um indivíduo possuírem a mesma informação genética, elas são capazes de se diferenciar e dar origem aos mais diversos órgãos e tecidos. Isso se deve às diferenças nos padrões de expressão gênica em cada linhagem celular regulado por fatores de transcrição específicos e pelo estabelecimento de marcas epigenéticas (REIK, 2007).

As modificações epigenéticas são classificadas em quatro grandes classes: conformação da cromatina e posicionamento dos nucleossomos; modificações do DNA (metilação de citosina); modificações pós-traducionais das histonas; e regulação gênica associada aos RNAs não-codificantes (ncRNAs) (FINGERMAN *et al.*, 2013).

A metilação do DNA participa na regulação da expressão gênica, no silenciamento de elementos repetitivos, na estabilidade cromossômica e como um sinal epigenético de memória transmitido durante a replicação do DNA (PAULSEN; TIERLING; WALTER, 2008; BLOMEN; BOONSTRA, 2011). A metilação ocorre pela adição, por ligação covalente, de um grupamento metil (-CH₃) na posição 5 do anel pirimídico de uma citosina, transformando-a em 5-metil-citosina (5mC), pela ação das metiltransferases de DNA (DNMTs): DNMT1 e 3 (Figura 4). Essas metiltransferases catalisam a transferência de um grupo metil de S-adenosil-L-metionina (SAM), um precursor de metil, para as citosinas em dinucleotídeos CpG. A DNMT 1 tem função de manutenção da metilação do DNA, realizando a adição do grupamento metil à citosinas presentes em fitas de DNA hemimetiladas (Figura 4A). A DNMT 3 apresenta função de metilação *de novo* do DNA, sendo responsável pela metilação da dupla-fita de DNA não metilada (Figura 4B). A metilação do DNA tem muitos papéis em vários processos celulares e, normalmente, resulta em silenciamento genético transcricional e inativação gênica (MATHEWS; JANUSEK, 2011; HARDY; TOLLEFSBOL, 2011; NICIURA, 2015).

Figura 4. Função das metiltransferases de DNA: DNMT 1 e DNMT 3.



Legenda: Em roxo está representado a fita-dupla de DNA e em círculos laranjas, os grupamentos metil. Em (A) está ilustrada a função da DNMT 1 de manutenção da metilação após a replicação do DNA e em (B), a função da DNMT3 de metilação *de novo*. Fonte: NICIURA, 2015.

A DNMT 2 foi assim denominada devido à sua clara homologia de sequência às metiltransferases de DNA. Porém, ela funciona como metiltransferase de RNA transportador (tRNA) e parece ter pouca função de metilação do DNA (GOLL *et al.*, 2006; PAULSEN; TIERLING; WALTER, 2008; JELTSCH *et al.*, 2016).

As modificações de histonas ocorrem tipicamente como modificações pós-traducionais na extremidade N-terminal das histonas. Essas modificações incluem acetilação, metilação, fosforilação, biotinilação e ubiquitinação, dentre outras, e são essenciais durante o desenvolvimento. As metiltransferases (HMTs), desmetilases (HDMs), acetiltransferases (HATs) e desacetilases (HDACs) de histonas são as enzimas que catalisam as principais modificações. As HMTs adicionam grupos metil aos resíduos de lisina e/ou arginina em histonas, e as HDMs removem esses grupos metil. Já as HATs catalisam a adição de grupos acetil para os resíduos de lisina de histonas, enquanto as HDACs são responsáveis pela remoção desses grupos. A metilação altera a hidrofobicidade e a basicidade do aminoácido sujeito a essa modificação. A metilação de lisina pode causar ativação ou repressão da transcrição, enquanto a metilação de arginina normalmente ativa a transcrição. Já a hiperacetilação das histonas resulta na ativação de genes normalmente reprimidos,

pois a carga positiva das lisinas fica neutralizada, o que leva ao “relaxamento” da ligação DNA-histona, permitindo o acesso da maquinaria de transcrição e favorecendo, assim, a expressão gênica. Além disso, a acetilação de lisinas propicia o recrutamento e a ligação de proteínas regulatórias. Ao contrário, a hipoacetilação resulta no silenciamento de genes (MATHEWS; JANUSEK, 2011; HARDY; TOLLEFSBOL, 2011; NICIURA, 2015).

Apesar de suposições sobre sua importância (BEECH *et al.*, 2011), ainda não há estudos em *H. contortus* que relatem associação da epigenética à resistência a anti-helmínticos.

2.5.1. Epigenética em nematoides

A ausência de metilação do DNA já foi reportada em *C. elegans* e outros nove nematoides (GAO *et al.*, 2012; PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2014). Dessa forma, assumia-se a inexistência dessa modificação nesse grupo de organismos. Entretanto, foi confirmada a ocorrência desse mecanismo epigenético nos nematoides *Trichinella spiralis* (GAO *et al.*, 2012) e *Heterodera schachtii* (HEWEZI *et al.*, 2017). Isso tornou interessante a investigação da ocorrência de metilação do DNA em *H. contortus*, o que irá permitir avanços no conhecimento para posterior elucidação de sua participação no mecanismo de desenvolvimento de resistência anti-helmíntica no parasita.

Diferentemente, já foi relatada a ocorrência de modificações de histonas em alguns nematoides, como em *C. elegans* (KISHIMOTO; UNO; NISHIDA, 2018; TABUCHI *et al.*, 2018; WEINHOUSE *et al.*, 2018), *Meloidogyne incognita* (PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2014) e *Pristionchus pacificus* (SOMMER *et al.*, 2017; WERNER *et al.*, 2018).

O avanço no conhecimento de eventos epigenéticos de parasitas permite que tais mecanismos tornem-se alvos de novas drogas para o controle parasitário, assim como está sendo feito para a esquistossomose (PIERCE *et al.*, 2012; GUIDI *et al.*, 2018; PADALINO *et al.*, 2018), a malária (DIEDRICH *et al.*, 2018; BOUCHUT *et al.*, 2019) e a tripanossomíase americana ou doença de Chagas (CAMPO, 2016; ZUMA; DE SOUZA, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo central

O objetivo principal foi investigar os eventos epigenéticos em *Haemonchus contortus* envolvidos no controle do desenvolvimento do parasita assim como no estabelecimento da resistência ao anti-helmíntico monepantel.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar *in silico* a ocorrência de metilação de DNA e de modificações de histonas em *H. contortus*;
- Determinar por ELISA alterações no perfil global de modificações de histonas em larvas L3 de *H. contortus*;
- Analisar a expressão de genes envolvidos na maquinaria epigenética em *H. contortus* em diferentes estágios do desenvolvimento (ovos, larvas L3 e adultos);
- Comparar a expressão de genes envolvidos na maquinaria epigenética em *H. contortus* machos e fêmeas adultos;
- Analisar a expressão de genes envolvidos na maquinaria epigenética em larvas L3 de *H. contortus* com fenótipos extremos de resistência ao monepantel (sensível e resistente);
- Caracterizar os isolados resistentes de *H. contortus* quanto à retenção do íntron 15 e à exclusão do éxon 12 no processamento do mRNA do gene *mptl1*;
- Analisar a expressão do gene *mptl1* em larvas L3 de *H. contortus* com fenótipos extremos de resistência ao monepantel (sensível e resistente).

4. METODOLOGIA

4.1. Investigações *in silico* de ocorrência de metilação do DNA e de modificações de histonas em *Haemonchus contortus*

4.1.1. Análise da razão CpG observada/esperada ($GpG_{o/e}$) no transcriptoma de *Haemonchus contortus*

Foi determinada a distribuição da razão CpG observada/esperada ($CpG_{o/e}$) no transcriptoma de *H. contortus* para inferir o padrão de metilação do DNA de seu genoma. Essa análise da razão $CpG_{o/e}$ é amplamente utilizada para medir indiretamente o grau de metilação do DNA durante a evolução (SAXONOV; BERG; BRUTLAG, 2006; SUZUKI *et al.*, 2007; WEBER *et al.*, 2007; ELANGO *et al.*, 2009; GAVERY; ROBERTS, 2010; GLASTAD *et al.*, 2011; FNEICH *et al.*, 2013; PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2014). Ela é baseada no princípio de que as citosinas metiladas sofrem desaminação espontânea em timinas, o que leva à depleção gradual dos dinucleotídeos CpG ao longo do tempo (BIRD, 1980). Dessa forma, na observação em gráfico da distribuição das razões $CpG_{o/e}$ de sequências analisadas, espécies que possuem genomas metilados apresentam distribuição bimodal, ou seja, dois picos: um pico com sequências de baixa razão $CpG_{o/e}$, que corresponde a regiões hipermetiladas; e um pico com sequências com alta razão $CpG_{o/e}$, indicando as regiões hipometiladas. Por outro lado, espécies com genomas não-metilados apresentam pico único, ou unimodal, da razão $CpG_{o/e}$ (ELANGO *et al.*, 2009). Na literatura (GAVERY; ROBERTS, 2010; GLASTAD, *et al.*, 2011; FNEICH *et al.*, 2013; PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2014), essa análise da distribuição $CpG_{o/e}$ já foi utilizada para a predição, posteriormente confirmada com evidências experimentais, da ocorrência de metilação do DNA no genoma de diversas espécies. Como exemplos, pode-se citar *C. elegans* (PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2014), *Meloidogyne incognita* (PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2014) e *Drosophila melanogaster* (GLASTAD, *et al.*, 2011; PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2014) que possuem genomas não metilados e conteúdo CpG unimodal normal; e *Apis mellifera* (ELANGO *et al.*, 2009; GLASTAD, *et al.*, 2011, PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2014),

Biomphalaria glabrata (FNEICH *et al.*, 2013) e *Crassostrea gigas* (GAVERY; ROBERTS, 2010), que possuem genomas metilados e conteúdo CpG bimodal.

Para tanto, no banco público de *expressed sequenced tags* (EST) do NCBI (NCBI-dbEST) para *H. contortus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/?term=haemonchus+contortus>), foram identificadas as ESTs do parasita que, em seguida, foram filtradas para as sequências com tamanho ≥ 500 pb (500:5000[Sequence Length]; [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/?term=\(Haemonchus+contortus%5BOrganism%5D\)+AND+500%3A5000%5BSequence+Length%5D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/?term=(Haemonchus+contortus%5BOrganism%5D)+AND+500%3A5000%5BSequence+Length%5D)). A razão CpG_{o/e} nessas sequências foi determinada no CpG Island Promoter Detection (CpGProD; <http://doua.prabi.fr/software/cpgprod>). Para sequências maiores de 1.000 pb, o cálculo da razão CpG_{o/e} foi feito no Sequence Manipulation Suite (http://www.bioinformatics.org/sms2/cpg_islands.html), no EMBOSS Newcpgreport (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_newcpgreport/) e por meio da fórmula descrita por Shimizu, Takahashi e Tomita (1996) na Equação 1.

Equação 1:

$$CpG_{o/e} = \frac{\text{Número de CpG}}{\text{Número de C} \times \text{Número de G}} \times \frac{W^2}{W-1}, \text{ sendo } W \text{ o número de nucleotídeos}$$

A distribuição das razões CpG_{o/e} no transcriptoma de *H. contortus* foram analisadas no SAS por meio dos testes de normalidade de Kolmogorov –Smirnov (K-S).

É importante destacar que essa metodologia foi baseada na literatura (GAVERY; ROBERTS, 2010; FNEICH *et al.*, 2013; PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2014), em que o uso de ESTs, naquele momento, justificava-se pela maior confiança na qualidade dos dados de sequenciamento desse tipo de sequência em comparação à qualidade do sequenciamento de todo o genoma. Atualmente, o sequenciamento apresenta maior rendimento, precisão e profundidade e, portanto, futuros estudos devem ser realizados para validar essa abordagem a partir da observação da distribuição CpG_{o/e} no genoma e não somente nas ESTs, separando as sequências segundo sua anotação (regiões intergênicas, regiões 5' e 3' e genes).

4.1.2. Busca por proteínas com potencial função de metilação do DNA e de modificação de histonas em *Haemonchus contortus*

A busca por proteínas com potencial função de metilação do DNA e de modificação de histonas em *H. contortus* foi feita de duas formas. Inicialmente, foram realizadas buscas no banco de dados UniProt pelas palavras-chave: “DNMT1”, “DNMT2”, “DNMT3”, “HMT”, “HDM”, “HAT” e “HDAC” para *H. contortus*, com o objetivo de identificar sequências já anotadas para o parasita. Posteriormente, foram buscadas proteínas em *H. contortus* ortólogas às enzimas DNMT1, 2 e 3 e modificadoras de histonas (HMTs, HDMs, HATs e HDACs) de outros organismos por meio de BLAST recíproco (BLASTp), considerando os critérios descritos por Gao *et al.* (2012) e Perfus-Barbeoch *et al.* (2014) de $E\text{-value} < 10^{-5}$ e, no mínimo, 30% de alinhamento. Isso visou à identificação de outras potenciais sequências que ainda não estavam anotadas para *H. contortus*.

4.2. Procedimentos parasitológicos

4.2.1. Caracterização dos isolados de *Haemonchus contortus* utilizados nas análises

As análises moleculares realizadas neste trabalho envolveram a obtenção de *H. contortus* em três estágios do ciclo de vida (ovos, larvas L3 e adultos) e de larvas L3 com fenótipo extremo de susceptibilidade ao anti-helmíntico monepantel (sensíveis e resistentes). Os isolados de *H. contortus* utilizados para a infecção artificial dos ovinos do rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste, permitindo a recuperação dos ovos e larvas L3 utilizados neste trabalho, estão descritos neste tópico. Já os parasitas adultos foram obtidos a partir de ovinos abatidos em frigorífico comercial e não foi possível obter informações sobre o histórico de vermifugação desses hospedeiros.

4.2.1.1. Isolados sensíveis ao monepantel

Um dos isolados de *H. contortus* analisado foi o Embrapa2010 (CHAGAS *et al.*, 2013), originalmente coletado no rebanho ovino da Embrapa Pecuária Sudeste, mantido desde 2006 e isolado em 2010. É caracterizado como resistente ao benzimidazol (20% de eficácia), à ivermectina (52%), à moxidectina (85%) e ao levamisol (93%) e susceptível ao closantel (100%) e ao monepantel (100%). Esse isolado está registrado no *Consortium for Anthelmintic Resistance and Susceptibility* (CARS).

Outro isolado analisado foi Echevarria, com origem no estado do Rio Grande do Sul, susceptível a todos os anti-helmínticos (ECHEVARRIA; ARMOUR; DUNCAN, 1991).

4.2.1.2. Isolados resistentes ao monepantel

Um isolado de *H. contortus* resistente ao monepantel utilizado nas análises foi o Botucatu (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017). Esse isolado foi obtido a campo e cedido pelo Prof. Dr. Alessandro Amarante da UNESP de Botucatu.

Além disso, devido a outro experimento realizado por nosso grupo de estudo (NICIURA *et al.*, 2018), cujo objetivo era induzir a resistência ao monepantel através do cruzamento entre parasitas com fenótipos extremos de resistência (REDMAN *et al.*, 2012), foi realizado o intercruzamento entre o isolado sensível Embrapa2010 (CHAGAS *et al.*, 2013) e o isolado resistente Botucatu (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017). Na terceira geração de descendentes desse cruzamento, foram recuperados parasitas resistentes ao monepantel que também foram utilizados nos ensaios moleculares realizados no presente estudo.

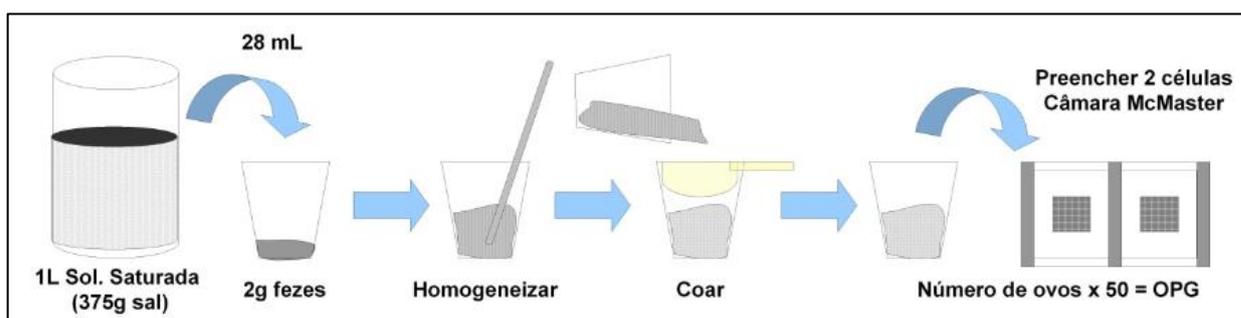
4.2.2. Infecção artificial e contagem de ovos por grama de fezes (OPG)

Para recuperação de ovos e de larvas no estágio L3, foi necessária a infecção artificial de ovinos hospedeiros, provenientes do rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste, com os isolados descritos na seção 4.2.1. Antes do início dos experimentos, o projeto foi submetido à avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Pecuária Sudeste (protocolos no. 06/2015 e

03/2017 - ANEXO 1), e os ovinos hospedeiros utilizados foram monitorados pelo Médico Veterinário responsável técnico pelo rebanho.

A infecção artificial foi realizada oralmente com, aproximadamente, 4.000 larvas infectantes (L3) de *H. contortus*. Para acompanhar o processo de infecção experimental e constatar o estabelecimento da infecção, foi realizada a contagem de ovos por grama de fezes (exame de OPG) (UENO; GONÇALVES, 1998). Esse exame (Figura 5) consiste na maceração de 2 gramas de fezes (coletadas diretamente da ampola retal dos ovinos) em 28 mL de solução saturada de cloreto de sódio e avaliação em Câmara McMaster. O OPG foi obtido pela multiplicação do número total de ovos de estrongilídeos por 50.

Figura 5. Exame de contagem de ovos por grama de fezes (OPG).



Fonte: MOLENTO; NICIURA; CHAGAS, 2011, p. 120.

4.2.3. Coleta de *Haemonchus contortus* nos estágios de ovos, larvas infectantes (L3) e adultos

4.2.3.1. Recuperação e quantificação de ovos

Para a recuperação de ovos de *H. contortus*, fezes dos ovinos foram coletadas diretamente da ampola retal ou utilizando bolsas coletoras. As fezes recuperadas foram maceradas, umedecidas com água morna (~40°C) e filtradas em quatro peneiras consecutivas de malha de 1 mm, 105 µm, 55 µm e 25 µm. Os ovos ficaram retidos na última peneira (de 25 µm) e foram lavados com água destilada, com auxílio de uma pisseta. A seguir, foram transferidos para tubos de 50 mL, centrifugados a 1.100 xg por 5 minutos e, após descarte do sobrenadante, foi adicionada solução salina saturada para a suspensão dos ovos. Foram realizados vários ciclos de centrifugação seguidos de recuperação do sobrenadante, até que a

suspensão ficou limpa. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi despejado na peneira de 25 μm , e os ovos foram lavados com água destilada e transferidos para um béquer. A seguir, os ovos foram quantificados em microscópio óptico (Figura 6), por meio da contagem do número de ovos presentes em 10 alíquotas de 10 μL da suspensão. O volume contendo cerca de 30.000 ovos foi transferido para um cálice de decantação, no qual ficaram por cerca de 30 minutos à temperatura ambiente (até 22°C). Os ovos decantados foram coletados e transferidos para criotubos (em *pools* de 30.000 ovos), imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o procedimento de extração de RNA.

Figura 6. Ovos de *Haemonchus contortus* após a recuperação vistos por microscópio (aumento 100x).

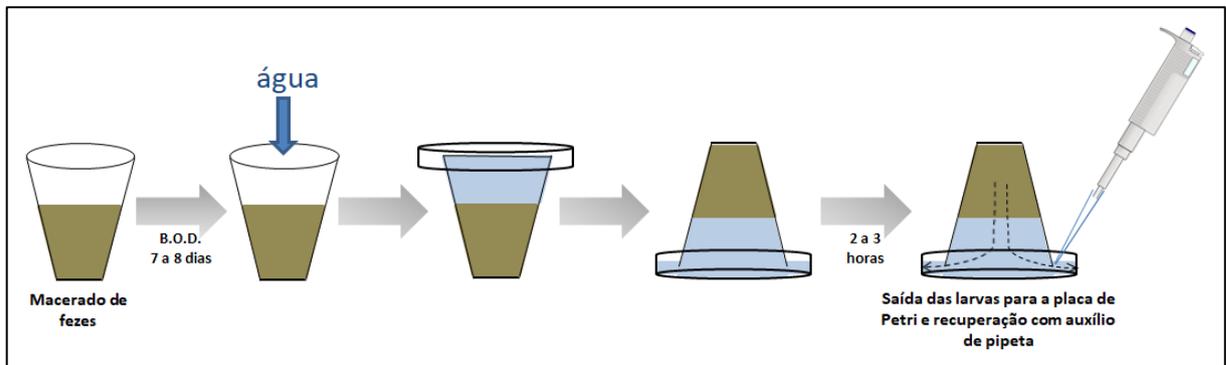


Fonte: Autor.

4.2.3.2. Recuperação e quantificação de larvas infectantes (L3)

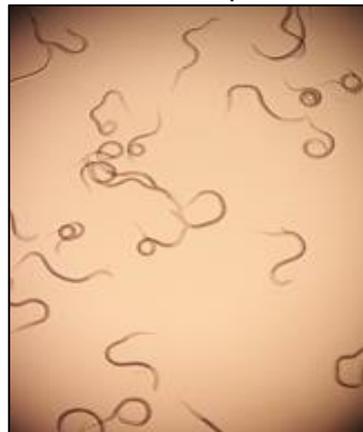
Para a recuperação de larvas infectantes (L3) de *H. contortus*, foi realizada a coprocultura (ROBERTS; O'SULLIVAN, 1950). Esse procedimento (Figura 7) consiste no cultivo das fezes de ovinos por 7 a 8 dias em estufa BOD a 27°C, para que os ovos eclodam e as larvas se desenvolvam do primeiro ao terceiro estágio larval. As larvas L3 foram coletadas em água, quantificadas em microscópio óptico (Figura 8), pelo mesmo procedimento realizado para a quantificação de ovos, e coletadas em *pools* de 30.000 em criotubos. Esses tubos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até os procedimentos de extração de RNA ou de histonas.

Figura 7. Coprocultura para recuperação de larvas infectantes (L3) de *Haemonchus contortus*.



Legenda: Em marrom, as fezes de ovinos; em azul, água; em pontilhado preto, o fluxo das larvas (para o exterior do copo). Fonte: Autor.

Figura 8. Larvas no estágio infectante (L3) de *Haemonchus contortus* recuperadas após 7 a 8 dias de coprocultura vistas por microscópio (aumento 100x).

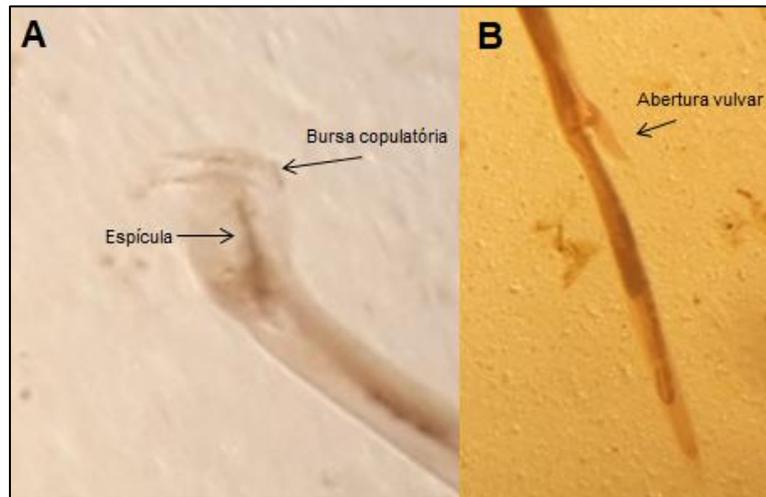


Fonte: Autor.

4.2.3.3. Recuperação e sexagem de adultos

Parasitas adultos foram coletados do abomaso de ovinos após óbito ou abate. Para a necropsia parasitológica (MOLENTO; NICIURA; CHAGAS, 2011), a cavidade abdominal do ovino foi aberta com cuidado, as extremidades do abomaso foram amarradas, e esse órgão foi retirado, acondicionado em saco plástico e enviado ao laboratório para processamento imediato. O abomaso foi aberto na sua curvatura maior, o conteúdo foi disposto em um balde e lavado em água corrente com baixa pressão. A seguir, o conteúdo foi transferido para uma bandeja com água morna para a recuperação dos espécimes com auxílio de pincel ou espátula. Os adultos foram, então, separados entre machos e fêmeas (Figura 9) com o auxílio de uma lupa.

Figura 9. Parasitas adultos macho e fêmea de *Haemonchus contortus* vistos por lupa (aumento 30x).



Legenda: Em (A) está sendo mostrada a bursa copulatória e as espículas de *H. contortus* macho e em (B), a abertura vulvar da fêmea. Fonte: Autor.

Para que não fossem extraídas biomoléculas de ovos contidos no útero das fêmeas adultas, essas foram cortadas ao meio, e a extremidade contendo o útero foi descartada. Esses parasitas foram coletados em *pools* de 15, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até os procedimentos de extração de RNA ou de histonas.

4.3. Procedimentos laboratoriais

4.3.1. Investigação molecular de ocorrência de modificações de histonas em *Haemonchus contortus*

4.3.1.1. Extração, quantificação e eletroforese de proteínas

Extração de proteínas

Para extração das histonas (SHECHTER *et al.*, 2007), a partir de *H. contortus* nos estágios de L3 e adultos, foi realizada maceração em nitrogênio líquido, até que

fossem reduzidos a pó (WANG *et al.*, 2016). O macerado foi recuperado com 1 mL de tampão de lise hipotônico, que consistia em Tris-HCl pH 8,0 a 10mM, KCl a 1mM, MgCl₂ a 1,5 mM, DTT a 1 mM e inibidores de proteases (AEBSF a 2mM, aprotinina a 0,3 μM, bestatina a 130 μM, EDTA a 1 mM, E-64 a 14 μM e leupeptina a 1 μM - SIGMAFAST™ *Protease Inhibitor Tablets* da Sigma-Aldrich®, Cat. S8820), fosfatases (*Phosphatase Inhibitor Cocktail 1* e *2* da Sigma-Aldrich®, Cat. P2850 e P5726, respectivamente) e desacetilases (butirato de sódio a 10 mM da Sigma-Aldrich®, Cat. B5887), e incubado a 4°C com agitação por 30 minutos. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C, para precipitação de núcleo celular. O sobrenadante foi descartado totalmente e o precipitado foi ressuspenso em 400 μL de H₂SO₄ a 0,4 N. Essa solução foi agitada até que não restassem aglomerados e incubada a 4°C com agitação por 2 horas. A solução foi centrifugada a 16.000 xg por 10 minutos a 4°C, para precipitação dos resíduos nucleares, e o sobrenadante foi recuperado e transferido para novo tubo, ao qual foram adicionados 132 μL de ácido tricloroacético (TCA) 100%, gota a gota. A homogeneização foi feita por inversão do tubo e a solução tornou-se leitosa, o que indicou a presença de histonas. Após homogeneização, a solução foi incubada em gelo por 30 minutos, seguida de centrifugação a 16.000 xg por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado com cuidado. O precipitado, contendo histonas, foi lavado duas vezes com acetona gelada e por fim, ficou incubado em temperatura ambiente até a secagem. A eluição foi feita com água *Milli-Q* autoclavada.

As histonas de larvas no estágio L3 (amostra A1) foram extraídas a partir de um *pool* de 60.000 indivíduos resistentes ao monepantel, recuperadas a partir de dois ovinos diferentes, e de 60.000 sensíveis ao monepantel, recuperadas a partir de dois ovinos diferentes, totalizando 120.000 larvas. Já as histonas de adultos (amostra A2) foram extraídas a partir de um *pool* de 15 machos e 15 fêmeas, totalizando 30 parasitas.

Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), cujo princípio é de que o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* é vermelho em meio ácido, verde em meio neutro e azul em meio básico. O reagente de Bradford utilizado para a quantificação é uma solução ácida de

Coomassie Blue, que está, portanto, na forma vermelha. Quando em contato com proteínas, o Coomassie Blue liga-se a elas de forma estável e torna-se azul. Essa alteração da cor vermelha para azul é medida por espectrofotômetro. Na ausência de proteínas, o corante é vermelho e a absorvância máxima é de 470 nm, e na presença de proteínas, o corante é azul e a absorvância máxima é de 595 nm.

Para a quantificação, foram adicionados 159 µL de água, 40 µL do reagente de Bradford (Bio-Rad®, Cat. 5000006) e 1 µL de amostra em cada poço de uma placa de 96 poços. Ao branco foram adicionados 160 µL de água e 40 µL do reagente de Bradford. Amostras e controles foram quantificados em triplicata. A placa foi submetida à leitura da absorvância em espectrofotômetro *iMark™ Microplate Absorbance Reader*, e a concentração foi calculada a partir da curva padrão construída previamente (Equação 2) utilizando albumina sérica bovina (BSA), no *software* MPM6 (Bio-Rad®).

Equação 2:

$Y = 0,2 (\pm 0,002) \times X + 0,026 (\pm 0,002)$, sendo **Y**=absorvância e **X**=concentração.

A Equação 2 acima apresenta R² igual a 0,998.

Eletroforese de proteínas

Para a eletroforese de proteínas, com intuito de verificação de integridade, as amostras proteicas foram preparadas com tampão laemmli, composto por glicerol, dodecil sulfato de sódio (SDS) e azul de bromofenol. O glicerol atua deixando as proteínas pesadas, de forma que não vazem do poço durante a aplicação no gel; o SDS confere carga negativa às proteínas; e o azul de bromofenol permite a visualização das amostras durante a eletroforese. No momento do uso, foi adicionado DTT que é o um agente redutor de ligações dissulfeto.

As amostras foram incubadas a 100°C por 5 minutos para desnaturação e submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 15%. No primeiro poço foi colocado o marcador *Precision Plus Protein™ Standards Dual Color* (Bio-Rad®). No segundo poço foram colocados 8 µg de extrato de histonas de uma amostra teste (amostra ATeste) (histonas extraídas a partir de 110.000 larvas L3 de *H. contortus*). No terceiro poço foram colocados 3 µg de proteínas do extrato de histonas da amostra

A1 (120.000 larvas L3 de *H. contortus*). O extrato de histonas da amostra A2 não foi submetido à eletroforese, pois havia pouca quantidade de material. Devido à pequena quantidade de proteínas, o gel foi corado com nitrato de prata.

4.3.1.2. ELISA de modificações de histona H3

O *EpiQuik Histone H3 Modification Multiplex Assay Kit* (Epigentek, Cat. P-3100-96) foi utilizado para detectar e quantificar até 21 padrões modificados de histona H3, mostrados na Figura 10. Essa figura fornece a informação de qual anticorpo específico para cada uma das modificações de histona H3 reveste cada um dos poços da placa.

Figura 10. Disposição de cada anticorpo específico para cada uma das modificações de histona H3 na placa do *Epiquik™ Histone H3 Modification Multiplex Assay Kit (Colorimetric)* (Epigentek).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Assay control 5 ng	Blank	H3K4me2	H3K9me1	H3K9me3	H3K27me2	H3K36me1	H3K36me3	H3K79me2	H3K9ac	H3K18ac	H3ser10P
B	Assay control 5 ng	Blank	H3K4me2	H3K9me1	H3K9me3	H3K27me2	H3K36me1	H3K36me3	H3K79me2	H3K9ac	H3K18ac	H3ser10P
C	Assay control 25 ng	Blank	H3K4me2	H3K9me1	H3K9me3	H3K27me2	H3K36me1	H3K36me3	H3K79me2	H3K9ac	H3K18ac	H3ser10P
D	Assay control 25 ng	Blank	H3K4me2	H3K9me1	H3K9me3	H3K27me2	H3K36me1	H3K36me3	H3K79me2	H3K9ac	H3K18ac	H3ser10P
E	Total H3	H3K4me1	H3K4me3	H3K9me2	H3K27me1	H3K27me3	H3K36me2	H3K79me1	H3K79me3	H3K14ac	H3K56ac	H3ser28P
F	Total H3	H3K4me1	H3K4me3	H3K9me2	H3K27me1	H3K27me3	H3K36me2	H3K79me1	H3K79me3	H3K14ac	H3K56ac	H3ser28P
G	Total H3	H3K4me1	H3K4me3	H3K9me2	H3K27me1	H3K27me3	H3K36me2	H3K79me1	H3K79me3	H3K14ac	H3K56ac	H3ser28P
H	Total H3	H3K4me1	H3K4me3	H3K9me2	H3K27me1	H3K27me3	H3K36me2	H3K79me1	H3K79me3	H3K14ac	H3K56ac	H3ser28P

Fonte: Protocolo fornecido pelo fabricante Epigentek.

Controles positivos (soluções controle fornecidas pelo fabricante; poços A1, B1, C1 e D1 da Figura 10) e brancos (aos quais não foi adicionado extrato de histonas nem solução controle; poços A2, B2, C2 e D2 da Figura 10) foram incluídos na placa. No restante dos poços foram adicionados os extratos de histonas na concentração de 100 ng/μL, em duplicata. Após ligação específica das histonas H3 modificadas ao anticorpo fixado no poço correspondente, a placa foi lavada com *Wash Buffer* 1x e foi adicionado o anticorpo de detecção (*Detection Antibody*). Esse anticorpo conjugado à uma enzima, liga-se inespecificamente às histonas fixadas

nos poços pelo primeiro anticorpo. Posteriormente, foi realizada nova lavagem e foi adicionado um reagente de desenvolvimento de cor (*Developer Solution*), que, na presença da enzima conjugada ao anticorpo de detecção, fica azul. Após 4 minutos, foi adicionada a solução *Stop Solution*, que interrompe a reação enzimática, alterando a cor da solução para amarelo. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 450nm no espectrofotômetro *Model 550 Microplate Reader* (Bio-Rad®).

Devido à baixa quantidade e ausência de verificação de integridade da amostra do grupo de *H. contortus* adultos (A2), os resultados obtidos para essa amostra foram desconsiderados.

Análise dos resultados

A quantidade de histona modificada é proporcional à intensidade de absorbância e foi calculada segundo a Equação 3, fornecida pelo fabricante.

Equação 3:

$$\begin{array}{l} \text{Quantidade de modificação de H3} \\ \text{ou quantidade total de H3} \\ \text{(ng/}\mu\text{g de proteína)} \end{array} = \frac{(OD_{\text{amostra}} - OD_{\text{branco}}) / S}{OD_{\text{controle positivo}} - OD_{\text{branco}} / P} \times 1000,$$

sendo **S** a quantidade de proteína da amostra em ng (no caso, 100 ng) e **P** a quantidade de proteína do controle positivo (foi considerado o controle positivo com maior concentração de proteína).

A porcentagem de cada modificação de H3 foi calculada pela Equação 4, também fornecida pelo fabricante, utilizando os resultados obtidos a partir da Equação 3.

Equação 4:

$$\% \text{ de Modificação H3} = \frac{\text{quantidade de modificação de H3}}{\text{quantidade total de H3}} \times 100$$

Os dados obtidos foram apresentados na forma de gráficos de barras com média \pm desvio padrão. Foram desconsiderados os dados com alto desvio padrão ($SD > 0,15$).

4.3.2. Expressão de genes relacionados à maquinaria epigenética e à resistência ao monepantel em *Haemonchus contortus*

4.3.2.1. Extração, quantificação e eletroforese de RNA

Extração de RNA

Para extração de RNA, a partir de *H. contortus* nos estágios de ovos, L3 (sensíveis e resistentes ao monepantel) e adultos (machos e fêmeas), foi realizada maceração em reagente Trizol (Invitrogen, Cat. 10296010) utilizando o *Tissue Ruptor II* (Qiagen®, Cat. 9002710). Após incubação por 5 minutos em temperatura ambiente (20°C), foram adicionados 200 μ L de clorofórmio 99,8% (Neon, Cat. 02613). A solução foi homogeneizada em *vortex* e incubada à temperatura ambiente por 2 a 3 minutos, seguida de centrifugação a 12.000 xg a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante, ou fase superior, foi recuperado em duplicata de 250 μ L (resultando em 500 μ L no total), e o RNA foi purificado utilizando *RNeasy Mini kit* (Qiagen®, Cat. 74106). A esses 250 μ L de sobrenadante foram adicionados 350 μ L de tampão RLT, homogeneizando-se por inversão do tubo. A essa solução foram adicionados 625 μ L de etanol absoluto (Merk Millipore, Cat. 100983), e os tubos foram novamente invertidos para homogeneização. Posteriormente, 612,5 μ L dessa solução foram transferidos para uma coluna de sílica e submetidos à centrifugação a 11.710 xg por 20 segundos a 4°C. Esse procedimento foi repetido quatro vezes, para que todo o conteúdo da solução (2450 μ L) passasse pela coluna de sílica. A seguir, foram adicionados 500 μ L de tampão RPE à coluna, que, a seguir, foi submetida à centrifugação a 11.710 xg por 20 segundos a 4°C. Esse passo foi repetido uma vez, e o tubo coletor da coluna foi trocado. Foi realizada nova centrifugação a 11.710 xg a 4°C, agora por 2 minutos, para que a coluna secasse bem. A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e foram adicionados 50 μ L de água à coluna de sílica.

Com uma centrifugação a 11.710 xg por 1 minuto a 4°C, o RNA que estava retido na coluna foi eluído para o fundo do microtubo. O RNA extraído foi armazenado a -80°C.

Quantificação de RNA

A quantificação de RNA foi realizada em NanoDrop® (Thermo Scientific), que também permitiu a avaliação da pureza desse ácido nucleico pelo fornecimento das razões de absorvância 260/280 e 260/230, sendo que a primeira deve se aproximar de 2,0 e a segunda pode variar de 1,8 a 2,2.

Eletroforese de RNA

A eletroforese de RNA foi feita para verificação da integridade das amostras. Foram aplicados cerca de 500 ng de RNA de cada amostra, e essas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose de 1,0 a 2,0% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) corado com brometo de etídio (0,1 µg/mL no gel), a 100V por 40 minutos. O gel foi visualizado em transiluminador UV utilizando o *software* ImageLab e documentado em fotodocumentador Gel Doc™XR (Bio-Rad®).

4.3.2.2. Tratamento do RNA com DNase

Todas as amostras de extrato de RNA foram tratadas com DNase 1 (Sigma-Aldrich®, Cat. AMPD1) para que não houvesse detecção de DNA genômico (gDNA) no ensaio de PCR em tempo real. Em um microtubo de 0,2 mL livre de RNase, foram adicionados 8 µL de RNA puro, na concentração obtida pelo procedimento de extração do RNA (com exceção das amostras que apresentavam mais de 600 ng/µL, que foram submetidas à diluição 1:2), 1 µL de 10X *Reaction Buffer* e 1 µL de DNase 1 (1 unidade/µL). Após homogeneização, essa solução foi incubada em temperatura ambiente (23°C) e após 15 minutos, foi adicionado 1 µL de *Stop Solution*, para inativação da DNase. Essa solução foi incubada a 70°C por 10 minutos em termociclador *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad®) para desnaturação tanto da DNase quanto de estruturas secundárias do RNA. Assim, o RNA pôde ser usado imediatamente para o procedimento de síntese do DNA complementar (cDNA).

Para verificar se houve degradação de todo o DNA genômico carregado nas amostras, foi realizado o teste “*RT minus*” que consiste em submeter 2 µL do RNA tratado com DNase ao ensaio de qPCR para um dos genes de referência desse estudo.

4.3.2.3. Síntese do DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado pelo procedimento de transcrição reversa, utilizando *SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen®, 18080-400). Em microtubos de 0,2 mL foram transferidos 6 µL do RNA tratado com DNase e adicionados 1 µL de *Annealing Buffer* e 1 µL de oligo(dT)₂₀ *primers*, que se alinham à extremidade poli(A) do RNA mensageiro (mRNA). Essa solução foi incubada a 65°C por 5 minutos no termociclador *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad®) e depois incubada em gelo por 3 minutos. Posteriormente, foram adicionados a cada tubo 10 µL de *2X First-Strand Reaction Mix* e 2 µL da *SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix*. Após homogeneização e breve centrifugação, as amostras foram colocadas no termociclador *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad®), onde foram incubadas a 50°C por 50 minutos, para que ocorresse a transcrição reversa, e depois a 85°C por 5 minutos, para inativação da enzima. As amostras de cDNA foram resfriadas em gelo e posteriormente armazenadas a -20°C.

4.3.2.4. PCR quantitativa após transcrição reversa (RT-qPCR *two steps*)

Delineamento de *primers*

Os *primers* foram delineados no programa Primer3 – v.0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) e analisados pelos programas Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimerServlet>) e Oligoanalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) para verificação das condições de formação de estruturas secundárias como *hairpins* e dímeros. Para verificar a especificidade dos *primers*, as sequências foram submetidas a alinhamento pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Foram selecionados 5 genes-alvo e 4 genes de referência (Tabela 2), que foram sintetizados pela Exxtend (Paulínia – SP). Esses oligos foram diluídos em Tampão Tris-EDTA (TE) (Invitrogen, Cat. 12090–015), que mantém o pH da solução constante (pH 8,0) e protege os oligos da digestão por nucleases.

Tabela 2. Informações sobre os genes e seus *primers* correspondentes, escolhidos para os ensaios de RT-qPCR.

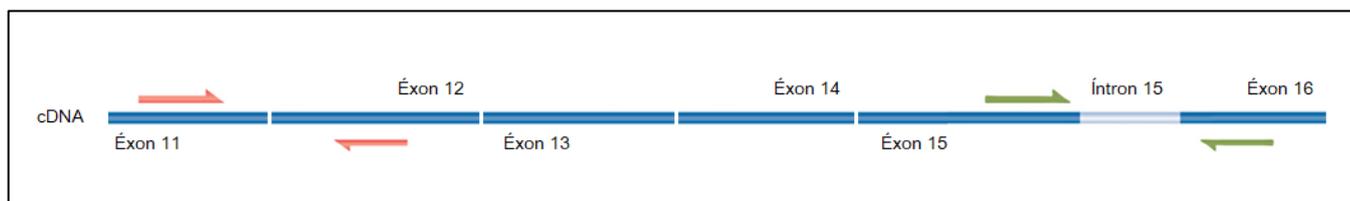
Gene (ID)	Nome da proteína (ID)	Justificativa de escolha	Nome do par de primer	Sequência do par de primer	Localização	Tamanho do fragmento de amplificação	
Genes alvo	<i>mptl1/acr-23H</i>	Acetylcholine receptor monepantel-1 (ACO48329.1)	MPTL1-E12	F: TGGTATCCGATAAAATGCCTTC R: AACCATTTGAAGCTGCTAATGTC	Éxon 11 Éxon 12	110	
	<i>mptl1/acr-23H</i>	Acetylcholine receptor monepantel-1 (ACO48329.1)	MPTL1-I15	F: CAAGTGCCGAAGAAGAGTTGC R: GACGAGTTATCCTCATCCGACA	Éxon 15 Éxon 16	113	
	HCON_00060880	Transcription factor jumonji domain containing protein (CDJ92265.1)	TFJM	F: CTCACCACGCTTTGAAAGACTC R: AGTGACGGAAGGACCATAAAGC	Éxon 7 Éxon 8	102	
	HCON_00088930	Histone-lysine Methyltransferase SETMAR (CDJ86632.1)	HMT	F: CAAACTCGGTCACAGCGTAAAG R: ACCTCCACGGAACCTTTGATAC	Éxon 1 Éxon 1	112	
	HCOI_01766700*	DNA methylase domain containing protein (CDJ94056.1)	Ortólogo a C-5 cytosine-specific DNA methylase de vários organismos	DNMT	F: GGATGCACTACGCTCTGAAAGA R: GCGTATTCGGAAAGTTGTAGGC	Éxon 1 / Éxon 2	108
Genes de referência	<i>gpd</i> (HCOI_01760600*)	Glyceraldehyde-3P-dehydrogenase (CDJ92718.1)	Referência, segundo LECOVÁ <i>et al.</i> (2015)	GPD	F: GACTCCACTCATGGTCGTTTCA R: GTCTTTGCTGTTGTGGACCTTG	Éxon 20 Éxon 20 / Éxon 21	111
	<i>gpi</i> (HCOI_00551200*)	Glucose-phosphate isomerase (CDJ95735.1)	Referência, segundo RUFENER <i>et al.</i> (2009)	GPI	F: TTGAAGGGAACCGTCCTACAAC R: CTCCCCACTGGTCATAGCTGTT	Éxon 13 Éxon 13 / Éxon 14	141
	<i>far</i> (HCOI_00909100*)	Fatty acid and retinol binding protein (CDJ86885.1)	Referência, segundo LECOVÁ <i>et al.</i> (2015)	FAR	F: TGCCAAGGACTATGCCAAGT R: TGAGTGCGTCGATCTTTCCC	Éxon 2 Éxon 3	128
	<i>ncbp</i> (HCOI_01743600*)	Nuclear cap-binding protein subunit 2-like (CDJ82645.1)	Referência, segundo LECOVÁ <i>et al.</i> (2015)	NCBP	F: CCGAGCAGATACCGAAAATGC R: CGAAGCCTGCATCATAGTCCA	Éxon 7 Éxon 7	89

*identificação antiga, pois não foram encontrados novos identificadores. Legenda: KDM = desmetilase de lisina. Fonte: Autor.

Os *primers* MPTL1-E12 e MPTL1-I15 (Figura 11), foram escolhidos porque permitem a avaliação da expressão do gene *Hco-mptl-1* em duas regiões diferentes. Esse gene é importante para o estudo de resistência do *H. contortus* ao monepantel, pois foi visto que esta está relacionada a alterações na sequência do gene *Hco-mptl-1* ou no processamento de seu mRNA (RUFENER *et al.*, 2009; BAGNALL *et al.*, 2017). Bagnall e colaboradores (2017) observaram que a retenção do íntron 15 no processamento do mRNA desse gene era a mutação mais frequente nos clones de

cDNA sequenciados, preparados a partir de uma amostra de larvas de isolados resistentes ao monepantel. Outra mutação, menos frequente, encontrada por esses autores foi a exclusão do éxon 12. Considerando que diversas outras mutações já foram relatadas nesse e em outros genes e associadas à resistência ao monepantel, para saber se os isolados resistentes em estudo neste trabalho apresentam a mutação de retenção do íntron 15 ou de exclusão do éxon 12, foi delineado, respectivamente, o par de *primers* MPTL1-I15 que flanqueia o íntron 15 (que apresenta 383 pb), e o par de *primers* MPTL1-E12, cujo *primer reverse* se alinha ao éxon 12 (Figura 11).

Figura 11. Esquema da localização de cada *primer* delineado para a quantificação relativa da expressão do gene *mptl1* em *H. contortus*.



Legenda: Em azul, o cDNA obtido a partir do mRNA do gene *mptl1* de *H. contortus*; em vermelho, o par de *primers* MPTL1-E12; em verde, o par de *primers* MPTL1-I15. Fonte: Autor.

Os genes HCON_00060880 (*tfjmj*) e HCON_00088930 (*hmt*) foram escolhidos a partir de um experimento desenvolvido paralelamente em nosso laboratório (NICIURA *et al.*, 2018). Esse experimento consistiu no sequenciamento do DNA de larvas L3 obtidas por meio do intercruzamento entre um isolado sensível ao monepantel, chamado de Embrapa2010 (CHAGAS *et al.*, 2013), e um isolado de campo resistente, cedido pelo Prof. Dr. Alessandro Amarante da UNESP de Botucatu (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017). Essas L3 foram recuperadas antes (grupo controle) e após (grupo tratado) o tratamento dos ovinos com a dose máxima recomendada do monepantel e, portanto, o grupo controle apresentava tanto larvas sensíveis quanto resistentes a esse anti-helmíntico, e o grupo tratado, somente parasitas resistentes. A comparação entre os grupos controle e tratado permitiu o mapeamento de SNPs associados à resistência do *H. contortus* ao monepantel. Foi encontrada vasta quantidade de SNPs (NICIURA *et al.*, 2018), dos quais foram selecionados aqueles localizados em regiões codificantes de genes da maquinaria epigenética: um SNP não-sinônimo (no *Scaffold* 435, posição 12807, G>T), no gene

HCON_00060880, que codifica o *Transcription factor jumonji domain containing protein* (TFJMJ) (CDJ92265.1), ortólogo à Kdm4A, 4B e 4C humana (APÊNDICE 1); e dois SNPs não-sinônimos (no *Scaffold* 2249, posição 8494 G>C e posição 8527, T>A) no gene HCON_00088930, que codifica a proteína *Histone-lysine N-methyltransferase SETMAR* (HMT SETMAR) (CDJ86632.1). A partir desses resultados, os pares de *primers* TFJMJ e HMT, respectivamente, foram escolhidos para análise do conteúdo de transcritos por RT-qPCR.

O gene HCOI_01766700 (*dnmt*) foi selecionado a partir dos resultados obtidos pela análise *in silico* da ocorrência de metilação em *H. contortus* e estão justificados na seção 5.1.2.

Os genes *far*, *gpd* e *ncbp* foram identificados por Lecová e colaboradores (2015) como genes de referência apropriados para estudos de expressão gênica em *H. contortus* adultos. Já o gene *gpi*, foi o gene de referência utilizado nos estudos de expressão gênica em adultos desse parasita por Rufener e colaboradores (2009).

Padronização e cálculo da eficiência dos *primers*

A padronização das reações de RT-qPCR foi realizada utilizando cDNA obtido a partir do RNA extraído de um *pool* de adultos de *H. contortus*, contendo machos e fêmeas com ovos. Cada reação apresentava 1X de SYBR® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Cat. 4309155), 3 µM de *primer forward*, 3 µM de *primer reverse*, 4,9 µL de água ultrapura e 20 ng de cDNA (com exceção para os grupos de larvas L3 resistentes e sensíveis ao monepantel, uma vez que o rendimento de extração de RNA não foi suficiente para obtenção dessa quantidade de cDNA – Tabela 3), resultando em volume final de 15 µL. As reações foram montadas em placas óticas de 96 poços *MicroAmp*® (Applied Biosystems, Cat. N8010560), seladas com filme adesivo ótico *MicroAmp*® (Applied Biosystems, Cat. 4311971). A quantificação em tempo real foi realizada no termociclador *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems).

Tabela 3. Quantidade de cDNA utilizada nas reações de RT-qPCR para os grupos de larvas L3 de *H. contortus* resistentes e sensíveis ao monepantel.

Grupo	Média da quantidade de cDNA \pm SD (em ng)	Mínimo	Máximo
Resistente	10,78 \pm 5,44	4,4	20
Sensível	13,38 \pm 4,78	8,2	20

Fonte: Autor.

Foi necessária a padronização da temperatura de anelamento, em que todos os *primers* foram submetidos a um gradiente de temperatura de anelamento (55 a 65°C). A temperatura ideal foi aquela em que os genes obtiveram o menor valor de Cq (ciclo de quantificação), maior ΔRn (variação de fluorescência) e menor formação de dímeros ou *hairpins*, representada pelo aparecimento de mais de um pico na curva de dissociação. A melhor temperatura de anelamento para os pares de *primers* MPTL1-E12, MPTL1-I15, TFJMJ, HMT, DNMT e NCBP foi 59°C e para os pares de *primers* GPD, FAR e GPI foi 62°C. Dessa forma, a programação do ensaio de qPCR foi 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos para desnaturação inicial e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento mais extensão a 59 ou 62°C por 30 segundos. Ao final, foi realizada a curva de dissociação para verificar a especificidade dos *primers*.

Quanto à eficiência, para que a reação de RT-qPCR seja confiável e reprodutiva, são necessárias condições ótimas de reação em que as amplificações apresentem 100% de eficiência a cada ciclo, ou seja, que a quantidade de DNA da amostra seja duplicada a cada ciclo. Após a padronização da temperatura de anelamento e da concentração dos *primers*, foram realizadas 5 diluições seriadas 1:2 da amostra de cDNA obtido a partir do RNA extraído de um *pool* de adultos de *H. contortus*, contendo machos e fêmeas com ovos, que apresentam expressão de todos os genes analisados. A eficiência de amplificação foi determinada por uma regressão linear dos valores de Cq em relação à concentração de cDNA, utilizando a Equação 5.

Equação 5:

$$E = 10 \left(\frac{-1}{\text{slope}} \right) - 1, \text{ sendo } E \text{ a eficiência do par de } \textit{primer}.$$

Portanto, eficiência igual a 2 (ou 100%) resulta em curva padrão com slope de -3,32. Outros parâmetros como R^2 e *Y-intercept* (ponto em que a curva corta o eixo Y) também foram obtidos e cuidadosamente avaliados. Para ser considerado eficiente, um *primer* deve apresentar valor de eficiência entre 1,9 e 2,1 (ou seja, 95 a 105%), $R^2 \geq 0,99$ e *slope* próximo a -3,3. A curva de dissociação também foi analisada para verificar a formação de amplificações inespecíficas. Depois de obtidos e analisados os parâmetros citados foi determinado um *threshold*, que foi utilizado nas análises posteriores.

Validação do gene de referência

O gene de referência mais estável para normalização dos dados foi determinado a partir do programa *Bestkeeper* (<https://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>) a partir dos resultados obtidos por ensaios com os genes *far*, *gpd*, *ncbp* (LECOVÁ *et al.*, 2015) e *gpi* (RUFENER *et al.*, 2009). Para a escolha, foram considerados os seguintes fatores descritos por Pfaffl e colaboradores (2004):

- A. Desvio padrão dos valores de Cq: recomenda-se que seja menor que 1; deve ser o menor possível.
- B. Desvio padrão de *x-fold*: recomenda-se que seja menor que 2; deve ser o menor possível.
- C. Coeficiente de Pearson (*r*): recomenda-se que seja próximo de 1.

Cálculo da expressão gênica

A expressão de cada gene alvo foi obtida a partir das fórmulas abaixo (Equações 6, 7 e 8), em que calibrador é o grupo ao qual se deseja comparar.

Equação 6:

$$\Delta Cq = Cq_{\text{gene-alvo}} - Cq_{\text{gene de referência}}$$

Equação 7:

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{amostra}} - \Delta Cq_{\text{calibrador}}$$

Equação 8:

$$\text{Quantidade relativa} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

Análise estatística

Foram comparadas as expressões relativas dos genes *hmt*, *dnmt* e *tfjmj* dos grupos de ovos, larvas L3 e adultos desse parasita, utilizando a média de ΔCq do grupo de ovos como calibrador e entre o grupo de fêmeas e o grupo de machos adultos, utilizando a média de ΔCq do grupo de fêmeas como calibrador. Também foram comparadas as expressões relativas dos genes *mptl1*, *hmt*, *dnmt* e *tfjmj* do grupo de larvas L3 de *H. contortus* sensíveis e resistentes ao anti-helmíntico monepantel, utilizando a média de ΔCq do grupo sensível como calibrador.

Todos os resultados foram apresentados em diagrama de caixa, que indica os limites superior e inferior, primeiro quartil, mediana e terceiro quartil). Para comparação de 2 grupos foi utilizado o teste t de Mann Withney (não paramétrico) e para comparação de 3 grupos, o teste Kruskal-Wallis (não-paramétrico) seguido de Dunns. Todas as análises foram conduzidas utilizando o GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

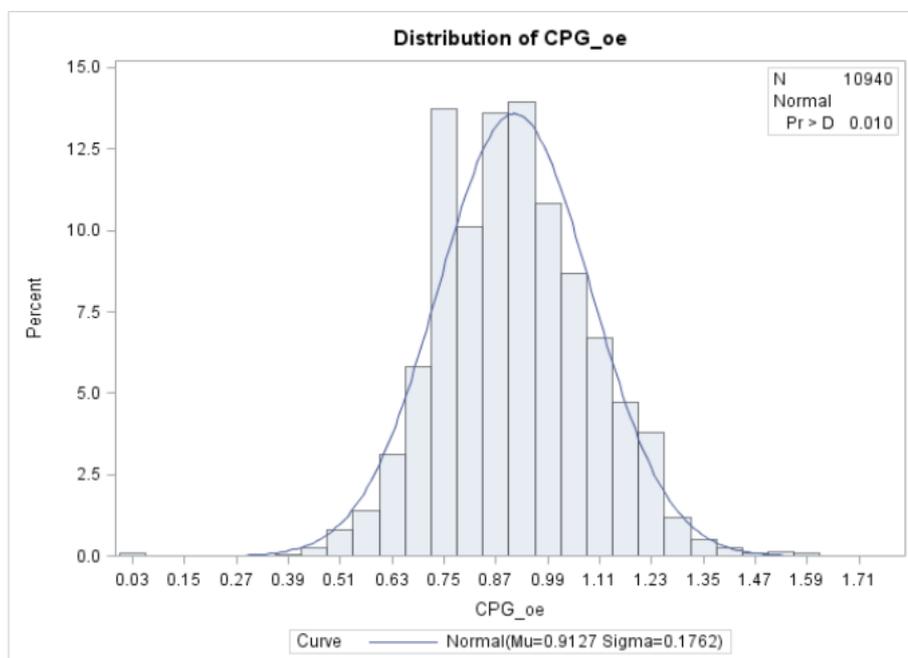
5. RESULTADOS

5.1. Investigação *in silico* de ocorrência de metilação do DNA e de modificações de histonas em *Haemonchus contortus*

5.1.1. Análise da razão CpG observada/esperada ($GpG_{o/e}$) no transcriptoma de *Haemonchus contortus*

Para a análise de distribuição $CpG_{o/e}$ foram identificadas 23.100 ESTs. Após filtragem para tamanho ≥ 500 pb, restaram 10.940 sequências, seis dessas com tamanho superior a 1.000 pb. A Figura 12 mostra a distribuição normal ou unimodal das frequências, com moda de 1,207 e média de 0,912664. Essa distribuição unimodal do conteúdo $CpG_{o/e}$ sugere que o genoma de *H. contortus* é não metilado.

Figura 12. Distribuição das razões CpG observada/esperada (CPG_{oe}) nas ESTs do transcriptoma de *H. contortus*.



Legenda: Em barra, a porcentagem de distribuição $CpG_{o/e}$ das 10.940 sequências analisadas; a linha é a curva normal. Fonte: Autor.

5.1.2. Busca por proteínas com potencial função de metilação do DNA e de modificação de histonas em *Haemonchus contortus*

A Tabela 4 reúne todas as proteínas já anotadas como metiltransferases de DNA ou enzimas modificadoras de histonas (HMTs, HDMs, HATs e HDACs) em *H. contortus*.

Proteínas ainda não anotadas para *H. contortus*, mas potencialmente pertencente à maquinaria das enzimas de modificação epigenética, foram detectadas por ortologia às DNMTs e às principais enzimas modificadoras de histonas de outros organismos e estão reunidas no APÊNDICE 1. Dentre as proteínas identificadas, foram selecionadas e organizadas na Tabela 5 somente as que apresentam ortologia comum a maior número de organismos.

As Tabelas 4 e 5 foram apresentadas separadamente, pois as ferramentas utilizadas para sua detecção foram diferentes. Conforme mencionado na metodologia, as proteínas reunidas na Tabela 4 já estão anotadas para *H. contortus* e foram encontradas no banco de dados UniProt por meio de buscas por palavras-chave. Já as proteínas apresentadas na Tabela 5 e no APÊNDICE 1 foram obtidas a partir de BLAST recíproco (BLASTp), considerando os critérios descritos por Gao *et al.* (2012) e Perfus-Barbeoch *et al.* (2014) de $E\text{-value} < 10^{-5}$ e, no mínimo, 30% de alinhamento.

Tabela 4. Proteínas de *Haemonchus contortus* anotadas no UniProt como enzimas acetilases (HAT), desacetilases (HDAC) e metiltransferases (HMT) de histonas.

Proteína	ID Uniprot	Nome do gene	Número de Acesso
HAT	U6P9M6	HCOI_01222500	CDJ89486
	U6PAF4	HCOI_01387800	CDJ90945
	W6NGN6	HCOI_01654500	CDL95925
	U6P685	HCOI_01222400	CDJ89485
	U6P6K8	HCOI_00961400	CDJ88391
	W6NAE7	HCOI_00530600	CDL94016
	U6NRE5	HCOI_00510900	CDJ84270
	U6NHX1	HCOI_00005400	CDJ80121
	U6P1K8	HCOI_00706800	CDJ86117
HDAC	U6PL02	HCOI_01379700	CDJ92118
HMT	U6NF99	HCOI_00003200	CDJ80099

Fonte: Autor.

Tabela 5. Principais proteínas de *Haemonchus contortus* ortólogas a metiltransferase de DNA do tipo 2 (DNMT2) e acetilases (HAT), desacetilases (HDAC), metiltransferases (HMT) e desmetilases (HDM) de histonas de outros organismos e as espécies com as quais apresentam ortologia.

Proteína	Número de acesso da proteína ortóloga	Organismos
DNMT2	CDJ86861.1	<i>Bos taurus, Homo sapiens, Rattus norvegicus, Gallus gallus, Mus musculus, Schizosaccharomyces pombe</i>
	CDJ94056.1	<i>Bos taurus, Homo sapiens, Rattus norvegicus, Gallus gallus, Mus musculus, Schizosaccharomyces pombe</i>
HAT	CDJ80121.1	<i>Várias espécies de fungos, Homo sapiens, Mus musculus, Pongo abelii, Rattus norvegicus, Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans, Macaca fascicularis, Oryza sativa subsp. Japonica, Arabidopsis thaliana</i>
	CDJ84270.1	<i>Várias espécies de fungos, Homo sapiens, Mus musculus, Pongo abelii, Rattus norvegicus, Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans, Macaca fascicularis, Oryza sativa subsp. Japonica, Arabidopsis thaliana</i>
	CDJ85321.1	<i>Várias espécies de fungos, Homo sapiens, Mus musculus, Pongo abelii, Rattus norvegicus, Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans, Macaca fascicularis, Oryza sativa subsp. Japonica, Arabidopsis thaliana</i>
	CDJ86117.1	<i>Várias espécies de fungos, Homo sapiens, Mus musculus, Pongo abelii, Rattus norvegicus, Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans, Macaca fascicularis, Oryza sativa subsp. Japonica, Arabidopsis thaliana</i>
	CDJ88391.1	<i>Várias espécies de fungos, Homo sapiens, Mus musculus, Pongo abelii, Rattus norvegicus, Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans, Macaca fascicularis, Oryza sativa subsp. Japonica, Arabidopsis thaliana</i>
	CDJ89485.1	<i>Várias espécies de fungos, Homo sapiens, Mus musculus, Pongo abelii, Rattus norvegicus, Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans, Macaca fascicularis, Oryza sativa subsp. Japonica, Arabidopsis thaliana</i>
	CDJ89486.1	<i>Várias espécies de fungos, Homo sapiens, Mus musculus, Pongo abelii, Rattus norvegicus, Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans, Macaca fascicularis, Oryza sativa subsp. Japonica, Arabidopsis thaliana</i>
	CDJ94575.1	<i>Homo sapiens, Mus musculus, Oryza sativa subsp. Japonica, Arabidopsis thaliana</i>
HDAC	CDJ82874.1	<i>Arabidopsis thaliana, Bos taurus, Danio rerio, Gallus gallus, Homo sapiens, Macaca fascicularis, Mus musculus, Oryza sativa subsp. Japonica, Pongo abelii, Rattus norvegicus, Saccharomyces cerevisiae, Strongylocentrotus purpuratus, Tetraodon nigroviridis, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis, Zea mays</i>
	CDJ86285.1	<i>Candida albicans, Cricetulus griseus, Dictyostelium discoideum, Gallus gallus, Homo sapiens, Mus musculus, Pongo abelii, Pseudomonas aeruginosa, Rattus norvegicus, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe</i>
	CDJ86287.1	<i>Alcaligenes sp. (Bordetella sp.), Arabidopsis thaliana, Bos taurus, Candida albicans, Cricetulus griseus, Danio rerio, Dictyostelium discoideum, Gallus gallus, Homo sapiens, Mus musculus, Oryza sativa subsp. Japonica, Pongo abelii, Pseudomonas aeruginosa, Rattus norvegicus, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Strongylocentrotus purpuratus, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis, Zea mays</i>
	CDJ90702.1	<i>Arabidopsis thaliana, Bos taurus, Cricetulus griseus, Danio rerio, Gallus gallus, Homo sapiens, Mus musculus, Oryza sativa subsp. Japonica, Pongo abelii, Rattus norvegicus, Saccharomyces cerevisiae, Strongylocentrotus purpuratus, Tetraodon nigroviridis, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis, Zea mays</i>
	CDJ90815.1	<i>Alcaligenes sp. (Bordetella sp.), Bos taurus, Candida albicans, Cricetulus griseus, Danio rerio, Dictyostelium discoideum, Gallus gallus, Homo sapiens, Mus musculus, Pongo abelii, Pseudomonas aeruginosa, Rattus norvegicus, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Xenopus laevis</i>
	CDJ91130.1	<i>Arabidopsis thaliana, Bos taurus, Cricetulus griseus, Danio rerio, Gallus gallus, Homo sapiens, Macaca fascicularis, Mus musculus, Oryza sativa subsp. Japonica, Pongo abelii, Rattus norvegicus, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Strongylocentrotus purpuratus, Tetraodon nigroviridis, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis, Zea mays</i>
	CDJ92412.1	<i>Candida albicans, Cricetulus griseus, Dictyostelium discoideum, Gallus gallus, Homo sapiens, Mus musculus, Pongo abelii, Rattus norvegicus, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe</i>
	CDJ93182.1	<i>Alcaligenes sp. (Bordetella sp.), Bos taurus, Candida albicans, Cricetulus griseus, Gallus gallus, Homo sapiens, Mus musculus, Pongo abelii, Pseudomonas aeruginosa, Rattus norvegicus, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Xenopus laevis</i>

HMT	CDJ80580.1	<i>Danio rerio, Gallus gallus, Homo sapiens, Mus musculus, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis, Macaca fascicularis, Bos taurus, Pongo abelii, Drosophila melanogaster</i>
	CDJ83100.1	<i>Danio rerio, Homo sapiens, Mus musculus, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis, Macaca fascicularis, Bos taurus, Pongo abelii, Drosophila melanogaster</i>
	CDJ84092.1	<i>Danio rerio, Gallus gallus, Homo sapiens, Mus musculus, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis, Macaca fascicularis, Bos taurus, Pongo abelii</i>
	CDJ85784.1	<i>Danio rerio, Homo sapiens, Mus musculus, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis, Macaca fascicularis, Bos taurus, Pongo abelii, Drosophila melanogaster</i>
	CDJ88240.1	<i>Danio rerio, Gallus gallus, Homo sapiens, Mus musculus, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis, Macaca fascicularis, Bos taurus, Pongo abelii</i>
	CDJ89001.1	<i>Danio rerio, Gallus gallus, Homo sapiens, Mus musculus, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis, Macaca fascicularis, Drosophila melanogaster</i>
	CDJ92627.1	<i>Danio rerio, Gallus gallus, Homo sapiens, Mus musculus, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis, Macaca fascicularis, Bos taurus, Drosophila melanogaster, Pongo abelii</i>
	CDJ96968.1	<i>Danio rerio, Gallus gallus, Homo sapiens, Mus musculus, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis, Bos taurus, Drosophila melanogaster, Pongo abelii</i>
HDM	CDJ85158.1	<i>Homo sapiens, Mus musculus, Drosophila melanogaster, Oryza sativa subsp. Japonica, Oryza sativa subsp. Indica, Arabidopsis thaliana</i>
	CDJ86735.1	<i>Homo sapiens, Mus musculus, Drosophila melanogaster, Schizosaccharomyces pombe, Danio rerio, Saccharomyces cerevisiae, Caenorhabditis elegans, Cryptococcus neoformans var. neoformans serotype D, Kluyveromyces lactis, Ashbya gossypii, Debaryomyces hansenii, Neosartorya fumigata</i>
	CDJ94444.1	<i>Homo sapiens, Mus musculus, Drosophila melanogaster, Oryza sativa subsp. Japonica, Oryza sativa subsp. Indica, Arabidopsis thaliana, Caenorhabditis elegans</i>
	CDJ97695.1	<i>Homo sapiens, Mus musculus, Drosophila melanogaster, Schizosaccharomyces pombe, Danio rerio, Saccharomyces cerevisiae, Caenorhabditis elegans, Cryptococcus neoformans var. neoformans serotype D, Kluyveromyces lactis, Ashbya gossypii, Debaryomyces hansenii, Neosartorya fumigata</i>
	CDJ98196.1	<i>Homo sapiens, Mus musculus, Drosophila melanogaster, Schizosaccharomyces pombe, Danio rerio, Saccharomyces cerevisiae, Caenorhabditis elegans, Cryptococcus neoformans var. neoformans serotype D, Kluyveromyces lactis, Ashbya gossypii, Debaryomyces hansenii, Neosartorya fumigata</i>

Fonte: Autor.

Não foram encontrados genes já descritos com função de codificação de proteínas responsáveis pelo processo de metilação de DNA (DNMT 1 e DNMT 3) no genoma do *H. contortus* (Tabela 4), mas foram encontradas duas proteínas ortólogas à DNMT 1, CDJ89420.1 e CDJ97781.1 (*Zinc finger domain containing protein*) (APÊNDICE 1). A identidade de sequência dessas proteínas com DNMT 1 de outros organismos é de aproximadamente 52%, porém a cobertura do *query* é muito baixa (3 a 5%) (APÊNDICE 1). Dessa forma, foi feito um alinhamento BLASTp dessas duas sequências a todas as sequências disponíveis no banco de dados NCBI. Foi encontrado que os alinhamentos com *E-value* mais significativos ocorreram para proteínas ortólogas à histona metiltransferase 2B, ou seja, uma metiltransferase de histonas e não de DNA. Isso sugere que não existam proteínas em *H. contortus* com função de DNMT 1, o que corrobora com os resultados obtidos pela análise da razão CpG_{o/e} (seção 5.1.1.).

Já em relação à DNMT2, enzima responsável pela metilação de RNA transportador (tRNA) e não de DNA, os resultados foram diferentes. Foram encontradas 4 ortólogas a essa enzima em *H. contortus* (CDJ84684.1, CDJ86861.1, CDJ93297.1 e CDJ94056.1) (Tabela 5 e APÊNDICE 1). Com exceção da

CDJ84684.1 (*Bacterial Fmu (Sun) eukaryotic nucleolar NOL1 Nop2p domain containing protein*), todas as proteínas apresentaram alta identidade (média de 38,43% para CDJ86861.1; 35% para CDJ93297.1; 40,43% para CDJ94056.1) e alta cobertura do *query* (92% para CDJ86861.1; 88% para CDJ94056.1; 84,5% para CDJ93297.1) com DNMT 2 de outros organismos (APÊNDICE 1). Este resultado indica a presença de proteínas com função DNMT 2 em *H. contortus*. Dentre essas proteínas ortólogas a DNMT 2, a *DNA methylase domain containing protein* (CDJ94056.1) obteve destaque, uma vez que, após alinhamento BLASTp dessa sequência a todas as sequências disponíveis no banco de dados NCBI, foi visto que essa proteína apresentava aproximadamente 97% de identidade com *C-5 cytosine-specific DNA methylase* de outros organismos (*E-value* significativo e alta cobertura). Por isso, o gene que codifica essa proteína foi selecionado para quantificação do nível de transcritos por RT-qPCR.

A ausência de evidências que comprovem a existência de proteínas com função de DNMT 1 (responsável pela metilação do DNA após sua replicação) e DNMT 3 (responsável pela metilação *de novo* do DNA) indica que o mecanismo epigenético de metilação do DNA não ocorre em *H. contortus*. Porém, há evidências da ocorrência de metilação de tRNA, uma vez que foram encontradas proteínas com provável função de DNMT 2.

Em relação às modificações de histonas, foram encontrados no genoma de *H. contortus* alguns genes que codificam acetilases, uma desacetilase e uma metilase de histonas (Tabela 4), e a busca por proteínas ortólogas revelou várias enzimas com ortologia às enzimas modificadoras de histonas (Tabela 5). Isso indica que *H. contortus* apresenta a maquinaria responsável pela regulação da expressão gênica por meio de modificações pós-traducionais de histonas.

5.2. Investigação molecular de ocorrência de modificações de histonas em *Haemonchus contortus*

5.2.1. Quantificação e avaliação da integridade das amostras de proteínas

A quantificação das proteínas extraídas a partir de larvas L3 (amostra A1) e adultos (amostra A2) de *H. contortus* (Tabela 6) foi próxima de 0,75 µg/µL para

ambas as amostras, e portanto, o rendimento da extração foi baixo, considerando que o volume total de eluato foi 20 μL para a amostra A1 e 10 μL para a amostra A2.

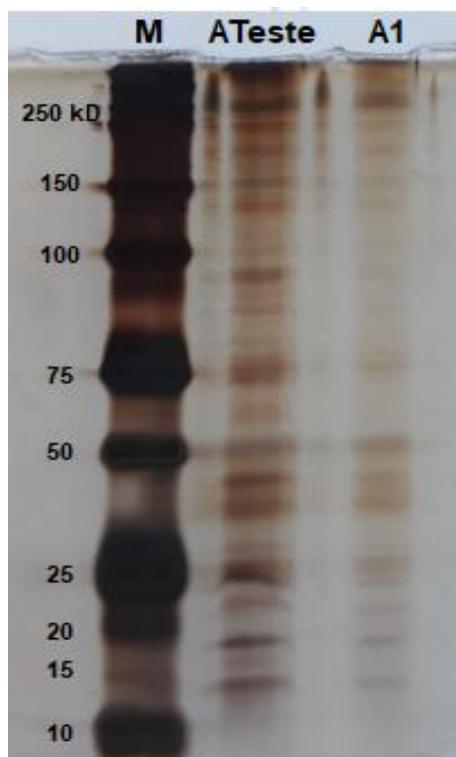
Tabela 6. Quantificação, pelo método de Bradford, de proteínas extraídas de *H. contortus* nos estágios de larvas L3 e adulto.

Amostra	Absorbância média	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
A1	0,184	0,789
A2	0,172	0,731

Legenda: A1 = amostra de extrato de histonas de *H. contortus* no estágio de larva L3; A2 = amostra de extrato de histonas de *H. contortus* no estágio de adulto. Fonte: Autor.

A imagem do gel resultante da eletroforese de proteínas (Figura 13) mostra bandas bem definidas, o que indica que os extratos de histonas obtidos a partir de larvas L3 estavam íntegros. O extrato de histonas obtido a partir de *H. contortus* adultos não foi submetido à eletroforese devido à pouca quantidade de material obtido.

Figura 13. SDS-PAGE dos extratos de proteínas de larvas infectantes (L3) de *H. contortus*.



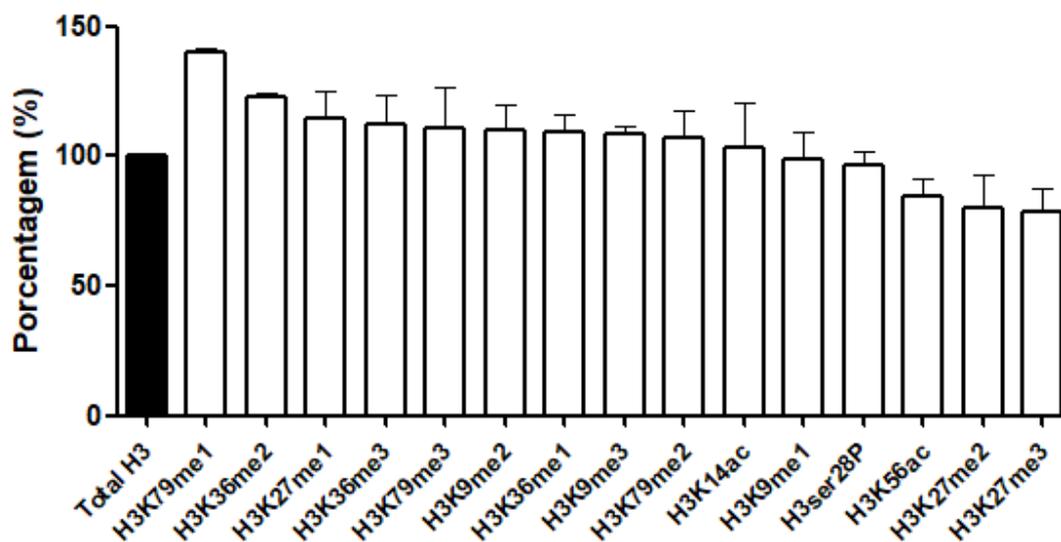
Legenda: M = Marcador Precision Plus Protein™ Standards – Dual Color (Bio-Rad®), ATeste = amostra de teste de protocolo (8 μg de proteína), A1 = amostra 1 (3 μg de proteína). Fonte: Autor.

Como já citado na seção 4.3.1.2., a densidade óptica para todas as modificações de histona H3 do grupo de *H. contortus* adultos foi muito baixa, sendo que os valores de absorbância se aproximaram aos obtidos para o branco. Como a integridade dessa amostra (A2) não foi analisada por SDS-PAGE, existe a possibilidade de sua degradação. Dessa forma, os resultados do ELISA de modificações de histona H3 obtidos a partir da amostra do grupo de adultos foram desconsiderados.

5.2.2. ELISA para modificações de histona H3

A realização do ELISA de modificações de histona H3 permitiu a detecção do padrão de modificações de histona H3 em *H. contortus* no estágio de larva infectante (L3) (Figura 14).

Figura 14. Porcentagem de cada modificação de histona H3 detectada por ELISA em larvas L3 de *H. contortus*.



Legenda: Porcentagens de cada modificação de histona H3 para a amostra de larvas L3 (em branco) em relação ao total de H3 (em preto); K = resíduo de Lisina; ser = resíduo de Serina; me1 = monometilação; me2 = dimetilação; me3 = trimetilação; ac = acetilação; P = fosforilação. Fonte: Autor.

Esse resultado foi analisado com o intuito de encontrar modificações marcantes do estágio de larva infectante de *H. contortus*. Para isso, foi feito um quadro

comparativo (Figura 15) entre as porcentagens de cada modificação de histona H3 e foi estabelecido que a modificação mais predominante em relação às demais foi a H3K79me1. Também se destacaram as modificações H3K27me2, H3K27me3 e H3K56ac, por sua menor proporção em relação às demais modificações de histona H3 avaliadas.

Figura 15. Quadro de comparação entre as porcentagens de modificações de histona H3 detectada por ELISA em larvas L3 de *H. contortus*.

	H3K9me1	H3K9me2	H3K9me3	H3K27me1	H3K27me2	H3K27me3	H3K36me1	H3K36me2	H3K36me3	H3K79me1	H3K79me2	H3K79me3	H3K14ac	H3K56ac	H3ser28P
H3K9me1	1,0	1,1	1,1	1,2	1,2	1,3	1,1	1,2	1,1	1,4	1,1	1,1	1,0	1,2	1,0
H3K9me2	1,1	1,0	1,0	1,0	1,4	1,4	1,0	1,1	1,0	1,3	1,0	1,0	1,1	1,3	1,1
H3K9me3	1,1	1,0	1,0	1,1	1,4	1,4	1,0	1,1	1,0	1,3	1,0	1,0	1,1	1,3	1,1
H3K27me1	1,2	1,0	1,1	1,0	1,4	1,5	1,1	1,1	1,0	1,2	1,1	1,0	1,1	1,4	1,2
H3K27me2	1,2	1,4	1,4	1,4	1,0	1,0	1,4	1,5	1,4	1,8	1,3	1,4	1,3	1,1	1,2
H3K27me3	1,3	1,4	1,4	1,5	1,0	1,0	1,4	1,6	1,4	1,8	1,4	1,4	1,3	1,1	1,2
H3K36me1	1,1	1,0	1,0	1,1	1,4	1,4	1,0	1,1	1,0	1,3	1,0	1,0	1,1	1,3	1,1
H3K36me2	1,2	1,1	1,1	1,1	1,5	1,6	1,1	1,0	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,5	1,3
H3K36me3	1,1	1,0	1,0	1,0	1,4	1,4	1,0	1,1	1,0	1,2	1,1	1,0	1,1	1,3	1,2
H3K79me1	1,4	1,3	1,3	1,2	1,8	1,8	1,3	1,1	1,2	1,0	1,3	1,3	1,4	1,7	1,4
H3K79me2	1,1	1,0	1,0	1,1	1,3	1,4	1,0	1,1	1,1	1,3	1,0	1,0	1,0	1,3	1,1
H3K79me3	1,1	1,0	1,0	1,0	1,4	1,4	1,0	1,1	1,0	1,3	1,0	1,0	1,1	1,3	1,1
H3K14ac	1,0	1,1	1,1	1,1	1,3	1,3	1,1	1,2	1,1	1,4	1,0	1,1	1,0	1,2	1,1
H3K56ac	1,2	1,3	1,3	1,4	1,1	1,1	1,3	1,5	1,3	1,7	1,3	1,3	1,2	1,0	1,1
H3ser28P	1,0	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,1	1,3	1,2	1,4	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0

Legenda: Representado em branco quando as porcentagens das modificações de histona H3 são iguais e em cinza, quando são diferentes. A gradação de cinza fica mais forte quanto mais diferentes as porcentagens. Fonte: Autor.

5.3. Expressão de genes relacionados à maquinaria epigenética e à resistência ao monepantel em *Haemonchus contortus*

5.3.1. Quantificação e integridade das amostras de RNA

Pela quantificação das amostras de RNA (Tabela 7), considerando volume total de 50 µL de eluato, podemos observar que o rendimento do protocolo de extração

do RNA foi heterogêneo para as amostras coletadas em diferentes estágios do ciclo de vida do *H. contortus*. Foi obtida maior quantidade de RNA extraído a partir de vermes adultos (em *pools* de 15), sendo cerca de 323,6 ng/ μ L para o grupo de machos e cerca de 1016,1 ng/ μ L para o grupo de fêmeas. Esse alto rendimento observado para o grupo de adultos deve-se, provavelmente, à maior quantidade de tecido submetido à extração, pois, mesmo que a quantidade de parasitas seja menor para esse grupo, nesse estágio, eles apresentam tamanho maior e, portanto, maior quantidade de células. Já para o grupo de ovos (em *pools* de 30.000), o rendimento foi 161,16 ng/ μ L e para os grupos de larvas L3 (em *pools* de 30.000), tanto sensíveis quanto resistentes ao monepantel, foi mais baixo, com média de 34,8 ng/ μ L. Essa diferença de rendimento obtido para ovos e larvas L3, para os quais a quantidade de tecido submetido à extração foi aproximadamente a mesma, provavelmente, deve-se à presença da cutícula protetora do estágio infectante do *H. contortus*, o que dificulta o processo de extração de material genético. Todas as amostras apresentaram razão de absorvância 260/280 próxima de 2 (Tabela 7), o que indica alta pureza de RNA.

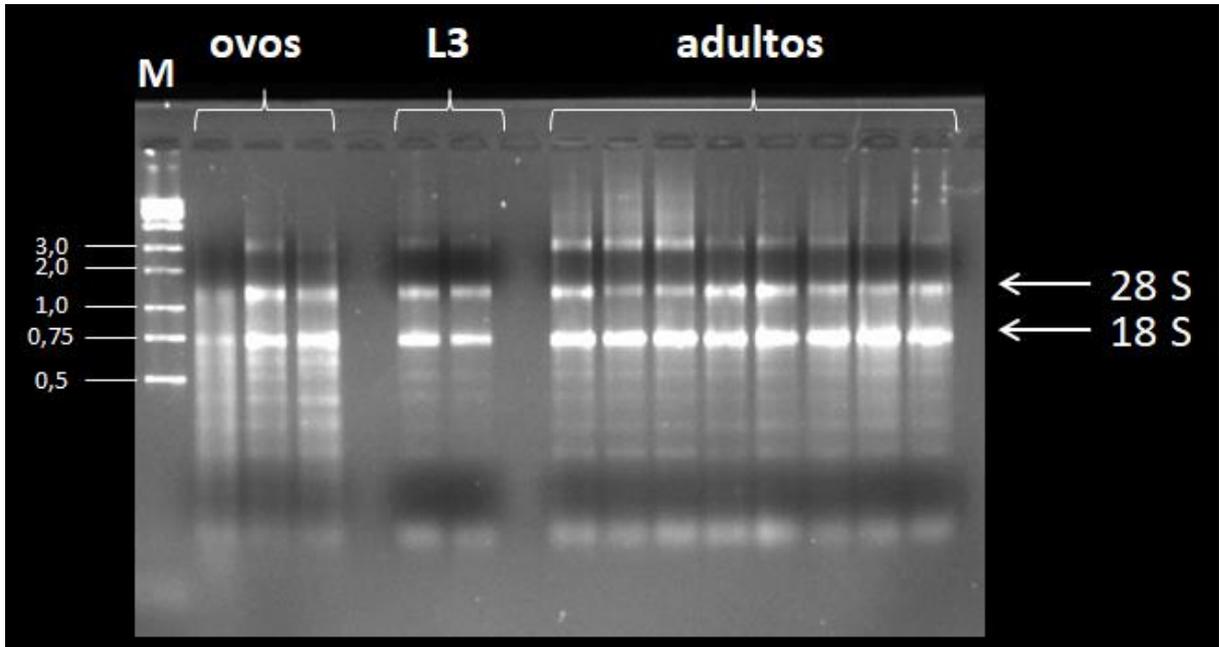
Tabela 7. Rendimento da extração de RNA para cada um dos grupos de *H. contortus* analisados por RT-qPCR.

Grupo	Quantidade de RNA (ng/ μ L)			Razão 260/280		
	Média \pm DP	Mínimo	Máximo	Média \pm DP	Mínimo	Máximo
Ovos	161,16 \pm 52,21	79,3	233,8	2,194 \pm 0,03	2,14	2,25
L3 sensíveis ao monepantel	40,39 \pm 39,67	7,63	117,6	2,188 \pm 0,16	1,92	2,36
L3 resistentes ao monepantel	29,22 \pm 12,03	14,7	51,2	1,982 \pm 0,09	1,85	2,07
Adultos machos	323,6 \pm 34,35	268,1	369,7	2,174 \pm 0,01	2,15	2,18
Adultos fêmeas	1016,1 \pm 124,6	866,4	1170	2,204 \pm 0,02	2,17	2,23

Fonte: Autor.

Além da pureza também foi avaliada a integridade de todas as amostras por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 16). A visualização das bandas 18S e 28S do RNA ribossomal (rRNA) no gel indica que as amostras estavam íntegras. O rRNA é utilizado para análise da qualidade do RNA total por ser o mais abundante no meio intracelular e, estando esse íntegro, espera-se que a mesma afirmação seja válida para o mRNA, que é mais escasso.

Figura 16. Gel de agarose 1,5% das amostras de RNA extraído a partir de diferentes estágios do ciclo de vida de *H. contortus*.

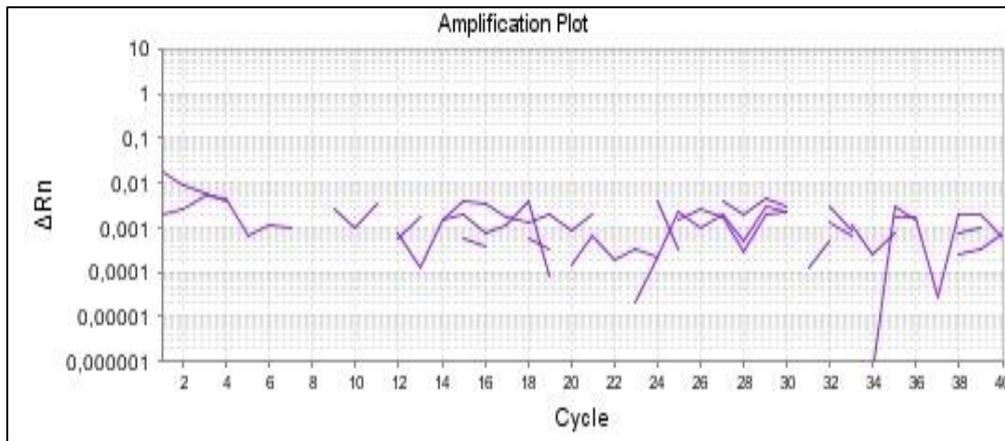


Legenda: M = Marcador: *Ladder 1 kb* (Ludwig Biotec). Ao lado esquerdo do marcador estão indicados os tamanhos dos fragmentos do marcador em mil pares de bases (pb). As flechas indicam as bandas correspondentes às duas subunidades do rRNA. Fonte: Autor.

5.3.2. Tratamento com DNase e transcrição reversa

Um ensaio de qPCR com as amostras de RNA após o tratamento com DNase (teste *RT Minus*) utilizando os *primers* para amplificação do gene de referência *far* (escolhido aleatoriamente) mostrou a ausência de contaminação por DNA genômico, uma vez que não houve amplificação (Figura 17). Dessa forma, podemos afirmar que as amplificações ocorridas nos ensaios de RT-qPCR realizados posteriormente, para análise de expressão gênica, foram produzidas somente a partir de cDNA.

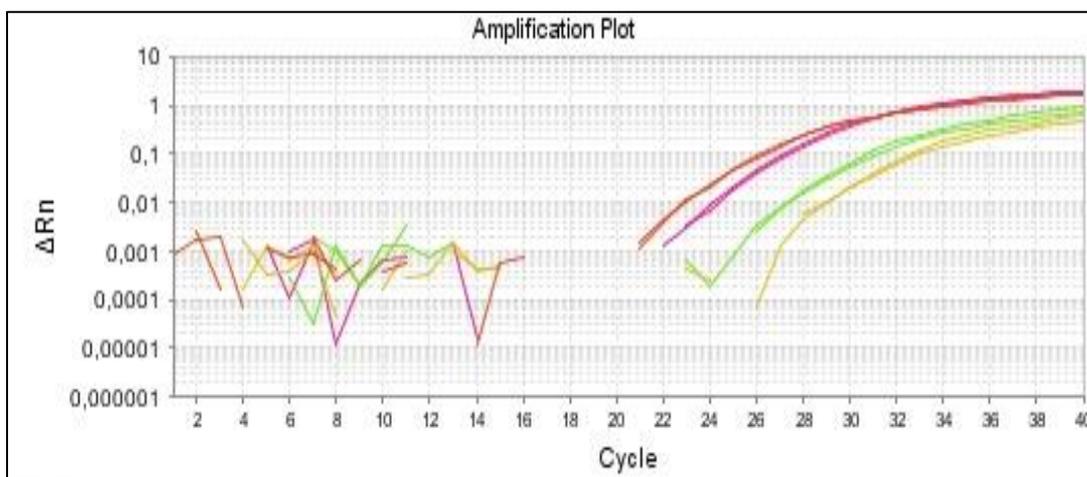
Figura 17. Ausência de amplificação de amostras de RNA de *H. contortus* tratadas com DNase.



Legenda: Em roxo, a variação de fluorescência (ΔRn) durante os ciclos de amplificação por qPCR. A ausência de uma curva de amplificação indica que não há contaminação por DNA genômico. Fonte: Autor.

A partir do RNA extraído e tratado com DNase, foi realizada a síntese de cDNA através da reação de transcrição reversa. As amostras de cDNA foram testadas por qPCR utilizando todos os *primers*. Houve amplificação de todas as amostras de cDNA para todos os genes testados, o que confirmou a viabilidade das amostras. Um exemplo de placa de teste de cDNA está mostrado na Figura 18.

Figura 18. Curvas de amplificação por qPCR das amostras de cDNA de *H. contortus* em diferentes estágios do ciclo de vida.

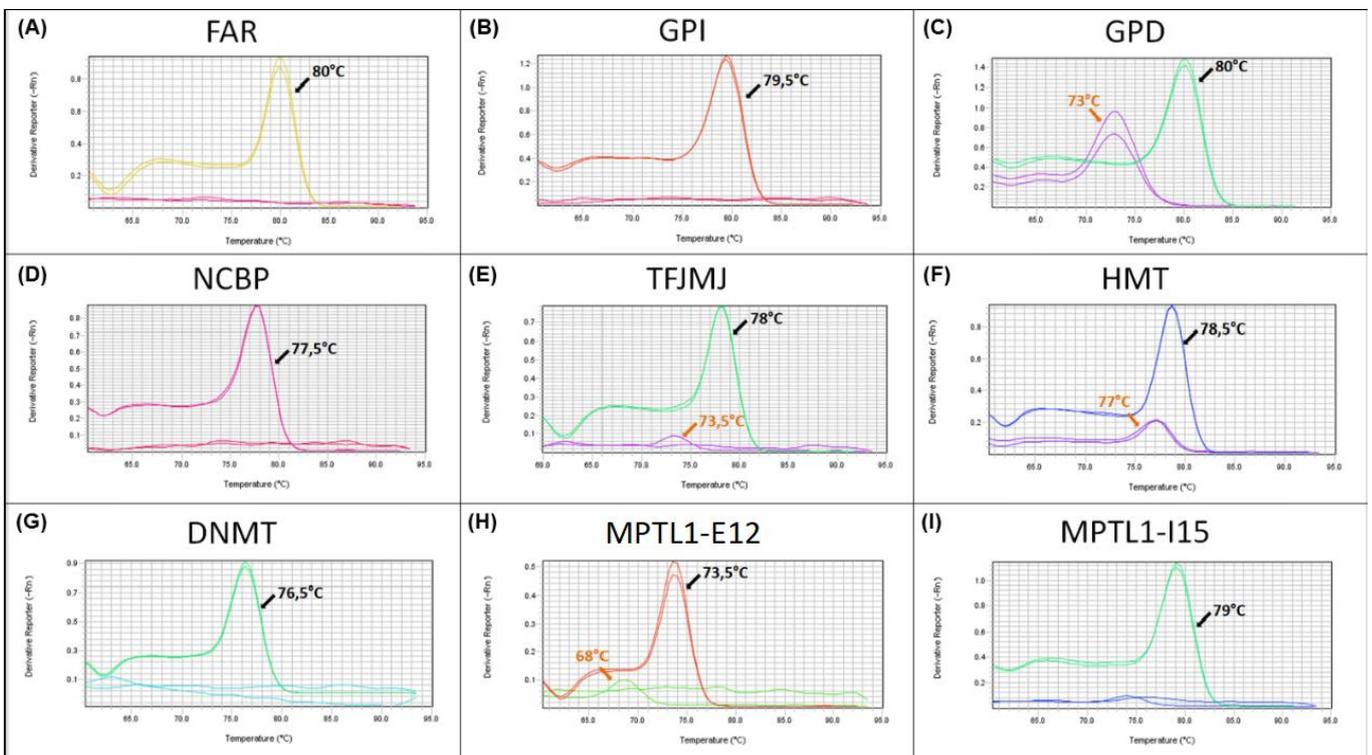


Legenda: Variação de fluorescência (ΔRn) durante os ciclos de amplificação por de cDNA de *H. contortus* no estágio de ovos (em vermelho), adultos (em rosa) e larvas L3 (em verde e amarelo). A curva verde corresponde a uma amostra do grupo de larvas L3 resistentes ao monepantel, e a amarela, do grupo de larvas L3 sensíveis ao monepantel. Fonte: Autor.

5.3.3. Padronização dos *primers*

Todos os pares de *primers* apresentaram-se específicos para a amplificação dos fragmentos desejados, o que foi confirmado pela observação das curvas de dissociação (Figura 19) obtidas após as reações de RT-qPCR. A especificidade é evidenciada pela visualização de um único pico. Também foram analisadas as curvas de dissociação no controle negativo (*no template control* – NTC) (Figura 19). A visualização de um pico, em temperatura mais baixa e com menor intensidade de fluorescência para os *primers* MPTL1-E12, TFJMJ, HMT e GPD indicam a presença de dímeros de *primers* (Figura 19, indicados em laranja). A formação dessas estruturas não interfere na análise dos resultados, desde que o pico da curva de dissociação observado para as amostras seja específico (único e na temperatura específica).

Figura 19. Curvas de dissociação da amplificação referente a uma amostra e ao controle negativo para todos os genes analisados em *H. contortus*.



Legenda: (A-D) Curvas de dissociação da amplificação dos genes de referência e (E-I) dos genes-alvo. As setas e temperaturas em preto são referentes ao pico específico ao fragmento de amplificação de interesse. As setas e temperaturas em laranja são referentes ao pico de dímeros de *primers*. Fonte: Autor.

5.3.3.1. Eficiência dos *primers*

Todos os *primers* apresentaram eficiência ótima (entre 1,9 e 2,1), com exceção do MPTL1-I15 (Tabela 8). Portanto, para o cálculo da expressão relativa dos genes correspondentes a esse par de *primers*, foi realizada uma alteração na Equação 8, em que o 2 foi substituído por 1,8. O coeficiente de correlação (R^2) da curva de eficiência variou de 0,943 a 0,993 (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de *threshold*, coeficiente de correlação (R^2), inclinação (*slope*) e *Y-intercept* da curva padrão obtida para o cálculo de eficiência de cada *primer* e a porcentagem de eficiência obtida.

	Gene	Primer	Threshold	R^2	Slope	Y-intercept	Eficiência (%)
Genes-alvo	<i>mptl1</i>	MPTL1-E12	0,109809	0,993	-3,346	29,801	99
		MPTL1-I15	0,082456	0,975	-3,603	28,608	89
	HCOI_01766700	DNMT	0,034208	0,943	-3,24	30,471	104
	HCON_00088930	HMT	0,018503	0,992	-3,451	29,903	95
	HCON_00060880	TFJMJ	0,027467	0,989	-3,451	25,567	95
Genes de Referência	<i>ncbp</i>	NCBP	0,032739	0,961	-3,273	30,641	102
	<i>gpi</i>	GPI	0,023044	0,979	-3,401	23,617	97
	<i>gpd</i>	GPD	0,040773	0,992	-3,434	20,089	96
	<i>far</i>	FAR	0,0202	0,987	-3,298	20,095	101

Fonte: Autor.

5.3.3.2. Teste de estabilidade do gene de referência

O gene de referência mais estável foi escolhido a partir da avaliação feita pelo programa *Bestkeeper* (PFAFFL *et al.*, 2004). Os genes *far*, *gpd*, *gpi* e *ncbp* foram identificados na literatura como genes de referência para estudos de expressão gênica em *H. contortus* adultos. Como este trabalho visou a quantificação relativa de expressão gênica em 3 estágios diferentes do ciclo de vida desse parasita, foi importante a realização desse teste de estabilidade para identificar qual desses genes era o mais estável para todos os grupos de amostras estudados.

Dentre os genes de referência candidatos *far*, *gpd*, *ncbp* (LECOVÁ *et al.*, 2015) e *gpi* (RUFENER *et al.*, 2009), o mais estável foi o *ncbp* por apresentar menor desvio padrão dos valores de Cq e de *x-fold* (Tabela 9). Além disso, também foi o gene que apresentou coeficiente de Pearson (*r*) mais próximo de 1 (Tabela 9). Dessa forma, o gene *ncbp* foi escolhido como gene de referência para a análise de expressão dos genes-alvo.

Tabela 9. Valores da análise realizada pelo programa *Bestkeeper* para seleção do gene de referência mais estável de *H. contortus* em todos os estágios do ciclo de vida.

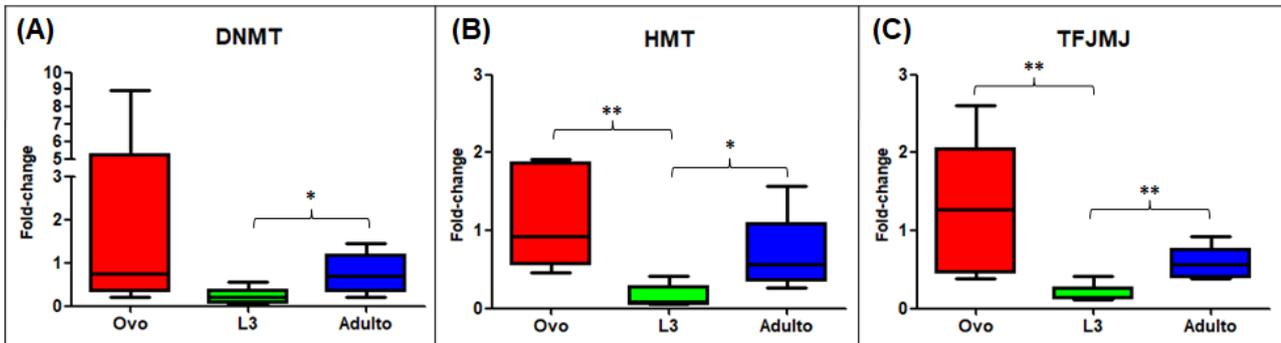
Fatores		NCBP	GPI	GPD	FAR
Valores de Cq fornecidos para cada gene	<i>n</i>	10	10	10	10
	<i>geo Mean [CP]</i>	26,33	21,81	16,99	16,83
	<i>ar Mean [CP]</i>	26,36	21,94	17,13	16,91
	<i>min [CP]</i>	24,54	18,78	14,77	14,68
	<i>max [CP]</i>	28,53	25,34	22,77	19,49
	<i>std dev [± CP]</i>	1,05	2,22	1,73	1,51
	<i>CV [% CP]</i>	3,99	10,13	10,13	8,96
<i>x-fold</i>	<i>min [x-fold]</i>	-3,63	-7,49	-4,20	-4,59
	<i>max [x-fold]</i>	4,86	10,39	42,42	6,58
	<i>std dev [± x-fold]</i>	2,13	4,96	3,49	2,98
Correlação entre os genes	<i>r</i>	0,969	0,967	0,951	0,966
	<i>r²</i>	0,939	0,935	0,904	0,933
	<i>p-value</i>	0,001	0,001	0,001	0,001

Legenda: Número (*n*), média geométrica (*geo Mean [CP]*), média aritmética (*ar Mean [CP]*), mínimo (*min [CP]*), máximo (*max [CP]*), desvio padrão (*std dev [± CP]*) e coeficiente de variação (*CV [% CP]*) dos valores de Cq fornecidos para cada gene de referência. Valores mínimo (*Min [x-fold]*) e máximo (*Max [x-fold]*) e o desvio padrão (*std dev [± x-fold]*) do nível de expressão descrito como *x-fold*. Coeficientes de Pearson (*r*) e de determinação (*r²*) e o p-valor (*p-value*) da análise de correlação entre os genes de referência. Fonte: Autor.

5.3.4. Expressão de genes da maquinaria epigenética em *Haemonchus contortus* durante o seu ciclo de vida

Foi realizada a quantificação relativa da expressão dos genes *dnmt*, *hmt* e *tfjmj*, potencialmente relacionados à maquinaria epigenética de *H. contortus* nos estágios de desenvolvimento de: ovo, larva L3 e adulto (dados de fêmeas e machos unificados). Nesse caso, foi utilizado como calibrador a média dos valores de ΔCq obtidos para o grupo de ovos. Os resultados estão representados na Figura 20. Foram observadas diferenças significativas de expressão entre os grupos para todos os genes (p-valor $DNMT = 0,024$; p-valor $HMT = 0,0017$; p-valor $TFJMJ = 0,0006$). Esses resultados sugerem que a expressão desses genes é importante durante o desenvolvimento do parasita estudado. Percebe-se diferença significativa principalmente na transição de ovos para larvas infectantes e dessas para adultos.

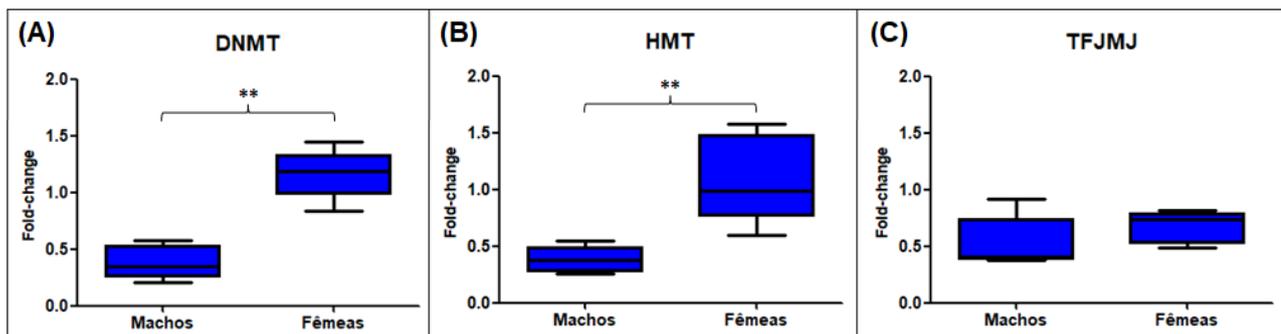
Figura 20. Gráficos de comparação entre os níveis de expressão (*fold-change*) dos genes potencialmente relacionados à maquinaria epigenética de *H. contortus* em diferentes estágios do ciclo de vida.



Legenda: Em vermelho, grupo de ovos; em verde, grupo de larvas L3; em azul, grupo de adultos de *H. contortus*. Asterisco indica diferença estatística significativa: (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. Fonte: Autor.

Na comparação entre fêmeas e machos adultos, foi utilizado como calibrador a média dos valores de ΔCq obtidos para o grupo de fêmeas. Os resultados (Figura 21) mostram diferenças significativas de expressão entre os grupos para os genes *dnmt* e *hmt* ($p\text{-valor}_{DNMT} = 0,0079$; $p\text{-valor}_{HMT} = 0,00079$; $p\text{-valor}_{TFJMJ} = 0,2222$).

Figura 21. Gráficos de comparação entre os níveis de expressão (*fold-change*) dos genes potencialmente relacionados à maquinaria epigenética de *H. contortus* entre machos e fêmeas adultos.



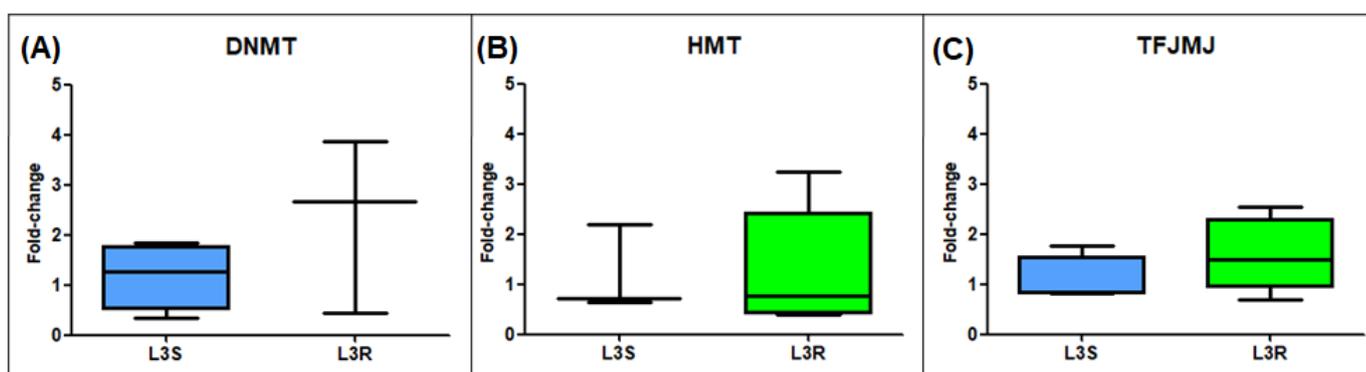
Legenda: Asterisco indica diferença estatística significativa: (**) $p < 0,01$. Fonte: Autor.

5.3.5. Relação da expressão de potenciais genes da maquinaria epigenética de *Haemonchus contortus* com a resistência ao monepantel

Também foi realizada a quantificação relativa da expressão desses genes potencialmente relacionados à maquinaria epigenética de *H. contortus*, para os

grupos de larvas L3 sensíveis e resistentes ao anti-helmíntico monepantel. Neste caso, foi utilizado como calibrador a média dos valores de ΔCq obtidos para o grupo de larvas sensíveis. Os resultados estão representados na Figura 22. Não foram observadas diferenças significativas de expressão entre os grupos para nenhum desses genes (p-valor $_{DNMT} = 0,4$; p-valor $_{HMT} = 1,0$; p-valor $_{TFJMJ} = 0,4127$). Esses resultados sugerem que a resistência ao monepantel não está associada à expressão desses genes no estágio de larvas L3.

Figura 22. Gráficos de comparação entre os níveis de expressão (*fold-change*) dos genes potencialmente relacionados à maquinaria epigenética de *H. contortus* em larvas L3 de *H. contortus* sensíveis e resistentes ao monepantel.



Legenda: L3S (azul) = Grupo de larvas sensíveis ao monepantel; L3R (verde) = grupo de larvas resistentes ao monepantel. Em (A), a quantificação relativa de expressão do gene *dnmt*, em (B), do gene *hmt* e em (C), do gene *tfjmj*. Fonte: Autor.

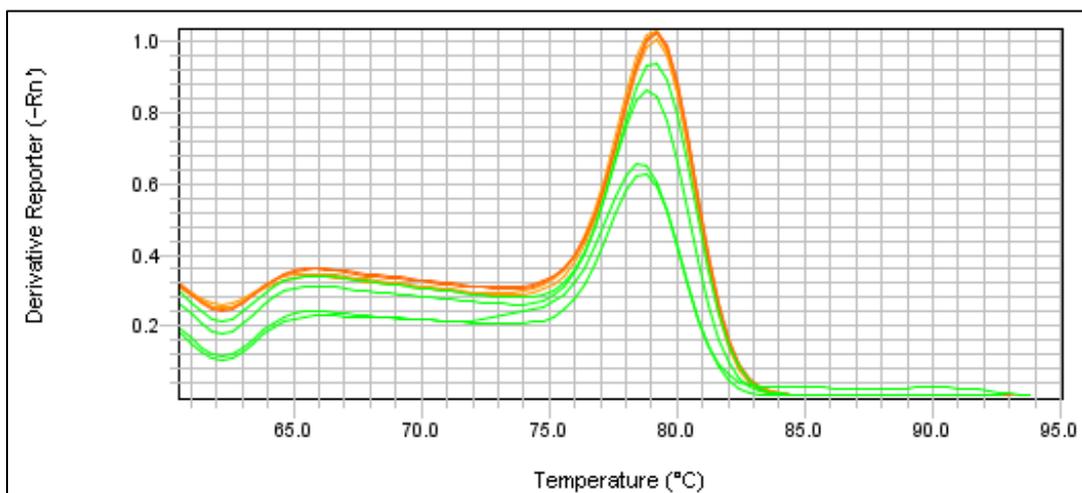
5.3.6. Caracterização dos isolados resistentes estudados quanto à retenção do íntron 15 e exclusão do éxon 12 no processamento do mRNA do gene *mptl1* e quanto à expressão desse gene em *Haemonchus contortus*

Foi visto que o gene *Hco-mptl-1* é de grande importância para o estudo de resistência do *H. contortus* ao monepantel. Ele é responsável por codificar a subunidade MPTL-1 do receptor nicotínico nAChR da subfamília DEG-3, à qual esse anti-helmíntico se liga, levando à abertura do receptor de maneira irreversível. Alterações na sua sequência ou no processamento de seu mRNA estão relacionados ao desenvolvimento de resistência ao monepantel (RUFENER *et al.*, 2009; BAGNALL *et al.*, 2017). Já foram relatadas várias mutações nesse gene associadas à resistência ao monepantel, porém Bagnall e colaboradores (2017) descreveram duas mutações, que também foram analisadas no presente trabalho: a

retenção do íntron 15 (mais frequente) e a exclusão do éxon 12 no mRNA. Considerando isso, foi feita a caracterização dos isolados resistentes estudados neste trabalho, com o propósito de saber se a resistência na população em estudo estava associada a uma dessas duas mutações.

A análise da curva de dissociação dos produtos da amplificação por RT-qPCR utilizando o par de *primers* MPTL1-I15 (Figura 23), que flanqueia o íntron 15 (383 pb), mostrou que não houve diferença entre a temperatura de dissociação dos fragmentos de amplificação obtidos para o grupo de larvas resistentes ao monepantel (média de 78,82, variando de 78,62 a 79,06°C) em relação ao grupo de larvas sensíveis ao monepantel (média de 79,09°C, variando de 78,96 a 79,22°C). Caso esses isolados apresentassem a retenção do íntron 15, a temperatura de dissociação observada para o grupo resistente deveria ser maior, uma vez que o íntron 15 possui 383 pb. Isso indica que a resistência dos isolados de *H. contortus* estudados neste trabalho possivelmente não teve como causa a retenção do íntron 15 no mRNA do gene *mpt11*.

Figura 23. Curva de dissociação da amplificação de cDNA de larvas L3 de *H. contortus* sensíveis e resistentes ao monepantel, utilizando um par de *primers* que flanqueia o íntron 15 do mRNA do gene *mpt11*.

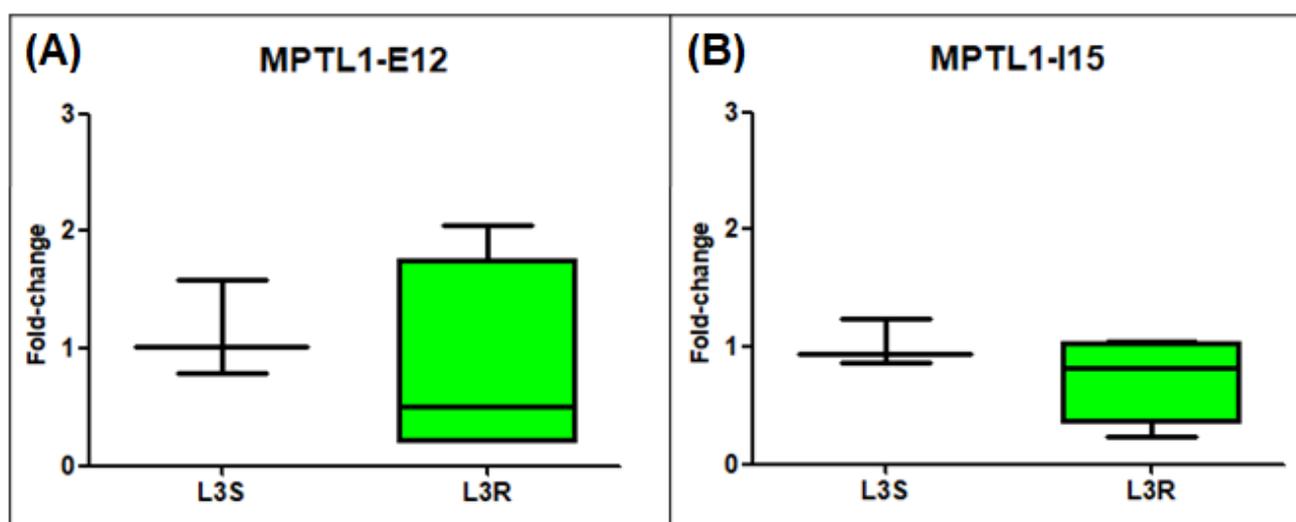


Legenda: Em laranja, amostras de larvas L3 sensíveis ao monepantel; em verde, amostras de larvas L3 resistentes ao monepantel. Fonte: Autor.

A Figura 24 mostra a quantificação relativa para o gene *mpt11* utilizando os pares de *primers* MPTL1-E12 e MPTL1-I15. Não foram observadas diferenças significativas de expressão gênica entre os grupos de larvas L3 de *H. contortus*

sensíveis e resistentes ao monepantel (p-valor = 0,6286 para ambos os casos), o que leva à conclusão de que a resistência observada nesses isolados não está associada à expressão do gene *mpt1*. Adicionalmente, verificou-se por esse resultado, que a resistência também não está relacionada à exclusão do éxon 12, pois do contrário, não haveria amplificação no grupo resistente utilizando o par de *primers* MPTL1-E12, uma vez que *primer reverse* foi delineado para alinhar-se à esse éxon.

Figura 24. Gráficos de comparação entre os níveis de expressão (*fold-change*) do gene *mpt1* em larvas L3 de *H. contortus* sensíveis e resistentes ao monepantel.



Legenda: L3S = Grupo de larvas sensíveis ao monepantel; L3R = grupo de larvas resistentes ao monepantel. Em (A), a quantificação relativa obtida pelo par de *primers* MPTL1-E12 e em (B), pelo par de *primers* MPTL1-I15. Fonte: Autor.

6. DISCUSSÃO

6.1. Metilação do DNA em *Haemonchus contortus*

A metilação do DNA geralmente leva ao silenciamento genético transcricional e inativação gênica (MATHEWS; JANUSEK, 2011; HARDY; TOLLEFSBOL, 2011; NICIURA, 2015) e ocorre pela ação das metiltransferases de DNA (DNMTs) 1 e 3. A DNMT 1 tem função de manutenção da metilação do DNA, realizando a adição do grupamento metil à citosinas presentes em fitas de DNA hemimetiladas. A DNMT 3 apresenta função de metilação *de novo* do DNA, sendo responsável pela metilação da dupla-fita de DNA não metilada (MATHEWS; JANUSEK, 2011; HARDY; TOLLEFSBOL, 2011; NICIURA, 2015).

Foi confirmada a ocorrência desse mecanismo epigenético nos nematoides *Trichinella spiralis* (GAO *et al.*, 2012) e *Heterodera schachtii* (HEWEZI *et al.*, 2017) e com isso, investigamos a ocorrência de metilação do DNA em *H. contortus*. A análise de distribuição da razão CpG_{o/e} no transcriptoma mostrou distribuição unimodal, sugerindo a inexistência de mecanismo de metilação do DNA nesse parasita. Esse achado reforça os resultados obtidos pela busca *in silico*, que resultou na ausência de evidências que comprovem a existência de proteínas com função de DNMT 1 e DNMT 3:

- não foram encontradas proteínas ortólogas a DNMT3;
- as proteínas sugeridas como ortólogas à DNMT1, apresentaram identidade de sequência de aproximadamente 52%, com cobertura de *query* muito baixa (3 a 5%). Além disso, foi observado que essas proteínas ortólogas à DNMT1 apresentam maior identidade de sequência com a histona metiltransferase 2B, uma enzima responsável pela metilação da lisina 4 da histona H3 (LADOPOULOS *et al.*, 2013).

Em conjunto, esses achados indicam a não existência de maquinaria responsável por metilação de DNA em *H. contortus*. A ausência desse mecanismo epigenético é esperada, pois já havia sido reportada em *C. elegans* e em outros nove nematoides (GAO *et al.*, 2012; PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2014). Porém, ainda são necessários experimentos que detectem a atividade das enzimas DNMT1 e DNMT3 para comprovação.

6.2. Metilação de tRNA em *Haemonchus contortus*

A metilação de tRNA é desempenhada pela enzima DNMT2. Apesar de seu nome, ainda não está claro se essa enzima também apresenta função de metiltransferase de DNA (JELTSCH *et al.*, 2016). Segundo revisão feita por Jeltsch e colaboradores (2016), os efeitos relacionados à metilação do tRNA por DNMT2 compreendem no estímulo da tradução de proteínas ricas em aspartato e proteção de tRNAs contra clivagem, sendo esses efeitos dependentes de nutrição ou estresse e, portanto, relacionados à adaptação do organismo às alterações ambientais.

Em *H. contortus*, foram descobertas 4 proteínas ortólogas à DNMT 2 (CDJ84684.1, CDJ86861.1, CDJ93297.1 e CDJ94056.1), com destaque para a *DNA methylase domain containing protein* (CDJ94056.1), uma vez que essa proteína apresentou alta similaridade de sequência com *C-5 cytosine-specific DNA methylase* de outros organismos. A partir desse resultado, selecionamos o gene que codifica essa proteína (aqui referido como *dnmt*) para quantificação do nível de transcritos por RT-qPCR. Observaram-se alterações significativas da expressão desse gene em *H. contortus* durante o seu ciclo de vida. A diferença da expressão de *dnmt* foi mais significativa na transição de larva infectante (L3) para adulto. Esse aumento significativo observado deve-se provavelmente ao fato de que o parasita passa de uma fase marcada por redução metabólica (fase larval L3), em que não há consumo de alimento e sim de reservas, para uma fase parasitária, caracterizada pelo aumento da atividade metabólica e necessidade de procura por alimento no hospedeiro. Schwarz e colaboradores (2013) elucidaram as variações transcricionais de *H. contortus* durante todo seu ciclo de vida (ovos, L1, L2, L3, L4 e adultos machos e fêmeas) por análise RNA-seq. Foi visto que durante a passagem de ovos para larvas L3 ocorre redução gradual da transcrição de certo grupo de genes, refletindo a adaptação progressiva das larvas ao ambiente e a redução do nível de estresse na procura por alimento. Também foi visto que a expressão desse mesmo grupo de genes volta a aumentar nos estágios parasitários L4 e adulto. Os resultados mostrados neste trabalho corroboram com esses achados, uma vez que a expressão do gene ortólogo à DNMT2 de *H. contortus* segue o mesmo padrão do grupo de genes evidenciados por Schwarz e colaboradores (2013) e relacionados à nutrição ou ao estresse referente à adaptação às mudanças ambientais.

Também foi encontrado aumento significativo no nível de expressão de *dnmt* no grupo de adultos fêmeas em comparação ao grupo de machos. É possível que a transcrição desse gene esteja aumentada nas fêmeas devido ao aumento da tradução de proteínas associadas a processos biológicos específicos de sexo, como oogênese, postura de ovos, desenvolvimento vulvar, embriogênese, dentre outros. Porém, não há relatos sobre essa associação entre sexo e a expressão de DNMT2.

Por fim, não foi observada diferença significativa do nível de transcritos de *dnmt* entre os grupos com fenótipos extremos de resistência ao monepantel (sensível e resistente). Portanto, não há correlação entre a expressão de *dnmt* e o desenvolvimento de resistência ao monepantel.

Ao analisar todos os resultados em conjunto, podemos concluir que essa proteína seria um bom alvo para desenvolvimento de drogas anti-parasitárias, uma vez que sua expressão parece ser determinante para o desenvolvimento de *H. contortus* e não está relacionada ao desenvolvimento de resistência ao monepantel, de maneira que teriam ação terapêutica tanto contra parasitas sensíveis quanto resistentes a esse fármaco.

6.3. Modificações de histonas em *Haemonchus contortus*

As modificações de histonas, como acetilação, metilação, fosforilação, biotinição e ubiquitinação, ocorrem na extremidade N-terminal das histonas, sendo as duas primeiras as mais estudadas e bem descritas. De forma geral, a metilação de lisina pode causar ativação ou repressão da transcrição, enquanto a metilação de arginina normalmente ativa a transcrição. Já a hiperacetilação das histonas geralmente resulta na ativação de genes reprimidos, e a hipoacetilação resulta no silenciamento de genes (MATHEWS; JANUSEK, 2011; HARDY; TOLLEFSBOL, 2011; NICIURA, 2015).

Já foram identificadas aproximadamente 100 marcas de histonas (GIRGIS; VELASCO; REYES, 2018), e a combinação dessas marcas podem direcionar diferentes respostas biológicas. Ainda não estão estabelecidas quais combinações de modificações de histona geram quais respostas biológicas específicas. Segundo Allis e colaboradores (2007), acetilação está associada à ativação da transcrição, podendo ter uma função adicional de deposição de histonas (H4K5 e H4K12) ou reparo de DNA (H3K14, H3K18, H4K5, H4K8 e H4K12). Já a metilação de:

- H3K9, leva à formação de heterocromatina e silenciamento gênico ou repressão da transcrição;
- H3K4, H3K36 e H3K79, ativam a transcrição;
- H4K20, leva à uma reposta de reparo do DNA ou reprime a transcrição, dependendo da enzima responsável pela metilação;
- e H3K27, causa silenciamento gênico.

As ilhas CpG, os promotores e os elementos repetitivos apresentam padrões específicos de modificações de histona e estados de cromatina (ZHOU; GOREN; BERNSTEIN, 2011). H3K4me3 e H3K79me2 tendem a aparecer em promotores ativos; H3K36me3, H3K79me1, H3K79me2 e H4K8ac marcam regiões codificadoras ativas; H4K12ac, H3K14ac, H3K27me3 e H2AK5ac marcam regiões codificadoras de genes inativos (GIRGIS; VELASCO; REYES, 2018).

Já foi relatada a ocorrência de modificações de histonas nos nematoides *C. elegans* (KISHIMOTO; UNO; NISHIDA, 2018; TABUCHI *et al.*, 2018; WEINHOUSE *et al.*, 2018) e *Pristionchus pacificus* (SOMMER *et al.*, 2017; WERNER *et al.*, 2018). Já em *H. contortus* existem 11 proteínas já anotadas como acetilases, desacetilase e metiltransferase de histona. Porém, essas anotações foram baseadas em similaridade de sequências, e não há nenhum estudo que comprove a presença desse mecanismo epigenético nesse parasita.

A partir das investigações *in silico* realizadas neste trabalho, foram obtidas proteínas ortólogas às principais enzimas modificadoras de histonas (HAT, HDAC, HMT e HDM). Isso indica ocorrência desse tipo de evento epigenético em *H. contortus*, o que foi comprovado pela realização de ELISA para modificações de histona H3 com proteínas extraídas de larvas infectantes desse nematoide. A partir desse ensaio foi visto que, nesse estágio, a modificação mais predominante em relação às demais é a H3K79me1. Como já citado, essa modificação está associada a regiões codificantes de genes ativos (GIRGIS; VELASCO; REYES, 2018).

Para analisar a expressão de genes potencialmente relacionados à maquinaria epigenética, os genes HCON_00060880 (aqui referido como *tfjmj*), que codifica o *Transcription factor jumonji domain containing protein* (TFJMJ) (CDJ92265.1), e HCON_00088930 (aqui referido com *hmt*), que codifica a proteína *Histone-lysine N-methyltransferase SETMAR* (HMT SETMAR) (CDJ86632.1), foram escolhidos após um experimento desenvolvido paralelamente em nosso laboratório (NICIURA *et al.*, 2018). A proteína *Transcription factor jumonji domain containing protein* (TFJMJ)

possui um domínio JmjC, também apresentado pelas desmetilases de lisinas 2 a 7 (KDM 2-7), que catalisam a desmetilação de lisinas mono-, di- e trimetiladas em vários sítios (THINNES *et al.*, 2014). Esse domínio da proteína PHF8 de humanos e da proteína KIAA1718 de *C. elegans* é responsável pela desmetilação de H3K9me2 e H3K27me2 (SUGANUMA; WORKMAN, 2011). Já em relação à *Histone-lysine N-methyltransferase SETMAR* (HMT SETMAR) (CDJ86632.1), não foi possível obter mais informações, uma vez que essas encontram-se obsoletas nos bancos de dados WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/>), devido à publicação de nova versão do genoma de *H. contortus*.

Foi verificada variação significativa da expressão de ambos os genes durante o desenvolvimento de *H. contortus*. Foi vista redução significativa da expressão tanto do gene *hmt* quanto *tfjnj* no grupo de larvas L3 em relação ao grupo de ovos e de adultos. Portanto, esses genes seguem o mesmo padrão do grupo de genes evidenciados por Schwarz e colaboradores (2013) e provavelmente estão relacionados à adaptação às alterações ambientais.

Também foi encontrado aumento significativo de expressão de *hmt* no grupo de adultos fêmeas em comparação ao grupo de machos. O mesmo não foi visto para o gene *tfjnj*. Schwarz *et al.* (2013) relataram que o início da fase de reprodução de *H. contortus* adulto é marcado pela transcrição regulada de genes relacionados ao sexo e identificaram um grupo de genes transcritos diferencialmente entre machos e fêmeas, assim como o gene *hmt* analisado no presente estudo. Segundo Das *et al.* (2017), os eventos epigenéticos ligados à espermatogênese são condensação do cromossomo, silenciamento por transposons e metilação do DNA. Não há nenhuma associação com metilação ou desmetilação de histonas. Já a oogênese está vinculada à desacetilação de H4K16, à organização da cromatina, à metilação de H3K9me1 e H3K9me2 e à ubiquitinação de H2A, o que pode explicar o aumento do nível de transcritos da provável metiltransferase de histonas (*hmt*) observado no grupo de fêmeas.

Já em relação à resistência ao monepantel, não foi observada diferença significativa do nível de transcritos de *hmt* e *tfjnj* entre os grupos de L3 sensíveis e resistentes ao monepantel, indicando que não há associação entre a expressão de *hmt* e *tfjnj* e o desenvolvimento de resistência ao monepantel; apesar desses genes terem sido escolhidos pela identificação, em estudo genômico, de um SNP não-

sinônimo (no *Scaffold* 435, posição 12807, G>T) no gene *tfjnj*, e dois SNPs não-sinônimos (no *Scaffold* 2249, posição 8494 G>C e posição 8527, T>A) no gene *hmt* (NICIURA *et al.*, 2018).

Modificações pós-traducionais de histonas podem fornecer aos parasitas, em geral, a capacidade de se adaptar rapidamente às alterações de expressão gênica necessárias para seu desenvolvimento e adaptação ao ambiente dentro do hospedeiro (GUIDI *et al.*, 2018) e são, portanto, essenciais. Inibidores de HDAC (GUIDI *et al.*, 2018) e de HDM (PADALINO *et al.*, 2018) estão sendo estudados como alvo para combater a esquistossomose, uma vez que foi relatado que o desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* é regulado por processos epigenéticos (GEYER; HOFFMANN, 2012). Para o controle da malária, estão sendo analisados os efeitos de inibidores de HDAC (DIEDRICH *et al.*, 2018); e para a formulação de drogas contra o *Trypanosoma cruzi*, inibidores de HDAC são os potenciais alvos (CAMPO, 2016; ZUMA; DE SOUZA, 2018), pois afetam a replicação, a diferenciação, a infectividade e a expressão dos genes desse parasita.

Como foi visto neste trabalho, a expressão dos genes identificados como codificadores de potencial metiltransferase (*Histone-lysine N-methyltransferase SETMAR*) e desmetilase de histona (*Transcription factor jumonji domain containing protein*) em *H. contortus* parece ser determinante para o seu desenvolvimento e adaptação aos diferentes ambientes (dentro e fora do hospedeiro) e poderiam ser alvos para o desenvolvimento de drogas contra o *H. contortus*.

6.4. Caracterização dos isolados resistentes estudados quanto à retenção do íntron 15 e exclusão do éxon 12 no mRNA do gene *mpt11* e quanto à expressão desse gene em *Haemonchus contortus*

O *H. contortus* já adquiriu resistência a todas as classes de anti-helmínticos desenvolvidas (KOTZE; PRICHARD, 2016), sendo a espécie parasita que a desenvolve de forma mais rápida (KAPLAN, 2004; GILLEARD, 2013). Vários pesquisadores objetivam entender molecularmente o mecanismo de aquisição da resistência anti-helmíntica ao monepantel. Utilizando mutagênese e recombinação genética em *C. elegans*, Kaminsky *et al.* (2008) identificaram o gene *acr-23* como o maior contribuinte para a resposta aos derivados de aminoacetona (ADDs).

Posteriormente, foi encontrado o gene homólogo ao *acr-23* em *H. contortus*: *Hco-mptl-1* (RUFENER *et al.*, 2009), que codifica a subunidade MPTL-1 (564 aminoácidos) do receptor nicotínico nAChR da subfamília DEG-3, assim como a proteína codificada pelo gene *acr-23* de *C. elegans*. O monepantel liga-se à essa subunidade, levando à abertura do receptor de maneira irreversível (BAUR *et al.*, 2015).

Bagnall *et al.* (2017) recentemente relataram alterações na sequência do gene *mptl1* ou no processamento do mRNA que estão associadas à resistência ao monepantel:

- Retenção do íntron 15 (alteração mais frequente), o que leva à formação de um *stop codon* logo no início desse íntron, gerando uma proteína truncada com 448 aminoácidos (aa);
- Exclusão do éxon 12, resultando na perda do domínio transmembrana 3 e na produção de uma proteína com 537 aa;
- Exclusão do éxon 4 e conseqüente formação de um *stop codon* no início do éxon 5 e perda de todos os domínios transmembrana. A proteína resultante apresenta 88 aa;
- Deleção de 2 nucleotídeos na junção éxon 15 – éxon 16, levando à formação de um *stop codon* e perda do domínio transmembrana 4. A proteína codificada tem 447 aa;
- Transversão no éxon 7 e conseqüente formação de um *stop codon*, perda de todos os domínios transmembrana e geração de uma proteína com 148 aa;
- Deleção de nucleotídeo único no éxon 7, formando um *stop codon* e resultando numa proteína truncada de 158 aa sem nenhum domínio transmembrana.

Neste trabalho, foi realizada a caracterização de isolados resistentes ao monepantel em relação às duas primeiras mutações. Os resultados mostraram que a resistência das populações de *H. contortus* em estudo possivelmente não foi causada pela retenção do íntron 15 nem pela exclusão do éxon 12 no processamento do mRNA do gene *mptl1* e nem pela alteração dos níveis de expressão desse gene. Porém existem inúmeras outras mutações descritas que

podem ter conduzido ao fenótipo de resistência nesse parasita, como as demais descritas por BAGNALL *et al.*, 2017 e também a exclusão de ambos os éxons 2 e 3, a exclusão do éxon 4, a exclusão parcial dos éxons 4 e 15, a transversão no éxon 6, a exclusão do éxon 8 e a inserção de 135 pb na região 5' UTR (RUFENER *et al.* 2009), dentre outras mutações já relatadas.

Além disso, mutações ou alteração de expressão em outros genes também podem ser responsáveis pela resistência ao monepantel nos isolados de *H. contortus* avaliados no presente estudo.

7. CONCLUSÕES

Estudar os eventos epigenéticos em parasitas como *Haemonchus contortus*, cuja dificuldade de controle persiste há muito tempo e até hoje causa prejuízos sanitários e econômicos, permite que tais mecanismos tornem-se alvos de novas drogas anti-parasitárias, assim como tem sido feito para a esquistossomose, a malária e a tripanossomíase americana ou doença de Chagas. Este trabalho contribuiu para a investigação da ocorrência de maquinaria epigenética de metilação do DNA e de modificações de histona em *H. contortus* e de seu envolvimento tanto no ciclo de vida desse parasita, quanto no desenvolvimento de resistência ao monepantel, anti-helmíntico que surgiu recentemente como uma solução para rebanhos de pequenos ruminantes que apresentavam multiresistência aos demais anti-helmínticos.

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, concluímos que:

- Investigações *in silico* sugerem que não há ocorrência de metilação de DNA em *H. contortus*;
- Investigações *in silico* sugerem a ocorrência de metilação de tRNA e de modificações de histonas em *H. contortus*;
- Entre 15 padrões avaliados, a modificação de histona H3 mais abundante em *H. contortus* no estágio de larva infectante (L3) foi H3K79me1, e as presentes em menor proporção foram H3K27me2, H3K27me3 e H3K56ac;
- Os níveis de expressão dos genes *dnmt*, *hmt* e *tfjmj* envolvidos na maquinaria epigenética sofrem alterações durante o ciclo de vida de *H. contortus*;
- Fêmeas adultas de *H. contortus* apresentam maiores níveis de expressão dos genes *dnmt* e *hmt* que machos adultos;
- O estado de resistência ao monepantel não afeta a expressão dos genes *mptl1*, *dnmt*, *hmt* e *tfjmj* em larvas L3 de *H. contortus*;
- A resistência ao monepantel nos isolados de *H. contortus* em estudo não foi causada pela retenção do íntron 15 ou pela exclusão do éxon 12 no processamento do mRNA do gene *mptl1* e nem pela alteração nos níveis de expressão desse gene.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para continuação desse trabalho, com o objetivo de estudar alvos epigenéticos como alvo de novas drogas para combater o parasita *H. contortus*, são necessários ainda alguns experimentos.

Inicialmente, seria interessante encontrar quais mutações estão associadas ao grupo resistente de *H. contortus* ao monepantel estudado neste trabalho, a fim de compreender melhor o mecanismo de desenvolvimento de resistência e contribuir com os dados de mutações associadas à resistência ao monepantel novas ou já descritas. Essa investigação pode ser feita pelo sequenciamento do gene *mpt11*, frequentemente estudado por sua relação com a resistência a esse fármaco, ou de outros genes importantes já relatados.

Também seria interessante avaliar o nível de conteúdo proteico das proteínas potencialmente da maquinaria epigenética de *H. contortus* aqui estudadas, a fim de avaliar se o padrão de tradução reflete os resultados obtidos do nível de transcritos descritos nesta dissertação, uma vez que pode ocorrer degradação proteica ou aumento de tradução devido à aumento de estabilidade do mRNA. O nível de conteúdo proteico pode ser avaliado por Western Blot, por exemplo.

Após verificação do nível de tradução, seria necessário identificar inibidores da atividade dessas proteínas e realizar experimentos para certificar se ocorre essa inibição em *H. contortus in vitro*.

Por fim, para a formulação de drogas epigenéticas, é essencial encontrar métodos de transporte da substância inibidora especificamente para o nematoide, a fim de minimizar os efeitos de toxicidade para o hospedeiro.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS E LINKS

- ABONGWA, M. *et al.* Monepantel is a non-competitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors from *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 1, p. 36-42, Dez. 2017. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2017.12.001.
- ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- ADELSBERGER, H.; LEPIER, A.; DUDEL, J. Activation of rat recombinant alpha(1)beta(2)gamma(2S) GABA(A) receptor by the insecticide ivermectin. **European Journal of Pharmacology**. v. 394, p. 163–170, Abr. 2000. DOI: 10.1016/S0014-2999(00)00164-3.
- ALBUQUERQUE, A. C. A. *et al.* Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or targeted selective treatment with monepantel. **Veterinary Parasitology**, v. 246, p. 112-117, Nov. 2017. DOI: 10.1016/j.vetpar.2017.09.010.
- ALLIS *et al.* New Nomenclature for Chromatin-Modifying Enzymes. **Cell**, v. 131, p. 633-636, Nov. 2007.
- AMARANTE, A. F. T. *et al.* Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, p. 31-38, 1992. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.1992.51949.
- ATHAYDE, A. C. R. *et al.* Difusão do uso de plantas medicinais anti-helmínticas na produção de caprinos do sistema de produção da região de Patos, PB. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA BELO HORIZONTE, 2., 2004, Belo Horizonte. **Anais [...]**. Belo Horizonte: UFCG, 2004.
- ATHAYDE, A. C. R. *et al.* **Manual de alimentação e controle parasitológico com plantas medicinais para a caprinovinocultura**. Campina Grande: SEBRAE / PB / UFCG, 2005. p. 43.
- BAGNALL, N. H. *et al.* Mutations in the Hco-mptl-1 gene in a field-derived monepantel-resistant isolate of *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 2, p. 236-240, Ago. 2017. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2017.05.001.
- BAUR, R. *et al.* Monepantel Irreversibly Binds to and Opens *Haemonchus contortus* MPTL-1 and *Caenorhabditis elegans* ACR-20 Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 87, p. 96 – 102, Jan. 2015. DOI: 10.1124/mol.114.095653.
- BEECH, R. N. *et al.* Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? **Parasitology**, v. 138, n. 2, p. 160-174, Fev. 2011. DOI: 10.1017/S0031182010001198.
- BEECH, R. N. Understanding genetic linkage in the selection of anthelmintic resistance. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15., 2008, Curitiba. **Anais [...]**. Curitiba, 2008. p. 74-78.

- BERGER, S. L. *et al.* An operational definition of epigenetics. **Genes & Development**, v. 23, n. 7, p. 781-783, Abr. 2009. DOI: doi: 10.1101/gad.1787609.
- BESIER, R. B. *et al.* The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 95-143, Maio. 2016. DOI: 10.1016/bs.apar.2016.02.022.
- BIRD, A. P. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 7, p. 1499-1504, Abr. 1980.
- BLACKHALL, W. J.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 1-2, p. 101-107, Mar. 2008. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.12.001.
- BLOMEN, V. A.; BOONSTRA, J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 1, p. 27-44, Jan. 2011. DOI: 10.1007/s00018-010-0505-5.
- BOUCHUT, A. *et al.* Identification of novel quinazoline derivatives as potent antiplasmodial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 161, p. 277-291, Jan. 2019. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.10.041.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, Maio 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- CAMPO, V. A. Comparative effects of histone deacetylases inhibitors and resveratrol on *Trypanosoma cruzi* replication, differentiation, infectivity and gene expression. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 1, p. 23-33, Dez. 2016. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2016.12.003.
- CASEY, S. J. ***Haemonchus contortus* Infections in alpacas and sheep**. 2014. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas e Veterinárias) - Virginia State University, Petersburg, 2014.
- CAVALCANTE, C. R. C. *et al.* **Doenças parasitárias de ovinos e caprinos: epidemiologia e controle**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 603 p.
- CHAGAS, A. C. S. *et al.* *Haemonchus contortus*: a multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International**, v. 62, n. 1, p. 1-6, Fev. 2013. DOI: 10.1016/j.parint.2012.07.001.
- CINTRA, M. C. *et al.* Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 216, p. 4-6, Jan. 2016. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.11.013.

- COLES, G. C. *et al.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3-4, p.167-185, Mar. 2006. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.11.019.
- COLES, G. C. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n. 1-2, p. 35-44, Set. 1992.
- COSTA, C.A.F.; VIEIRA, L.S. **Controle de nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos do estado do Ceará**. Sobral. Embrapa – CNPC (EMBRAPA-CNPC. Comunicado Técnico, 13), 1984. p. 6.
- COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 65-71, Jan. 2011. DOI: 10.1590/S0100-736X2011000100010.
- CULLY, D.F. *et al.* Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 371, n.6499, p. 707–711, Out. 1994. DOI: 10.1038/371707a0.
- DAS, L. *et al.* Epigenetics of reproductive infertility. **Frontiers In Bioscience (Scholar Edition)**, v. 9, p. 509-535, Jun. 2017.
- DEY, A. R. *et al.* Genetic diversity patterns of *Haemonchus contortus* isolated from sheep and goats in Bangladesh. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 68, p. 177–184, Dez 2018. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.12.021.
- DIEDRICH, D. *et al.* One-pot, multi-component synthesis and structure-activity relationships of peptoid-based histone deacetylase (HDAC) inhibitors targeting malaria parasites. **European journal of medicinal chemistry**, v. 158, p.801-813, Out. 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.09.018.
- ECHEVARRIA, F. A. M. Resistência anti-helmíntica. *In*: CHARLES, T. P. **Controle dos nematódeos gastrintestinais**, Juiz de Fora: Terezinha Padilha, 1996. p. 53-76.
- ECHEVARRIA, F.M.A.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.39, n.3-4, p.279–284, Fev. 1991. DOI: 10.1016/0304-4017(91)90044-V.
- ELANGO, N. *et al.* DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 27, p. 11206–11211, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0900301106.
- EMERY, D. L.; HUNT, P. W.; JAMBRE, L. F. L. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 12, p. 755-769, Nov. 2016. DOI: 10.1016/j.ijpara.2016.07.001.
- FAO. Production of Meat, sheep in Brazil. FAO, 2017. Disponível em: www.fao.org/faostat/en/#data/QL/visualize. Acesso em: 18 fev 2019.

FINGERMAN, I. M. *et al.* NCBI Epigenomics: What's new for 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D221–D225, Jan. 2013. DOI: 10.1093/nar/gks1171

FLÁVIA DA SILVA, F. *et al.* Resistência de nematódeos a cinco classes de anti-helmínticos em rebanhos de ovinos naturalmente infectados no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 423-429, Out./Dez. 2018. DOI: 10.1590/S1984-296120180071. ISSN 0103-846X.

FNEICH, S. *et al.* 5-methyl-cytosine and 5-hydroxy-methyl-cytosine in the genome of *Biomphalaria glabrata*, a snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 167, Jun. 2013. DOI: 10.1186/1756-3305-6-167.

GALLO, S. B. O mercado da carne ovina. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 4, n. 1, Jan-Jun. 2007. 3 p.

GAO, F. *et al.* Differential DNA methylation in discrete developmental stages of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. **Genome Biology**, v. 13, p. R100, Out. 2012. DOI: 10.1186/gb-2012-13-10-r100.

GAVERY, M. R.; ROBERTS, S. B. DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **BCM Genomics**, v. 11, p. 483, Ago. 2010. DOI: 10.1186/1471-2164-11-483.

GEORGE, S. D. *et al.* The comparative efficacy of abamectin, monepantel and an abamectin/derquantel combination against fourth-stage larvae of a macrocyclic lactone resistant *Teladorsagia spp.* isolate infecting sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n1-2, p. 190-193, Ago. 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.03.001.

GEYER, K. K.; HOFFMANN, K. F. Epigenetics: a key regulator of platyhelminth developmental biology? **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 3, p. 221-224, Mar. 2012. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.02.003.

GIANLORENÇO, V. K. **Produção de carne ovina pode ser mais rentável que bovina**. SEBRAE SP, 2013. Disponível em: <http://www.sebraesp.com.br/index.php/165-produtos-online/administracao/publicacoes/artigos/8030-producao-de-carne-ovina-pode-ser-mais-rentavel-que-bovina>. Acesso em: 01 dez. 2014.

GILLEARD, J. S. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. **Parasitology**, v. 140, n. 12, p. 1506-1522, Out. 2013. DOI: 10.1017/S0031182013001145.

GILLEARD, J. S. Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 12, p. 1227-1239, Out. 2006. DOI: 10.1016/j.ijpara.2006.06.010.

GIRÃO, E. S.; MEDEIROS, L. P.; GIRÃO, R. N. Ocorrência e distribuição estacional de helmintos gastrintestinais de caprinos no município de Teresina, Piauí. **Ciência Rural**, v. 22, n. 2, p. 197-202, 1992. DOI: 10.1590/S0103-84781992000200013.

GIRGIS, H. Z.; VELASCO, A.; REYES, Z. E. HebbPlot: an intelligent tool for learning and visualizing chromatin mark signatures. **BMC Bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 310, Set. 2018. DOI:10.1186/s12859-018-2312-1

GLASTAD, K. M. *et al.* DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era. **Insect Molecular Biology**, v. 20, n. 5, p. 553-565, Out. 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2011.01092.x.

GOLL, M. G. *et al.* Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. **Science**, v. 311, p. 395-398, 2006. DOI: 10.1126/science.1120976.

GOPAL, R. M.; POMROY, W. E.; WEST, D. M. Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectina. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 5, p. 781-786, Maio 1999.

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à genética**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

GUIDI, A. *et al.* Identification of novel multi-stage histone deacetylase (HDAC) inhibitors that impair *Schistosoma mansoni* viability and egg production. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 668, Dez. 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-3268-8.

HAMER, K. *et al.* Lack of efficacy of monepantel against trichostrongyle nematodes in a UK sheep flock. **Veterinary Parasitology**, v. 257, p. 48-53, Jun. 2018. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.05.013.

HANSEN, J.; PERRY, B. The Epidemiology, Diagnosis and Control of Helminthes Parasites of Ruminants. Ethiopia: International Livestock Centre for Africa Addis Ababa, 1994.

HARDY, T. M.; TOLLEFSBOL, T. O. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. **Epigenomics**, v. 3, n. 4, p. 503-518, Ago. 2011. DOI: 10.2217/epi.11.71.

HEWEZI, T. *et al.* Cyst Nematode Parasitism Induces Dynamic Changes in the Root Epigenome. **Plant Physiology**, v. 174, n. 1, p. 405-420. Maio, 2017. DOI: 10.1104/pp.16.01948.

HOLDEN-DYE, L.; WALKER, R. J. Anthelmintic drugs. *In*: THE *C. elegans* RESEARCH COMMUNITY. **WormBook: The Online Review of C. elegans Biology**. Pasadena (CA): WormBook, 2007, doi/10.1895/wormbook.1.143.1, <http://www.wormbook.org>. Acesso em: 26 de Janeiro de 2019.

HOSKING, B. C. *et al.* A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p. 529-532, Jan. 2010. DOI: 10.1007/s00436-009-1636-1.

IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal - PPM. IBGE, 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?edicao=22651&t=sobre>. Acesso em: 12 nov 2018.

JAMES, C. E.; HUDSON, A. L.; DAVEY, M. W. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 7, p. 328-335, Jul. 2009. DOI: 10.1016/j.pt.2009.04.004.

JELTSCH, A. *et al.* Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation. **RNA Biology**, v. 14, n. 9, p. 1108–1123, Maio 2016. DOI: 10.1080/15476286.2016.1191737.

KAMINSKY, R. *et al.* A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. **Nature**, v. 452, n. 7184, p. 176-180, Mar. 2008a. DOI: 10.1038/nature06722.

KAMINSKY, R. *et al.* Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multiresistent nematodes of sheep. **Parasitology Research**, v. 109, n. 1, p. 19-23, Jul. 2011. DOI: 10.1007/s00436-010-2216-0.

KAMINSKY, R. *et al.* Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. **Parasitology Research**, v. 103, n. 4, p. 931-939, Set. 2008b. DOI: 10.1007/s00436-008-1080-7.

KAMINSKY, R. *et al.* Worms - a "license to kill". **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 3-4, p. 286-291, Ago. 2013. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.04.009.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 477-481, Out. 2004. DOI: 10.1016/j.pt.2004.08.001.

KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: global warming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 1-2, p. 70-78, Maio 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.11.048.

KISHIMOTO, S.; UNO, M.; NISHIDA, E. Molecular mechanisms regulating lifespan and environmental stress responses. *Inflammation and Regeneration*, v. 38, p. 22, Dez. 2018. DOI: 10.1186/s41232-018-0080-y.

KOTZE, A. C. *et al.* Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 3, p. 164-184, Ago. 2014. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2014.07.007.

KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 397-428, 2016. DOI: 10.1016/bs.apar.2016.02.012.

LADOPOULOS, V. *et al.* The Histone Methyltransferase KMT2B Is Required for RNA Polymerase II Association and Protection from DNA Methylation at the MagohB CpG Island Promoter. **Molecular and Cellular Biology**, v. 33, n. 7, p. 1383-1393, Abr. 2013. DOI: 10.1128/MCB.01721-12.

LAINING, R. *et al.* The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. **Genome Biology**, v. 14, n.8, p. R88, Ago. 2013. DOI: 10.1186/gb-2013-14-8-r88.

LANE, J. *et al.* MLA Final Report: Priority List of Endemic Diseases for the Red Meat Industries. Sydney: Meat and Livestock Australia, 2015.

http://www.wormboss.com.au/files/pages/worms/roundworms/the-cost-of-roundworms/B.AHE.0010_Final_Report.pdf. Acesso em: nov 2016.

LECOVÁ, L. *et al.* Monepantel: the most studied new anthelmintic drug of recent years. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1686-1698, Nov. 2014. DOI: 10.1017/S0031182014001401.

LECOVÁ, L. *et al.* Reliable reference gene selection for quantitative real time PCR in *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 201, n. 2, p. 123-127, Jun. 2015. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2015.08.001.

LIEB, J. D. *et al.* Applying whole genome studies of epigenetic regulation to study human disease. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 114, n. 1, p. 1-15, 2006. DOI: 10.1159/000091922.

LITTLE, P. R. *et al.* Efficacy of a combined oral formulation of derquantel-abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1-2, p. 180-193, Set. 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.05.008.

MARTIN, R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. **The Veterinary Journal**, v. 154, n. 1, p. 11-34, 1997.

MATHEWS, H. L.; JANUSEK, L. W. Epigenetics and psychoneuroimmunology: Mechanisms and models. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 1, p. 25-39, Jan. 2011. DOI: 10.1016/j.bbi.2010.08.009.

MCCAVERA, S.; WALSH, T. K.; WOLSTENHOLME, A. J. Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. **Parasitology**, v. 134, n. pt8, p. 1111-1121, 2007. DOI: 10.1017/S0031182007000042.

MEDEROS, A. E.; RAMOS, Z.; BANCHERO, G. E. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 7, p. 598, Dez. 2014. DOI: 10.1186/s13071-014-0598-z.

MILLER, C. M. *et al.* The production cost of anthelmintic resistance in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 376-381, Maio 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.11.063.

MOLENTO, M. B. **Avanços no diagnóstico e controle das helmintoses em caprinos**. I Simpósio Paulista de Caprinocultura, SIMPAC. Multipress, Jaboticabal, p. 101-110, 2005.

MOLENTO, M. B.; NICIURA, S. C. M.; CHAGAS, A. C. S. Protocolos básicos de laboratório para a realização de metodologias fenotípicas e genotípicas. *In*: CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. (Ed.) **Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 117-143.

NICIURA, S. C. M. *et al.* **Análise genômica da resistência ao monepantel e investigação epigenética em *Haemonchus contortus***. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2018. 93p. ISSN 1980-6841.

NICIURA, S. C. M. Modificações epigenéticas I: Conformação da cromatina e modificação do DNA. *In*: NICIURA, S. C. M.; SARAIVA, N. Z. **Epigenética: Bases moleculares, efeitos na fisiologia e na patologia, e implicações para produção animal e vegetal**. 2 ed. Brasília:Embrapa Informação Tecnológica, 2015.

OHGANE, J.; YAGI, S.; SHIOTA, K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. **Placenta**, v. 29, p. S29-S35, Nov. 2008. DOI: 10.1016/j.placenta.2007.09.011.

OLIVEIRA, P. A. *et al.* Doenças parasitárias em bovinos e ovinos no sul do Brasil: frequência e estimativa de perdas econômicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n. 8, p.797-801, 2017. DOI: 10.1590/s0100-736x2017000800003.

OLIVEIRA, S. M. *et al.* Helminhos gastrintestinais em ovinos de corte no Estado de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 37, p. 217, 2001.

PADALINO, G. *et al.* Combining bioinformatics, cheminformatics, functional genomics and whole organism approaches for identifying epigenetic drug targets in *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 559-570, Dez. 2018. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2018.10.005.

PAULSEN, M.; TIERLING, S.; WALTER, J. DNA methylation and the mammalian genome. *In*: TOST, J. **Epigenetics**. Norfolk: Caister Academic Press, 2008. p. 1-21.

PERFUS-BARBEOCH, L. *et al.* Elucidating the molecular bases of epigenetic inheritance in non-model invertebrates: the case of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Frontiers in Physiology**, v. 5, n. 211, p. 211, Jun. 2014. DOI: 10.3389/fphys.2014.00211.

PFAFFL, M. W. *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 509–515, Jan. 2004.

PIERCE, R. J. *et al.* Targeting schistosome histone modifying enzymes for drug development. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 24, p. 3567-3578, 2012. DOI: 10.2174/138161212801327248.

PRICHARD, R. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 54, n. 1-3, p. 259-268, Ago. 1994.

PRICHARD, R. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 9, p. 445-453, Set. 2001.

PRICHARD, R. K.; ROULET, A. ABC transporters and β -tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. **Parasitology**, v. 134, n. pt8, p. 1123-1132, 2007. DOI: 10.1017/S0031182007000091.

REDMAN, E. *et al.* Genetics of mating and sex determination in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **Genetics**, v. 180, n. 4, p. 1877-1887, Dez. 2008. DOI: 10.1534/genetics.108.094623.

REDMAN, E. *et al.* Introgression of Ivermectin Resistance Genes into a Susceptible *Haemonchus contortus* Strain by Multiple Backcrossing. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002534, Fev. 2012. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002534.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, n. 7149, p. 425-432, Maio 2007. DOI: 10.1038/nature05918.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for *Strongyles* infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 99-102, Jan. 1950. DOI: 10.1071/AR9500099.

ROOS, M. H. *et al.* Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 1, p. 109-115, Jan. 2004.

RUFENER, L. *et al.* *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors of the DEG-3 subfamily and their role in sensitivity to monepantel. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000380, Abr. 2009. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000380.

RUFENER, L. *et al.* Phylogenomics of ligand-gated ion channels predicts monepantel effect. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, p. e1001091, Set. 2010. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001091.

SAGER, H. *et al.* Efficacy of monepantel, derquantele and abamectin against adult stages of a multiresistant *Haemonchus contortus* isolate. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 2205-2207, Nov. 2012. DOI: 10.1007/s00436-012-2949-z.

SALES, N.; LOVE, S. Resistance of *Haemonchus* sp. to monepantel and reduced efficacy of a derquantele/abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 193-196, Set. 2016. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.08.016.

SAXONOV, S.; BERG, P.; BRUTLAG, D. L. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 103, p. 1412-1417, Jan. 2006. DOI: 10.1073/pnas.0510310103.

SCHWARZ, E. M. *et al.* The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*. **Genome Biology**, v. 14, p. R89, Abr. 2013. DOI: 10.1186/gb-2013-14-8-r89.

SCOTT, I. *et al.* Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 198, n. 1-2, p. 166-171, Nov. 2013. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.07.037.

SCZESNY-MORAES, E. A.; BIANCHIN, I.; SILVA, K.F. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 229-236, 2010.

SHECHTER, D. *et al.* Extraction, purification and analysis of histones. **Nature Protocols**, v. 2, n. 6, p. 1445-1457, 2007. DOI:10.1038/nprot.2007.202.

SHIMIZU, T.; TAKAHASHI, K.; TOMITA, M. CpG dinucleotide distribution and DNA methylation. **Genome Informatics**, v.7, p.186-187, 1996.

SOMMER, R. J. *et al.* The genetics of phenotypic plasticity in nematode feeding structures. **Open Biology**, v. 7, n. 3, p. 160332-160338, Mar. 2017. DOI: 10.1098/rsob.160332.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

SUGANUMA, T.; WORKMAN, J. L. Signals and Combinatorial Functions of Histone Modifications. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, p. 473–499, Abr. 2011. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061809-175347.

SUZUKI, M. M. *et al.* CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome. **Genome Research**, v. 17, p. 625– 631, Maio 2007. DOI: 10.1101/gr.6163007.

TABUCHI, T. M. *et al.* *Caenorhabditis elegans* sperm carry a histone-based epigenetic memory of both spermatogenesis and oogenesis. **Nature Communications**, v. 9, p. 4310, Out. 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-06236-8.

THINNES, C. C. *et al.* Targeting histone lysine demethylases — Progress, challenges, and the future. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 12, p. 1416-1432, Dez. 2014. DOI: 10.1016/j.bbagr.2014.05.009.

TOST, J. **Epigenetics**. Norfolk: Caister Academic Press, 2008.

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

URQUHART, G. M. *et al.* **Parasitologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

VAN DEN BROM, R. *et al.* *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 3-4, p. 278-280, Abr. 2015. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.02.026.

VAN WYK, J. A.; MALAN, F. S.; RANGLES, J. L. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the anthelmintics? **Veterinary Parasitology**, v. 70, n. 1-3, p. 111-122, 1997. DOI: 10.1016/S0304-4017(96)01147-8.

VERÍSSIMO, C. J. *et al.* Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1-2, p. 209-216, Jun. 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.01.013.

WALLER, P. J. From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 1-3, p. 1-14, Jun. 2006. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.02.036.

WANG, F. *et al.* Identification of differentially expressed proteins between free-living and activated third-stage larvae of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 72–77, Jan. 2016. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.10.030.

WEBER, M. *et al.* Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. **Nature Genetics**, v. 39, p.457– 466, Abr. 2007. DOI: 10.1038/ng1990.

WEINHOUSE, C. *et al.* *Caenorhabditis elegans* as an emerging model system in environmental epigenetics. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 59, n. 7, p. 560-575, Ago. 2018. DOI: 10.1002/em.22203.

WERNER, M. S. *et al.* Young genes have distinct gene structure, epigenetic profiles, and transcriptional regulation. *Genome Research*, v. 28, n. 11, p. 1675-1687, Nov. 2018. DOI: 10.1101/gr.234872.118.

WOLSTENHOLME, A. J.; KAPLAN, R. M. Resistance to macrocyclic lactones. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 873-887, Maio 2012.

ZHOU, V. W.; GOREN, A.; BERNSTEIN, B. E. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 7–18, Nov. 2011.

ZUMA, A. A.; DE SOUZA, W. Histone deacetylases as targets for antitrypanosomal drugs. **Future Science O A**, v. 4, n. 8, p. FSO325, Set. 2018. DOI: 10.4155/fsoa-2018-0037.

ANEXO 1 - Protocolos no. 06/2015 e no. 03/2017 do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Pecuária Sudeste com aprovação dos experimentos realizados no presente projeto.

Embrapa

Pecuária Sudeste

DECLARAÇÃO

PRT 06/2015

Declaramos que o projeto intitulado: Genômica da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus* e investigação de metilação do DNA, sob responsabilidade da pesquisadora científica Simone Cristina Méo Niciura, usará ovinos (*Ovis aries*) e está de acordo com os princípios éticos e de experimentação animal da Embrapa Pecuária Sudeste e foi aprovado pela referida instituição para ser executado.

(We hereby declare that the research: Genomics of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* and evidences for DNA methylation, utilizing *Ovis aries* species, under the responsibility of the scientific researcher Simone Cristina Méo Niciura, is in agreement with ethical principles of animal experimentation of Embrapa Southeast Livestock and was approved to be carried out at that institution).

São Carlos, 07 de dezembro de 2015.



Dra. Márcia Cristina de Serpá Oliveira
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecuária Sudeste

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rod. Washington Luiz, km 234 - Caixa Postal 339 13560-970 São Carlos, SP
Telefone (16) 3411-56100 - Fax (16) 3361-5754

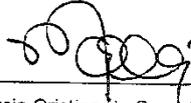
Embrapa
Pecuária Sudeste

CERTIFICADO

PRT Nº 03/2017

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **ATIVIDADE DE INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA AO MONEPANTEL EM *Haemonchus contortus* POR RETROCRUZAMENTO**, registrado com o nº 03/2017 sob a responsabilidade do pesquisador científico Simone Cristina Méo Niciura, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE.

São Carlos,



Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Embrapa Pecuária Sudeste

Reunião de ___/___/___

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril/2017 a abril/2018
Espécie/inhagem/raça	Ovinos de qualquer raça
Nº de animais	6
Peso/Idade	qualquer
Sexo	qualquer
Origem	CPPSE

APÊNDICE 1 - Proteínas de *Haemonchus contortus* ortólogas a metiltransferases de DNA (DNMT1 e DNMT2) e a acetilases (HAT), desacetilases (HDAC), metiltransferases (HMT) e desmetilases (HDM) de histonas de outros organismos.

	Nome da proteína ortóloga	Número de Acesso	Média de cobertura do query	Média E-value	Média da Identidade
DNMT 1	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ89420.1	4,33%	1,30E-07	51,33%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ97781.1	4,33%	1,29E-07	51,33%
DNMT 2	Bacterial Fmu (Sun) eukaryotic nucleolar NOL1 Nop2p domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ84684.1	26,00%	2,30E-14	32,50%
	DNA methylase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86861.1	91,71%	5,71E-50	38,43%
	Bacterial Fmu (Sun) eukaryotic nucleolar NOL1 Nop2p domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ93297.1	84,50%	6,00E-109	35,00%
	DNA methylase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ94056.1	87,86%	3,00E-50	40,43%
HAT	MOZ SAS protein domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80121.1	50,15%	9,76E-38	45,00%
	Striatin and WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80192.1	30,00%	6,00E-07	32,00%
	Bromodomain and Bromo adjacent region and High mobility group and Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80411.1	12,38%	2,51E-06	35,88%
	WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80537.1	35,00%	3,50E-10	31,50%
	Zinc finger and FY-rich and SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80580.1	4,83%	6,25E-15	32,00%
	NLE and WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80658.1	40,00%	5,15E-09	31,00%
	unnamed protein product [Haemonchus contortus]	CDJ81308.1	46,00%	2,00E-08	33,00%
	WD40 repeat and Ubiquitin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ81680.1	44,00%	1,94E-14	32,00%
	Methyl-CpG DNA binding and Zinc finger and Bromodomain domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ81806.1	10,86%	1,43E-06	32,57%
	ATPase and Bromodomain domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ82015.1	6,75%	2,98E-06	38,50%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ82530.1	4,83%	2,25E-25	46,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ82848.1	4,00%	1,00E-06	32,00%
	SAC3 GANP Nin1 mts3 eIF-3 p25 and WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ82924.1	17,00%	3,00E-06	33,00%

HAT	bZIP transcription factor domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ82934.1	15,00%	3,00E-06	30,00%
	GCN5-related N-acetyltransferase and 7TM GPCR domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ82998.1	69,00%	8,82E-15	33,83%
	Bromodomain domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ83308.1	15,67%	1,00E-06	33,00%
	WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ84233.1	42,00%	9,93E-08	32,00%
	MOZ SAS protein domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ84270.1	51,34%	1,22E-44	41,12%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ84644.1	2,00%	6,00E-07	42,00%
	MOZ SAS protein domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ85321.1	36,41%	1,28E-21	42,85%
	Zinc finger and Bromodomain domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ85682.1	10,00%	5,00E-06	37,00%
	Enhancer of polycomb and Zinc finger and Bromodomain domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ85791.1	16,00%	2,00E-08	42,00%
	Transcription factor jumonji and AT-rich interaction region and Zinc finger and PLU-1 domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ85821.1	2,17%	6,20E-08	43,50%
	MOZ SAS protein domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86117.1	28,24%	1,71E-21	39,32%
	ATPase and Bromodomain domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86129.1	6,75%	4,28E-06	38,50%
	WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86974.1	31,50%	4,90E-06	31,50%
	Domain of unknown function DUF1899 and WD40 repeat and Domain of unknown function DUF1900 domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ87688.1	40,00%	8,00E-09	30,00%
	WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ87710.1	37,00%	3,00E-09	30,00%
	MOZ SAS protein domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ88391.1	46,93%	2,44E-44	42,39%
	unnamed protein product [Haemonchus contortus]	CDJ88556.1	20,00%	3,00E-06	30,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ89235.1	4,00%	3,00E-06	32,00%
	MOZ SAS protein domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ89485.1	18,94%	1,12E-14	39,06%
	MOZ SAS protein domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ89486.1	24,00%	1,71E-18	41,61%
	unnamed protein product [Haemonchus contortus]	CDJ89524.1	36,00%	2,00E-06	30,00%
	Zinc finger and Bromodomain domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ90447.1	11,17%	1,83E-08	36,67%
	Bromodomain and Bromo adjacent region and High mobility group and Zinc finger domain containing protein	CDJ90639.1	14,50%	1,50E-08	36,50%

HAT	[Haemonchus contortus]				
	unnamed protein product [Haemonchus contortus]	CDJ90920.1	12,00%	5,63E-13	38,63%
	Histone acetyl transferase HAT1 N-terminal domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ90945.1	75,50%	1,25E-26	32,75%
	PCAF and GCN5-related N-acetyltransferase and Bromodomain domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ91179.1	65,33%	6,67E-73	39,50%
	WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ91700.1	43,33%	3,33E-09	32,67%
	Zinc finger and FY-rich and SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ92627.1	4,83%	1,05E-14	32,00%
	WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ92807.1	26,00%	2,00E-06	34,00%
	Transcription factor jumonji and AT-rich interaction region and Zinc finger and PLU-1 domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ93247.1	2,17%	3,68E-08	44,50%
	Bromodomain domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ94061.1	21,00%	7,00E-09	34,00%
	WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ94434.1	26,00%	2,00E-06	34,00%
	Zinc finger and Coactivator CBP and Protein of unknown function DUF902 and Transcriptional coactivation domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ94575.1	37,60%	1,14E-56	39,50%
	WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ95107.1	51,00%	2,00E-07	34,00%
	SAC3 GANP Nin1 mts3 eIF-3 p25 and WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ95536.1	17,00%	3,00E-06	33,00%
	WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96041.1	42,00%	9,93E-08	32,00%
	CHD and Zinc finger and Chromo and SNF2-related and DNA RNA helicase and Protein of unknown function DUF1087 and Protein of unknown function DUF1086 domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96229.1	6,00%	5,00E-07	30,00%
	WD40 repeat and Ubiquitin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96522.1	51,00%	3,00E-19	30,00%
	Glutamine-Leucine-Glutamine and HSA and BRK and SNF2-related and DNA RNA helicase and Bromodomain domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96560.1	8,50%	6,08E-08	37,50%
	remodeling and spacing factor 1 [Haemonchus contortus]	CDJ96686.1	2,00%	3,88E-06	40,00%
	WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ97998.1	37,00%	3,00E-09	30,00%
	Methyl-CpG DNA binding and Zinc finger and Bromodomain domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ98025.1	10,86%	1,29E-06	32,43%
WD40 repeat domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ98211.1	42,50%	5,00E-08	31,00%	

HDAC	MRG domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ82581.1	5,00%	9,00E-06	40,00%
	Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH and Histone deacetylase superfamily domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ82874.1	89,00%	4,40E-15	58,08%
	hypothetical protein HCOI_00425600 [Haemonchus contortus]	CDJ83570.1	32,88%	5,02E-07	33,75%
	hypothetical protein LOC100639689 [Haemonchus contortus]	CDJ83713.1	7,00%	8,00E-07	34,00%
	Histone deacetylase superfamily domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ85234.1	92,00%	1,07E-75	39,00%
	NAD-dependent histone deacetylase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86158.1	57,86%	1,53E-54	48,71%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86284.1	8,50%	1,25E-29	49,00%
	Histone deacetylase superfamily domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86285.1	12,90%	9,53E-08	43,19%
	Histone deacetylase superfamily domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86287.1	42,19%	8,37E-16	34,17%
	NAD-dependent histone deacetylase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ89623.1	75,86%	4,00E-50	38,57%
	Sin3 associated polypeptide p18 domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ90399.1	90,17%	6,67E-38	53,33%
	Histone deacetylase superfamily domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ90702.1	64,83%	3,18E-22	49,44%
	Histone deacetylase superfamily domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ90815.1	46,25%	9,39E-25	42,25%
	Histone deacetylase superfamily domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ91130.1	81,35%	5,22E-17	52,37%
	Zinc finger and SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ91299.1	10,50%	5,50E-07	39,00%
	NAD-dependent histone deacetylase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ91305.1	59,14%	4,29E-39	42,43%
	AT-rich interaction region domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ91767.1	7,00%	2,00E-08	32,00%
	Histone deacetylase superfamily domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ92412.1	37,75%	3,00E-29	33,30%
	Zinc finger and Histone deacetylase superfamily domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ93182.1	47,45%	1,36E-30	35,00%
	AT-rich interaction region domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ93448.1	6,50%	1,50E-10	30,00%
Zinc finger and Peptidase C19 domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ95928.1	4,50%	4,40E-08	35,50%	
NAD-dependent histone deacetylase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96917.1	62,14%	4,29E-41	38,29%	
BRCA1-associated 2 and Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ97174.1	7,00%	5,00E-08	33,00%	

HDAC	AT-rich interaction region domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ98208.1	29,50%	9,50E-28	47,00%
HMT	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80232.1	19,00%	7,00E-17	34,00%
	Ankyrin and K Homology domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80356.1	18,00%	6,00E-22	34,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80394.1	17,00%	4,50E-13	37,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80452.1	17,00%	8,50E-14	39,00%
	Zinc finger and FY-rich and SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80580.1	18,10%	7,87E-11	35,60%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80848.1	17,00%	3,00E-10	33,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80858.1	17,00%	9,00E-12	36,00%
	Ankyrin and Death domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ81267.1	19,67%	6,70E-13	34,67%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ81626.1	22,00%	2,00E-21	34,50%
	unknown [Haemonchus contortus]	CDJ81919.1	84,67%	6,77E-64	46,33%
	Ankyrin and Sterile alpha motif SAM domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ82180.1	12,00%	6,00E-15	34,00%
	SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ82291.1	14,00%	6,00E-07	30,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ82435.1	19,00%	4,00E-10	35,00%
	Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ82782.1	6,50%	5,50E-06	33,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ82848.1	3,00%	4,00E-08	48,00%
	Methyl-CpG DNA binding and Pre-SET zinc-binding region and SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ83100.1	18,83%	4,54E-07	38,94%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ83117.1	20,00%	1,00E-12	34,00%
	Methyltransferase type 11 domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ83368.1	35,00%	5,00E-10	30,00%
	Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ83785.1	20,67%	6,77E-16	32,33%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ84025.1	18,50%	1,50E-12	31,00%
	SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ84092.1	20,94%	1,95E-13	35,06%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ84402.1	16,00%	2,00E-08	42,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ84807.1	18,50%	1,00E-16	41,00%
	SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ84839.1	30,00%	6,67E-17	28,67%
	Zinc finger and Homeobox domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ84945.1	19,00%	5,50E-14	38,00%
	SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ85300.1	27,00%	2,38E-06	33,00%
	Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ85337.1	16,67%	4,67E-09	30,67%

HMT	Ankyrin and Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ85556.1	15,67%	3,67E-18	35,67%
	Cytochrome c oxidase copper chaperone and Sec20 and Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ85761.1	20,67%	3,44E-15	34,33%
	Methyl-CpG DNA binding and Pre-SET zinc-binding region and SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ85784.1	18,83%	3,71E-07	38,94%
	Ankyrin and Tyrosine protein kinase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86025.1	17,50%	1,40E-12	31,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86279.1	17,00%	2,00E-09	33,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86607.1	18,00%	8,00E-22	37,00%
	Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86671.1	7,00%	5,00E-11	38,00%
	Ankyrin and Tyrosine protein kinase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86699.1	17,50%	7,00E-13	31,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86723.1	20,00%	3,50E-09	32,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86765.1	17,00%	3,00E-08	47,00%
	SET and Zinc finger and Bromo adjacent region domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86805.1	19,38%	2,02E-08	32,13%
	Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ87188.1	12,50%	2,51E-06	35,00%
	BTB:POZ and Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ87231.1	17,00%	3,00E-08	31,00%
	BTB:POZ and Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ87903.1	17,00%	3,00E-08	31,00%
	SPIa RYanodine receptor SPRY and Beta-lactamase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ88057.1	78,00%	5,67E-97	41,67%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ88226.1	22,00%	5,50E-22	38,00%
	SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ88240.1	27,69%	1,38E-14	34,75%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ88338.1	17,00%	3,00E-15	34,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ88528.1	18,00%	2,00E-13	39,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ88572.1	18,00%	4,50E-13	32,00%
Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ88731.1	18,00%	1,00E-11	36,00%	
RNA recognition motif and SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ89001.1	18,56%	2,78E-11	40,22%	

HMT	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ89235.1	3,00%	5,00E-08	48,00%
	Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ89741.1	8,33%	1,67E-08	40,33%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ89765.1	28,00%	6,50E-17	37,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ90052.1	18,00%	6,00E-12	38,00%
	Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ90057.1	18,00%	6,67E-09	36,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ90160.1	16,00%	2,50E-08	42,00%
	Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ90510.1	18,00%	4,00E-17	31,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ90759.1	17,00%	7,50E-09	30,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ90972.1	21,00%	2,50E-12	36,00%
	Acyl-CoA-binding protein and Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ91638.1	10,50%	7,00E-06	36,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ91784.1	18,00%	5,50E-08	33,00%
	Methyl-CpG DNA binding and Pre-SET zinc-binding region and SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ91851.1	37,44%	1,41E-20	32,00%
	protein arginine N-methyltransferase PRMT1 [Haemonchus contortus]	CDJ91885.1	76,67%	3,34E-58	46,67%
	Chromo domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ92125.1	11,00%	9,00E-06	43,00%
	Ankyrin and ZU5 and Death domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ92148.1	19,33%	1,67E-20	30,67%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ92609.1	19,00%	4,50E-17	35,00%
	Zinc finger and FY-rich and SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ92627.1	18,05%	1,07E-10	35,80%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ92942.1	16,50%	3,00E-09	36,00%
	BTB:POZ and Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ92982.1	19,00%	3,00E-12	31,50%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ93027.1	20,00%	2,00E-11	37,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ93278.1	28,50%	1,00E-17	36,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ93349.1	13,00%	2,00E-05	33,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ94864.1	18,50%	2,50E-10	38,00%
	unnamed protein product [Haemonchus contortus]	CDJ94901.1	6,67%	1,23E-07	34,33%
	Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ94913.1	17,33%	3,17E-14	32,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ95099.1	12,00%	3,00E-09	32,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ95157.1	14,00%	6,50E-09	37,00%
Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ95205.1	16,67%	1,67E-09	30,67%	

HMT	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ95235.1	19,00%	7,00E-11	36,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ95655.1	17,00%	5,50E-14	40,00%
	Methyltransferase type 11 domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ95668.1	35,00%	5,00E-10	30,00%
	Zinc finger and Thymidylate synthase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ95724.1	20,00%	3,00E-11	35,00%
	Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96061.1	19,00%	4,00E-18	30,67%
	SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96106.1	21,00%	3,00E-77	47,00%
	CHD and Zinc finger and Chromo and SNF2-related and DNA RNA helicase and Protein of unknown function DUF1087 and Protein of unknown function DUF1086 domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96229.1	22,00%	7,00E-09	31,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96562.1	20,00%	1,00E-12	34,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96604.1	13,00%	1,00E-08	31,00%
	SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96616.1	21,50%	6,50E-18	35,00%
	SH2 motif and Src homology-3 and Variant SH3 and Pre-SET zinc-binding region and SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96968.1	24,11%	8,95E-08	33,05%
	Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96970.1	18,33%	3,87E-12	31,33%
	SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ97197.1	30,86%	5,76E-16	34,00%
	Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ97207.1	7,00%	4,00E-11	38,00%
	SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ97250.1	21,50%	1,20E-17	35,00%
	Ankyrin and Tyrosine protein kinase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ97346.1	10,00%	1,00E-12	33,33%
	EGF and EGF calcium-binding and Notch region and Notch and Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ97463.1	6,00%	5,10E-06	35,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ97638.1	18,00%	9,00E-11	32,00%
	Chromo and Chromo shadow domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ97696.1	7,00%	1,00E-05	47,00%
	Ankyrin domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ98002.1	12,50%	2,52E-06	35,00%
HDM	Zinc finger and FY-rich and SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ80580.1	6,00%	2,00E-10	51,00%
	Amine oxidase and Apyrase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ81051.1	34,67%	1,67E-16	34,00%
	Tetratricopeptide TPR2 and Tetratricopeptide TPR-1 and Transcription factor jumonji domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ84558.1	64,50%	3,50E-149	48,50%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ84644.1	6,00%	3,00E-06	39,00%

HDM	Amine oxidase and Apyrase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ85158.1	64,27%	1,46E-35	33,64%
	Transcription factor jumonji and AT-rich interaction region and Zinc finger and PLU-1 domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ85821.1	57,00%	5,00E-60	33,00%
	Transcription factor jumonji domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ86735.1	35,33%	6,27E-37	40,08%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ89420.1	3,00%	1,00E-06	50,00%
	Zinc finger and Bromodomain domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ90447.1	4,33%	1,53E-10	50,33%
	Transcription factor jumonji domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ92265.1	22,00%	2,00E-22	33,00%
	Zinc finger and FY-rich and SET domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ92627.1	6,00%	1,00E-09	51,00%
	Transcription factor jumonji and AT-rich interaction region and Zinc finger and PLU-1 domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ93247.1	57,00%	1,00E-63	35,00%
	SWIRM and Amine oxidase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ94444.1	66,25%	2,50E-39	36,33%
	Amine oxidase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ94886.1	16,22%	2,33E-19	36,11%
	CHD and Zinc finger and Chromo and SNF2-related and DNA RNA helicase and Protein of unknown function DUF1087 and Protein of unknown function DUF1086 domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96229.1	7,00%	8,00E-08	43,00%
	remodeling and spacing factor 1 [Haemonchus contortus]	CDJ96686.1	7,00%	1,00E-06	42,00%
	Amine oxidase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ96928.1	27,50%	1,50E-16	31,00%
	Amine oxidase domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ97450.1	12,43%	1,06E-06	34,43%
	Transcription factor jumonji domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ97695.1	35,33%	5,37E-37	40,00%
	Zinc finger domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ97781.1	3,00%	1,00E-06	50,00%
	Transcription factor jumonji domain containing protein [Haemonchus contortus]	CDJ98196.1	19,00%	1,01E-25	41,58%

Fonte: Autor.