



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA  
AMAZÔNIA**

**CINTIA LUANA PINHEIRO SANTOS**

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NA 3' UTR DO GENE IFN- $\gamma$  COM SEU  
PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA E DO miRNA 125b NO SANGUE DE BÚFALAS  
LEITEIRAS COM E SEM HEMOPARASITOSEs.**

**BELÉM  
2022**

**CINTIA LUANA PINHEIRO SANTOS**

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NA 3' UTR DO GENE IFN- $\gamma$  COM SEU  
PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA E DO miRNA 125b NO SANGUE DE  
BÚFALASLEITEIRAS COM E SEM HEMOPARASITOSE.**

Dissertação apresentada á Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção de título de mestre.

Área de concentração: Genética e Melhoramento Animal.

Orientador: Ednaldo da Silva Filho.

**BELÉM  
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia  
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S237a Santos, Cintia Luana Pinheiro  
Associação do polimorfismo na 3' UTR do gene IFN- $\gamma$  com seu padrão de expressão gênica e do miRNA 125b no sangue de búfalas leiteiras com e sem hemoparasitoses. / Cintia Luana Pinheiro Santos. - 2022.  
56 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Saúde e Produção Animal na AMAZÔNIA (PPGSPAA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2022.  
Orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho
1. Genética e Melhoramento Animal. 2. Saúde Animal. 3. Produção Animal. 4. Sistemas de Produção Animal na Amazônia. I. Filho, Ednaldo da Silva. *orient.* II. Título
- 

CDD 636.089696

**CINTIA LUANA PINHEIRO SANTOS**

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NA 3' UTR DO GENE IFN- $\gamma$  COM SEU  
PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA E DO miRNA 125b NO SANGUE DE  
BÚFALASLEITEIRAS COM E SEM HEMOPARASITOSE.**

Dissertação apresentada á Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção de título de mestre. Área de concentração: Genética e Melhoramento Animal.

25 de fevereiro de 2022

**Data da Aprovação**

**BANCA EXAMINADORA:**



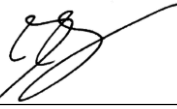
Dr. Ednaldo da Silva Filho - Orientador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



Dra. Priscila Di Paula Bessa Santana - 1º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



Dra. Elizabeth Machado Barbosa - 2º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ – UNIFAP



Dr. Igor Guerreiro Hamoy - 3º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA

Dr. Alexandre do Rosário Casseb - Suplente  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Augusto Santos e Cintia Pinheiro, minha irmã Cecília Pinheiro, ao meu amor Paulo Victor e a minha família, pelos incentivos e ótimos conselhos em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora de Nazaré, que se não fosse por ele e pela intercessão dela eu não teria chegado até esse momento.

A minha família pelo apoio de sempre. Em especial, a minha mãe que desde o início da minha jornada de vida e acadêmica sempre esteve ao meu lado me apoiando e me mantendo de pé me fazendo persistir na busca dos meus sonhos.

Ao meu orientador Dr. Ednaldo Filho que desde o 4º semestre de minha graduação em Zootecnia me recebeu em seu laboratório de braços abertos, sendo um excelente orientador e amigo desde sempre.

A todos os amigos do laboratório de Biologia Molecular/UFRA Laura, Rafa, Lorena, Elem, Elaine, Wilson, James, Roberta e Moisés que sempre foram gentis e pacientes comigo.

Ao Caio Silva, pela parceria na coleta das amostras e principalmente por sempre ter me estendido à mão quando precisei.

Ao meu amor, parceiro e melhor amigo, pelo companheirismo, pelo amor, pela força, pelo apoio de todos os dias e por nunca ter descreditado de mim.

Ao apoio financeiro fornecido pela FAPESPA através da bolsa durante esses dois anos de curso de mestrado, o qual foi de fundamental importância para que este projeto pudesse ser concluído.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA: ácido desoxirribonucleico

IFNG: gene do Interferon gama

IFN- $\alpha$ : Interferon alfa

IFN- $\beta$ : Interferon beta

IL-1: Interleucina 1

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

INF- $\gamma$ : Interferon gama

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

mRNAs: RNAs mensageiros

miRNA: micro RNA

NK: Células Natural *Killer* /assassinas

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PCR-RFLP: Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição

RNA: ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub>: RNA mensageiro

RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

TGF- $\beta$ : Fator de crescimento transformador beta

Th1: Linfócito T *helper* ou auxiliar tipo 1

Th2: Linfócito T *helper* ou auxiliar tipo 2

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

T- $\gamma\delta$ : Linfócitos T gama-delta

## RESUMO

O uso de marcadores genéticos bem como a determinação da expressão de genes envolvidos no sistema imune de búfalos é de extrema valia nos programas de seleção, pois podem promover a escolha de animais resistentes a muitos patógenos. O objetivo do estudo foi associar o Polimorfismo g4467 G>A no gene INF- $\gamma$  com o seu perfil de expressão gênica bem como do miRNA 125b em búfalas leiteiras com hemoparasitoses. Foram coletadas amostras de sangue de 145 búfalas para extração de DNA através do método fenolclorofórmio, seguido das técnicas de PCR e RT-PCR para diagnóstico molecular dos agentes *Babesia* spp. *Trypanosoma vivax* e *Anaplasma marginale*, respectivamente. Todos os animais foram genotipados pela técnica do PCR-RFLP. Em seguida, o RNA total dos animais de diferentes genótipos foram extraídos para determinação das expressões do INF- $\gamma$  e do miRNA 125b através da RT-PCR. Todas as búfalas foram negativas para *Babesia* spp. e *A. marginale* e apenas 12 foram positivas para o *T. vivax*. A PCR-RFLP revelou três padrões de bandas para o SNP estudado. Onde foram observados os genótipos GG, GA e AA, nas proporções 3,4%, 2,1% e 94,5% respectivamente e o alelo A o mais frequente (95,5%). O SNP apresentou desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ( $P < 0,05$ ) e déficit de heterozigotos com  $F_{IS}$  0,759. Todos os animais dos genótipos encontrados apresentaram expressão para ambos os genes, exceto o GG positivo o qual, não foi detectado. O perfil de expressão do INF- $\gamma$  foi maior nos genótipos GA e GG negativos e AA positivo. Contudo, o perfil de expressão do miRNA 125b foi menor para os genótipos AA e GA positivos e maior para os três genótipos negativos. Dessa forma, os resultados sugerem que o SNP avaliado na população apresentou baixa variabilidade por se tratar de um rebanho leiteiro que provavelmente se encontra sob pressão de seleção e que as búfalas AA positivas mesmo que assintomáticas para *T. vivax* podem mostrar-se susceptíveis a infecção devido a maior expressão do INF- $\gamma$  e menor do miRNA 125b. Entretanto, as búfalas GG e GA negativas por terem exibido maiores níveis de expressão para ambos os genes podem ser consideradas geneticamente resistentes à infecção por *T. vivax*.

Palavras chave: Búfalas, melhoramento genético, SNP, sistema imune, INF- $\gamma$ , miRNA 125b.



## ABSTRACT

The use of genetic markers as well as the determination of the expression of genes involved in the immune system of buffaloes is of extreme value in selection programs, as they can promote the choice of animals resistant to many pathogens. The aim of the study was to associate the polymorphism g4467 G>A in the INF- $\gamma$  gene with its gene expression profile as well as miRNA 125b in dairy buffaloes with hemoparasitoses. Blood samples were collected from 145 buffaloes for DNA extraction using the phenolchloroform method, followed by PCR and RT-PCR techniques for molecular diagnosis of *Babesia* spp. *Trypanosoma vivax* and *Anaplasma marginale*, respectively. All animals were genotyped using the PCR-RFLP technique. Then, the total RNA of the animals of different genotypes was extracted to determine the expressions of INF- $\gamma$  and miRNA 125b through RT-PCR. All buffaloes were negative for *Babesia* spp. and *A. marginale* and only 12 were positive for *T. vivax*. PCR-RFLP revealed three band patterns for the studied SNP. Where the GG, GA and AA genotypes were observed, in the proportions 3.4%, 2.1% and 94.5% respectively and the most frequent A allele (95.5%). The SNP showed deviation from the Hardy-Weinberg Equilibrium (EHW) ( $P < 0.05$ ) and deficit of heterozygotes with FIS 0.759. All animals of the genotypes found showed expression for both genes, except for the positive GG, which was not detected. The INF- $\gamma$  expression profile was higher in GA and GG negative and AA positive genotypes. However, the miRNA 125b expression profile was lower for the positive AA and GA genotypes and higher for the three negative genotypes. Thus, the results suggest that the SNP evaluated in the population showed low variability because it is a dairy herd that is probably under selection pressure and that AA-positive buffaloes, even if asymptomatic for *T. vivax*, may be susceptible to infection due to higher expression of INF- $\gamma$  and lower expression of miRNA 125b. However, buffaloes GG and GA negative for having higher levels of expression for both genes can be considered genetically resistant to infection by *T. vivax*.

Keywords: Buffaloes, genetic improvement, SNP, immune system, IFN- $\gamma$ , miRNA 125b.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	11
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	13
<b>1. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>1.1. Rebanho bubalino na Amazônia</b> .....	14
<b>1.2. Sistema imune</b> .....	16
<b>1.3. Citocina Interferon gama (IFN-<math>\gamma</math>)</b> .....	17
<b>1.4. Marcadores genéticos de imunidade em búfalos</b> .....	18
<b>1.5. Doenças endêmicas nos rebanhos da Amazônia e perdas econômicas</b> .....	20
<b>1.6. Expressão gênica</b> .....	21
<b>1.7. Papel dos MicroRNAs (miRNA 125b)</b> .....	22
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	24
<b>2.1. Geral</b> .....	24
<b>2.2. Específicos</b> .....	24
<b>3. ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO INTERFERON GAMA (IFN-<math>\Gamma</math>) E MIRNA 125B ASSOCIADO AO SNP G.4667 G&gt;A NA 3' UTR DE BÚFALAS LEITEIRAS COM E SEM HEMOPARASITOSE</b> .....	25
<b>RESUMO</b> .....	25
<b>3.1. Introdução</b> .....	26
<b>3.2. Material e Métodos</b> .....	28
3.1. 1 Ética e Animais coletados.....	28
3.1. 2 Coleta de sangue e Local do experimento .....	28
3.1. 3 Extração de DNA.....	28
3.1. 4 Diagnóstico molecular das hemoparasitoses .....	28
- <i>Babesia</i> spp. ....	28
- <i>Trypanosoma vivax</i> .....	29
- <i>Anaplasma marginale</i> .....	30
3.1. 5 PCR do Gene IFN- $\gamma$ .....	30
3.1. 6 Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP) .....	31
3.1. 7 Extração de RNA.....	31
3.1. 8 Expressão Gênica (RT-PCR).....	31

3.1. 9	Análise estatística .....	32
<b>3.4.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>54</b>

## CONTEXTUALIZAÇÃO

A Bubalinocultura tem conquistado seu lugar na pecuária brasileira, especialmente em função da flexibilidade que os animais possuem de adaptarem-se as diferentes condições de clima e solo do país. Com isso, a produção de búfalos constitui-se uma escolha zootécnica viável para os produtores que buscam potencializar a eficiência do sistema produtivo (JORGE *et al.*, 2010; JORGE *et al.*, 2016).

A eficiência pode ser alcançada através das ferramentas empregadas no melhoramento genético animal possibilitando a esses o aproveitamento de seu potencial genético, permitindo que essas características de interesse sejam repassadas as gerações futuras. Dentre as ferramentas, destacam-se os marcadores moleculares que propiciam a seleção de animais para determinadas características, em um determinado ambiente, conseguindo prever como esses animais selecionados se comportarão em adequadas condições de manejo (SILVA, 2020).

Partindo desse princípio, a escolha de animais resistentes a doenças e tolerantes a infecções, são características de interesse procuradas nos programas de seleção visto que, as doenças infecciosas em animais de produção geram consideráveis perdas econômicas e diminuem a condição de bem estar animal (MULDER; RASHIDI, 2017). Portanto, o melhoramento animal selecionador que visa elevar a resistência a doenças tem sido componente dos programas de melhoramento genético animal (MORRIS *et al.*, 2010; BISHOP, 2012b; SIMAS *et al.*, 2019).

A identificação de marcadores de resistência as hemoparasitoses em conjunto com técnicas de genotipagem e análise de expressão gênica é relevante para o avanço da pecuária bubalina, a qual vem sendo bastante selecionada para os sistemas produtivos, principalmente para a pecuária leiteira, uma vez que o leite apresenta o teor de seus constituintes com alto valor nutricional e maior rendimento industrial em seus derivados chegando a ultrapassar em 40% o rendimento do leite bovino (ANDRADE *et al.*, 2011; MANZOOR *et al.*, 2019).

A imunidade aos hemoparasitas em animais jovens ou adultos demanda forte estímulo de respostas inatas e o aprimoramento de respostas adaptativas eficientes, respectivamente (SUAREZ *et al.*, 2019). O interferon gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina e pertence à família dos interferons tipo II e possui papel central na imunomodulação inata e adaptativa podendo ativar macrófagos, eliminar parasitas além de aumentar a síntese de anticorpo neutralizante IgG2 (BROWN, 2001; ESTES; BROWN, 2002; TIZARD, 2013).

O gene IFN- $\gamma$ , é bastante estudados em bovinos tanto para detecção de SNPs quanto a expressão gênica. Porém, a associação do SNP na região 3' UTR do gene IFN- $\gamma$  ao miRNA

que se liga ao mesmo, aliado a análise de expressão dos genes abordados ainda não foi reportado em bubalinos com ou sem hemoparasitoses, sendo assim o estudo pode ser promissor ao revelar que o SNP pode ser um marcador genético para resistência imunológica específico da espécie *Bubalus bubalis*.

## REFERÊNCIAS

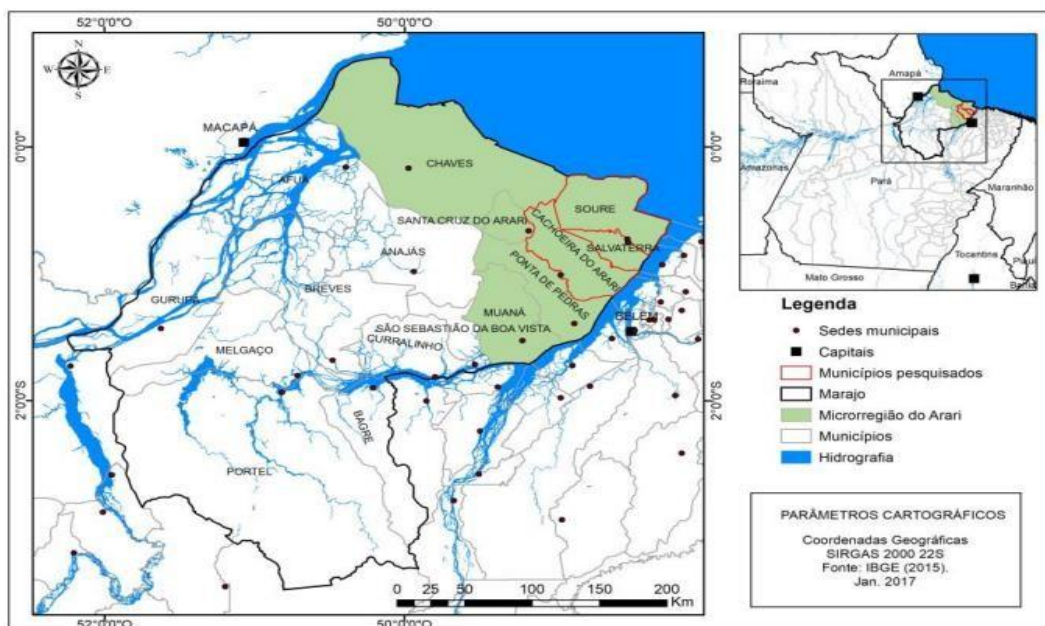
- ANDRADE, K. D.; RANGEL, A. N.; ARAÚJO, V. M.; LIMA JÚNIOR, D. M.; OLIVEIRA, N. A. Efeito da estação do ano na qualidade do leite. **Revista Verde**. 6(3), 33-37. (2011).
- BISHOP, S. C. Possibilities to breed for resistance to nematode parasite infections in small ruminants in tropical production systems. **Animal** 6:741–747. 2012b.
- BROW, W. C. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. *Vet. Parasitol.* 101, 233-248. 2001.
- ESTES, D. M.; BROW, W. C. The type 1/type 2 paradigm and regulation of humoral immune responses in cattle. **Vet. Immunol. Immunophatol.** 90, 10. 2002.
- JORGE, A. M.; FRANCISCO, C. L. Predicting beef carcass quality of buffaloes. *in*: 42 international buffalo conference on “optimizing buffalo productivity through conventional and novel technologies”, **Anais...**2010.
- JORGE, A. M.; LUZ, P. A. C.; FRANCISCO, C. L.; ARANHA, H. S.; CORREA, H. L.; ARANHA, A. S. Sensory and microbiological characteristics of buffalo heifer meat subjected to different aging times. *in*: the 11th world buffalo congress, 2016, cartegena.
- MANZOOR, S.; NADEEM, A.; JAVED, M. Polymorphism association and expression analysis of alpha-lactalbumin (LALBA) gene during lactation in Nili Ravi buffalo. **Tropical Animal Health and Production**. 2019.
- MORRIS, C. A.; BISSET, S. A.; VLASSOFF, A.; WHEELER, M.; WEST, C. J.; DEVANTIER, B. P.; MACKAY, A. D. Selecting for resilience in Romney sheep under nematode parasite challenge, 1994-2007. *N. Z. J. Agric. Res.* 53 (3): 245–261. 2010.
- MULDER H. A.; RASHIDI H. Selection on resilience improves disease resistance and tolerance to infection. **Journal of Animal Science**, 95 (8). 2017.
- SILVA, L. K. N. **Associações de polimorfismos da região promotora do gene fsh-  $\beta$  detectados pela técnica de tetra-primer (AMRS-PCR) com características seminais e testicular em bovinos da raça nelore**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2020.
- SIMAS, P. V. M.; BASSETTO, C. C.; GIGLIOTI, R.; OKINO, C. H.; DE OLIVEIRA, H. N.; DE SENA OLIVEIRA, M. C. O uso de marcadores moleculares pode ajudar a compreender a diversidade genética de *Babesia bovis*. **Infection, Genetics and Evolution**, (2019).
- SUAREZ, C. E.; ALZAN, H. F.; SILVA, M. G.; RATHINASAMY, V.; POOLE W. A.; COOKE, B. M. Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit? **International Journal for Parasitology** 49 (2019) 183–197.
- TIZARD, I. *Veterinary Immunology*. 9<sup>th</sup> ed. **Elsevier**, St. Louis, 568. 2013.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Rebanho bubalino na Amazônia

O rebanho nacional de búfalos (*Bubalus bubalis*) é de aproximadamente 1.502.482 cabeças, sendo a região Norte a detentora do maior rebanho. O Pará é o estado que lidera na produção de búfalos, além de ser o maior produtor do País e da América Latina, com efetivo de aproximadamente 605.110 cabeças, seguido do estado do Amapá que é o segundo maior produtor do país. A Ilha do Marajó detém a maior quantidade do rebanho bubalino com 422.348 animais e os municípios de Chaves, Soure e Cachoeira do Arari são os que destacam no segmento e possuem maior quantitativo, respectivamente (Figura 1) (IBGE-PPM, 2020).

Figura 1 - Localização da Ilha do Marajó e seus municípios



Fonte: NASCIMENTO *et al.*, 2019

Os búfalos são animais que se adaptam facilmente a diferentes condições de clima, topografia e vegetação e por isso possuem uma considerada importância na economia de vários países tropicais e subtropicais (MINERVINO *et al.*, 2020). Possuem maior conversão alimentar quando comparados aos bovinos, dispendo de uma maior capacidade no aproveitamento de alimentos com qualidade nutricional inferior como pastos com gramíneas de baixo valor nutricional, bem como a ração volumosa de qualidade inferior (PIMENTEL, 2019).

São capazes de produzir carne, leite e seus derivados mesmo em condições ambientais adversas presentes na região amazônica como alta umidade e temperatura que podem provocar no animal estresse e diminuição da resposta imune (REHMAN *et al.*, 2021).

Entretanto, o tipo climático da região Amazônica que é caracterizado como Afii por possuir uma época mais chuvosa em um período prolongado do ano (dezembro a maio) (LOURENÇO; GARCIA, 2006), de certa forma acaba favorecendo o alagamento dos pastos o que contribui para a manutenção e reprodução dos vetores das principais hemoparasitoses que acometem os rebanhos, como os carrapatos e insetos (REHMAN *et al.*, 2021).

Apesar de o búfalo ser considerado resistente ao desenvolvimento de doenças transmitidas por vetores como os citados anteriormente, foi verificado que esse animal pode ser parasitado pelo carrapato da espécie *Rhipicephalus microplus*, o qual pode carregar muitos tipos de patógenos (BATISTA *et al.*, 2018). Ademais, o búfalo pode atuar como reservatório de doenças e assim propagá-las para bovinos quando são criados dentro do mesmo sistema de criação.

Ainda em relação às particularidades dos búfalos docilidade e rusticidade são características que merecem destaque porque mesmo que a rusticidade seja superior, os búfalos não devem ser esquecidos quanto a estudos de sanidade, pois podem apresentar as mesmas enfermidades que os bovinos, no entanto os sinais clínicos, susceptibilidade, epidemiologia e desenvolvimento da resposta imune podem ser divergentes (DAMÉ, 2019).

A bubalinocultura nacional conta com a colaboração da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB), que reconhece no Brasil quatro raças: Murrah, Mediterrâneo, Carabao e Jafarabadi na qual cada uma delas apresentam suas peculiaridades e por isso são destinadas aos segmentos dos sistemas de produção principalmente carne, leite e derivados (ABCB, 2021).

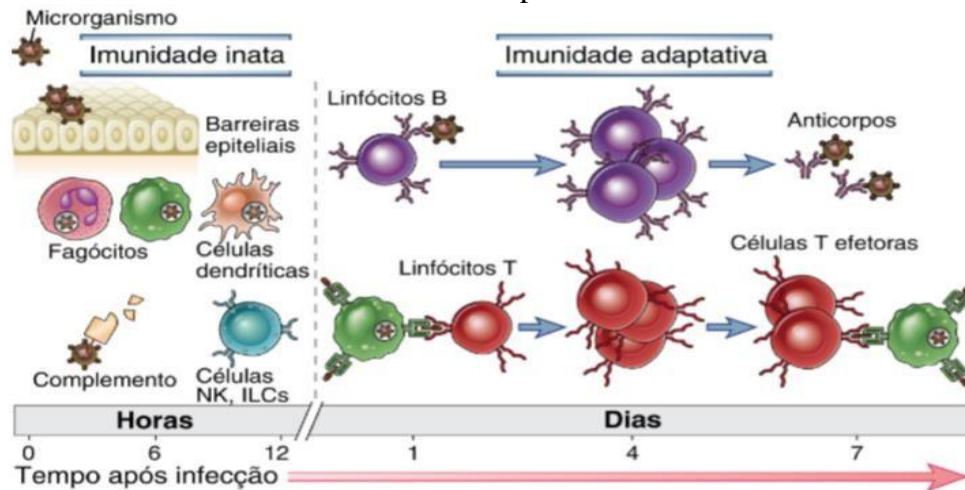
Portanto, frente a todas essas características o setor é visto como uma das atividades pecuárias de grande prospecção para o Brasil e que, na atualidade é responsável pela geração de emprego e renda para milhões de pessoas (SANTOS *et al.*, 2016). A criação de búfalos encontra-se distribuída pelo país como um todo e esse cenário exige melhorias especialmente no manejo sanitário e preventivo dos animais, com o objetivo de garantir que a circulação de agentes infecciosos esteja controlada dentro dos rebanhos (SOUZA, 2013; FIGUEIRÓ; SARAIVA 2018).



## 1.2. Sistema imune

A defesa de todos os organismos multicelulares sejam animais ou plantas contra a invasão de microrganismos patogênicos é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e tardia pela ação da imunidade adaptativa (Figura 2).

Figura 2 - Mecanismos da Imunidade Inata e Adaptativa



Fonte: ABBAS *et al.* 2015

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do animal contra esses microrganismos e consiste em acionar mecanismos de defesa celulares e bioquímicos para responder de forma imediata aos mesmos. De forma que, o sistema atua bloqueando a entrada desses invasores e eliminando ou contendo seu crescimento, devido principalmente aos aparatos de defesa do sistema que foram surgindo por meio da seleção natural, durante o processo de evolução contra as diversas ameaças provocadas por bactérias, protozoários, vírus e outros (BUCHMANN, 2014; ABBAS *et al.*, 2015).

Os principais componentes da imunidade inata incluem barreiras físicas e químicas (pele, epitélio, agentes antimicrobianos), células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos), células dendríticas, células naturais assassinas (NK), proteínas sanguíneas e respostas inflamatórias. O processo de inflamação consiste no recrutamento de leucócitos e proteínas plasmáticas do sangue, onde sua aglomeração nos tecidos lesionados é responsável pela destruição dos microrganismos. Inúmeras dessas reações imunes inatas envolvem citocinas sintetizadas por células dendríticas, macrófagos e outras, sendo, portanto moléculas importantes de comunicação entre células hospedeiras contra uma gama de organismos patogênicos (RAJAEI *et al.*, 2018; ABBAS; LICHMAN, 2019).

Em contrapartida a resposta imune adaptativa é desencadeada através das várias exposições aos agentes infecciosos e não infecciosos, reconhecendo e reagindo por meio de vias regulatórias de antígenos. Os linfócitos, células envolvidas nessas respostas são capazes de reconhecer muitos antígenos e as características desse sistema espelham suas propriedades que são: especificidade e diversidade, memória e autotolerância (ABBAS; LICHMAN, 2019).

As citocinas são polipeptídios sintetizados em resposta a aparição de microrganismos bem como de determinados antígenos e são empregadas pelo sistema imune como proteínas indicadoras que dão início, prosseguimento e designação de uma resposta inflamatória, conseqüentemente são moléculas chave na conexão entre células hospedeiras envolvidas tanto no sistema imune inato quanto no adaptativo contra uma considerada diversidade de patógenos (TIZARD, 2013; RAJAEI *et al.*, 2018).

São classificadas quanto ao local de atuação, tipo de imunidade, patogenia e funções efetoras. Sendo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-10, IL-12, interferons tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), IFN- $\gamma$ , e quimiocinas as principais citocinas mediadoras da imunidade inata. Sendo as mediadoras do sistema imune adaptativo a IL-2, IL-4, IL-5, TGF- $\beta$ , IL-10 e IFN- $\gamma$  (ABBAS; LICHMAN, 2019).

### 1.3. Citocina Interferon gama (IFN- $\gamma$ )

Em relação à função desempenhada tanto no sistema imune inato quanto adaptativo, se destaca o IFN- $\gamma$  que é uma citocina que pertence à família tipo II, sintetizada por linfócitos T *helper* ou auxiliares (Th1), CD8+ e células NK, bem como por macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Além disso, o IFN- $\gamma$  é considerado o mais potente dos três tipos de interferons sendo conhecido como uma das mais relevantes citocinas estimuladoras da imunidade contra infecções. É responsável também por promover a apresentação de antígenos devido o aumento da expressão de genes do Complexo principal de Histocompatibilidade (MHC) das classes I e II (TIZARD, 2013; ROSÁRIO *et al.*, 2018).

O IFN- $\gamma$  visivelmente atua como uma citocina indiscutível no controle da infecção, em razão do seu papel potente na ativação de macrófagos envolvidos no controle da parasitemia (SCHMIDT *et al.*, 2002; RUSSELL *et al.*, 2012; KATO *et al.*, 2016), sendo uma das principais citocinas respondedoras nas infecções por *Mycobacterium*, por exemplo. Ademais, possui o papel de induzir a produção de óxido nítrico (NO), intensificando funções microbicidas com um grande campo de ação.

Além de responder na infecção por *Mycobacterium* o IFN- $\gamma$  também é acionado por meio de componentes imunogênicos da saliva do carrapato *Rhipicephalus microplus* principal

vetor da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) os quais ativam células linfocitárias auxiliares tipo 2 (Th2) e inibem as Th1 principais produtoras de IFN- $\gamma$ , gerando um ambiente ótimo para o desenvolvimento de patógenos intracelulares (BROSSARD; WIKEL, 2001).

Os patógenos da TPB protozoários do gênero *Babesia* e bactérias do gênero *Anaplasma* se desenvolvem nos hospedeiros bovinos e bubalinos e o organismo destes gera respostas imunes inatas e adaptativas eficazes. Sendo que a capacidade de controlar a parasitemia depende de células T CD4+ específicas para antígenos (BROWN, 2001; ESTES; BROWN, 2002), além de envolver elementos celulares e humorais principalmente o criado pelo IFN- $\gamma$  o qual determina o equilíbrio entre as células T CD4+ (Th1) e T CD4+ (Th2).

Contudo, na infecção pelo protozoário do gênero *Trypanosoma* em bovinos a resposta imune humoral se dá por meio do estímulo provocado por substâncias derivadas do parasito as quais induzem a síntese de imunoglobulinas através da ativação das células B, essa ativação promove a liberação da imunoglobulina IgM logo nos primeiros dias da infecção e a síntese da imunoglobulina IgG aumenta paulatinamente, uma vez que seu aumento é responsável por controlar a parasitemia (BASSI *et al.*, 2018).

Na resposta mediada por células se acredita que os Linfócitos T não possuam função relevante no controle da pasitemia, entretanto a colaboração dos linfócitos T gama-delta (T- $\gamma\delta$ ) foram importantes para controlar a pasitemia e foram aumentados durante a fase inicial da infecção por *T. vivax* em bovinos (BASSI, 2014). Entretanto, células NK e células T são ativadas também por substâncias derivadas do parasito gerando a síntese de IFN- $\gamma$ , que é responsável pela indução de macrófagos que libera outras citocinas pró-inflamatórias como o TNF indispensável para a eliminação do parasito (STIJLEMANS *et al.*, 2017).

#### **1.4. Marcadores genéticos de imunidade em búfalos**

Os marcadores genéticos são fragmentos de DNA que em união com um determinado ponto no genoma possibilitam a associação com índices zootécnicos de reprodução, produtividade, biodiversidade, preservação de espécies e resistência a doenças nos animais de produção (SINGH *et al.*, 2014). Entretanto, os programas de melhoramento genético no Brasil são mais desenvolvidos para bovinos existindo apenas alguns programas para bubalinos (GIL *et al.*, 2013).

A aplicabilidade desses marcadores principalmente em relação à resistência dos animais a determinadas doenças como as hemoparasitoses que são transmitidas por vetores biológicos, mecânicos e causadas por diferentes agentes infecciosos, se faz necessário objetivando a constituição de rebanhos saudáveis (SILVEIRA *et al.*, 2016). Sua classificação

é baseada de acordo com a técnica empregada para sua detecção, sendo revelados por amplificação do DNA através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou por hibridização com sonda de DNA, desses destacam-se o marcador do tipo polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) (VIGNAL *et al.*, 2002; SINGH *et al.*, 2014).

A maioria dos marcadores RFLP são co-dominantes e altamente específicos sendo constantemente utilizados em estudos de mapeamento genético, bem como para análise de variação genética por meio da genotipagem (NCBI, 2021). Visto que, a genotipagem de genes de interesse zootécnico possui grande destaque na produção de animais de fazenda (BOICHARD *et al.*, 2016). Nessa circunstancia, pesquisas tem procurado encontrar genes ou marcadores dos quais os seus transcritos estejam associados às respostas imunes, selecionando animais superiores para prevenção de doenças e aumento da resistência a parasitas em geral (COUTINHO *et al.*, 2010).

Considerando a importância de doenças que afetem o desempenho produtivo de animais leiteiros Roldan-Montes *et al.* (2020), encontraram 13 SNPs em búfalos Murrah sendo a maioria na região codificadora no gene TLR4 que é um receptor de reconhecimento que desempenha papel importante no sistema imunológico ao se ligar a padrões moleculares associados a patógenos. Todos os SNPs foram significativamente associados à contagem de células somáticas (CCS) e, portanto, o gene pode ser utilizado como marcador molecular de resistência a mastite em búfalas.

Além disso, o gene TLR4 conta também com uma proteína chamada TRIF, que leva a ativação de IRFs (fator de resposta aos interferons), que são responsáveis pela expressão de interferon (ABBAS *et al.*, 2018).

Pesquisas voltadas a potenciais biomarcadores moleculares para o gene IFN- $\gamma$  possuem elevada importância, diante disso Javed *et al.* (2021) encontraram após seleção genômica de búfalos de rio, 8 SNPs na região codificadora do gene IFN- $\gamma$ , os quais por serem únicos nessa espécie contribuíram para o destaque imunológico natural contra o *Mycobacterium* permitindo que esses SNPs possam ser novos marcadores para seleção de animais com resposta imune superior sendo explorados como prósperos na criação de rebanhos com animais resistentes a infecção do agente a longo prazo.

Outro SNP na posição g4467 G>A no gene IFN- $\gamma$  também em búfalos foi encontrado na região 3' UTR (IANNACCONE *et al.*, 2018b) e para verificar se o SNP estava associado a infecção por bTB foi realizada a genotipagem. A mesma mostrou que os indivíduos AA estavam mais presentes no grupo caso para bTB (15 em 59) em comparação com o grupo controle (8 em 124) resultado este que sugere uma forte predisposição dos indivíduos AA

(razão de chance 4,94) para a bTB devido à razão de chances estar na faixa de 2,1-5,7 (IOANNIDIS *et al.*, 2001).

### 1.5. Doenças endêmicas nos rebanhos da Amazônia e perdas econômicas

A Babesiose e Anaplasmose são doenças endêmicas em regiões tropicais do mundo acometem bovinos e bubalinos, provocando prejuízos anuais de milhões de dólares aos sistemas pecuários devido à morte dos animais, dispêndios na produção, retardamento no desenvolvimento e altos custos com tratamento (NÉO, 2016).

Essas doenças são transmitidas pelo seu principal vetor, o carrapato *Rhipicephalus microplus*, conhecido popularmente como o carrapato dos bovinos. Entretanto, na anaplasmose pode haver a transmissão mecânica através de insetos hematófagos e a iatrogênica (AUBRY; GEALE, 2011; BATTILANI *et al.*, 2017). A via transplacentária na transmissão da babesiose e anaplasmose ainda não possui uma considerada importância epidemiológica, porém pesquisas realizadas por Silva *et al.* (2014) e Costa *et al.* (2016), evidenciam que essa transmissão talvez esteja sendo subestimada. Ambas as doenças produzem uma condição infecciosa chamada Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (BRITO *et al.*, 2019).

Os principais agentes infecciosos da TPB são os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* juntamente com a bactéria *Anaplasma marginale* ambos são parasitas intra eritrocíticos que causam aos animais sinais clínicos muito semelhantes como anemia hemolítica direcionando um quadro clínico intrínseco contendo febre (mais intensa na anaplasmose), hemoglobinúria (na Babesiose), mucosas pálidas ou icterícia, desidratação, redução no consumo de alimentos e da ruminação, orelhas caídas, decúbito, anorexia além de uma apatia acentuada (MANICA, 2013; FARBER *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2019).

A tripanossomose também se destaca como outra doença endêmica no Brasil e é causada principalmente pelo *Trypanosoma vivax* que é considerado o patógeno mais importante em países da América do Sul incluindo Colômbia, Venezuela e Bolívia infectando especificamente ruminantes. Os animais infectados mostram-se geralmente assintomáticos e aos poucos vão apresentando febre, anemia, letargia, redução no peso, diminuição na produção leiteira e disfunções reprodutivas, além disso, essa sintomatologia é comum às outras hemoparasitoses o que acaba impossibilitando o diagnóstico e conseqüentemente o tratamento preciso nos rebanhos (BATISTA *et al.*, 2009; GALIZA *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2019).

Atualmente, alguns pesquisadores relataram que a infecção por *Trypanosoma vivax* em pequenos ruminantes ocasionou surtos tipificados por distúrbios hematológicos graves, neurológicos sucedendo em alta mortalidade, com animais que se restabeleceram da doença tornando-se cronicamente infectados (GARCIA *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2019).

A tripanossomose é transmitida de forma mecânica através de insetos hematófagos dos gêneros *Stomoxys* sp. e *Tabanus* sp. bem como por fômites como seringas e agulhas contaminadas além de, uma possível transmissão transplacentária (DABUS *et al.*, 2011; BATISTA *et al.*, 2012).

As doenças transmitidas por carrapatos (TBDs) acarretam prejuízos econômicos expressivos para rebanhos bovídeos em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (TISDELL *et al.*, 1999; GALAY *et al.*, 2021). Os animais infectados apresentam o bem estar comprometido, diminuem a produtividade, aumentam os gastos da propriedade com tratamento, controle e profilaxia (ALMEIDA *et al.*, 2019; MENDES, 2019), de tal forma que todas essas consequências impactam diretamente no produto interno bruto (PIB).

No ano de 2019 a TPB causou no Brasil perdas econômicas na faixa de 3,5 milhões de dólares na produção de bovinos (MENDES, 2019). Complementarmente, a infestação por carrapatos em vacas leiteiras produz uma diminuição de 90,24 litros de leite por vaca por lactação, atingindo perda nacional de US\$ 922,36 milhões (FERREIRA, 2019).

Assim como a TPB a tripanossomose também gera perdas econômicas consideráveis aos sistemas pecuários prejudicando sua expansão. Entretanto, números exatos que quantifiquem essas perdas não são bem estabelecidos na literatura e a maioria dos autores relacionam os prejuízos econômicos à morte dos animais, redução na produção de leite e ganho de peso principalmente, infertilidade, elevados custos com drogas tripanocidas, despesas com assistência técnica e exames laboratoriais (PEREIRA *et al.*, 2018).

## **1.6. Expressão gênica**

O processo de expressão gênica é complexo e envolve interações entre o DNA, RNA, proteínas e o meio ambiente. E mesmo que esse processo seja universal dentro das populações e entre as espécies, diferenciar as implicações operantes da variação ainda é um obstáculo (SIGNOR; NUZH DIN, 2018).

E apesar de a maioria dos genes se expressarem de maneira igual a partir de ambos os alelos, poucos desses genes são expressos distintivamente. E o fato deles se expressarem dessa forma se dá principalmente pelo processo de casualização na síntese das células reprodutivas aliadas a troca de sequências homólogas dos cromossomos (recombinação) no

momento da fertilização, em conjunto também com as outras forças evolutivas constituindo a base fundamental da ampla variedade genética existente entre indivíduos de uma população (ROSA *et al.*, 2013).

Tendo em vista a busca por essa variabilidade, os sistemas de produção utilizam o melhoramento genético com objetivo de alcançar melhores níveis de produção, produtividade bem como qualidade do produto de acordo com o próprio sistema de produção e com as premissas do mercado. Essas melhorias nos níveis de produção se dão, sobretudo em cima das características quantitativas (características ditas complexas por serem controladas por um grande número de pares de genes), sendo proveitoso identificar os alelos das características desejáveis e assim selecionar esses animais para a reprodução de maneira que os mesmos sejam adequados às condições do sistema de criação e capaz de atender as demandas do mercado (ROSA *et al.*, 2013).

A colaboração da variação na expressão de genes na divergência fenotípica, na evolução adaptativa e susceptibilidade de doenças têm sido atualmente esclarecidas de maneira mais rápida. De forma que as distintas expressões dos mais variados genes dentro e entre as espécies normalmente são herdáveis podendo ser extremamente espécies-específicas (McDANIELL *et al.*, 2009).

Esses procedimentos dispõem de implicações práticas para a aplicação da seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) para características quantitativas que vão desde a maior eficiência no uso dos alimentos até as de resistência ao estresse, a doenças ou a tolerância contra microrganismos.

### **1.7. Papel dos MicroRNAs (miRNA 125b)**

MicroRNAs são pequenos RNAs não codificantes compostos por aproximadamente 19-23 nucleotídeos que regulam a expressão gênica de maneira pós transcricional modificando o padrão de tradução proteica através da interação com os mRNAs (LEE *et al.*, 2016; O'BRIEN *et al.*, 2018).

A interação com os mRNAs alvo se dá através da complementariedade de bases, que pode ser total ou parcial e quanto maior essa complementariedade mais forte e duradoura será a ligação. Em razão disso, os miRNAs são considerados importantes mediadores da expressão gênica possuindo mecanismos dinâmicos influenciados pelo local onde estão presentes bem como pelos mecanismos de ligação com seus alvos (O'BRIEN *et al.*, 2018).

Esse mecanismo de ação engloba várias etapas com a atuação de muitas proteínas (PLOTNIKOVA *et al.*, 2019). Todavia, de maneira alternativa o miRNA pode se ligar

também em outras regiões dos genes como a 5' UTR (região não traduzida a montante) e até mesmo regiões promotoras.

Em sua maioria, os miRNAs apresentam efeitos inibitórios na expressão gênica que é provocada pela coibição da tradução de proteínas do mRNA alvo. Contudo, quando a interação ocorre na região promotora de determinado gene, o mesmo pode desencadear efeito oposto provocando ativação de sua expressão (DHARAP *et al.*, 2013).

Uma vez que os miRNAs podem influenciar a expressão de vários mRNAs estes modulam amplamente muitas respostas fisiológicas e patológicas, contribuindo assim para a regulação das respostas de defesa do hospedeiro (FRIEDMAN; JONES, 2009; BARTEL, 2009; O'CONNELL *et al.*, 2010; ILIOPOULOS, 2014).

Muitos miRNAs desempenham funções significativas na regulação da caracterização de células do sistema imune, na liberação de mediadores de processos inflamatórios, na proteção do hospedeiro contra determinado patógeno além de, inúmeras doenças imunológicas (BALTIMORE *et al.*, 2008; LINDSAY, 2008).

Dentro das atividades desempenhadas pelos miRNAs, um estudo verificou que o miRNA 125b pode proporcionar processo inflamatório permeado por macrófagos, elevar a expressão de cofator estimulatório e aumentar as ações antitumorais objetivando o fator regulador de interferon 4 (IRF4) (CHAUDHURI *et al.*, 2011). Em humanos, estudos envolvendo a suprarregulação do miRNA 125b pode fazer com que haja elevação nos níveis de mRNA do gene IFNG nas células epiteliais das vias aéreas orientando a proteína 1 de ligação (4E-BP1) acentuando a eosinofilia da mucosa (ZHANG *et al.*, 2012).

Em estudo com bubalinos, foi constatado que o SNP g4467 G>A na região 3' UTR do gene IFNG faz parte de uma região reconhecida pelo miRNA 125b e que ao serem associados demonstraram aumentar a suscetibilidade à Tuberculose bovina (bTB) (IANNACCONE *et al.*, 2018b).

Em estudo de expressão de miRNAs relacionados a inflamação na glândula mamária realizado com vacas Holstein-Friesian, demonstrou que seis destes dentre eles o miRNA 125b foram significativamente regulados positivamente no leite de vacas com mastite em comparação com vacas normais, sugerindo que o leite bovino contem miRNAs associados a processos inflamatórios e que seus níveis podem ser afetados pela mastite (LAI *et al.*, 2017).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Analisar o Polimorfismo de nucleotídeo único na posição g4467 G>A na 3' UTR do gene IFN- $\gamma$  e verificar sua ação no perfil de expressão gênica do IFN- $\gamma$  e miRNA 125b em Búfalas leiteiras com e sem hemoparasitoses.

### 2.2. Específicos

- ✓ Padronizar um protocolo de genotipagem do Polimorfismo g4467 G>A pela técnica do PCR-RFLP;
- ✓ Estimar os parâmetros de diversidade genética do rebanho em estudo;
- ✓ Diagnosticar molecularmente através da PCR as hemoparasitoses causadas pelos agentes patológicos *Babesia* spp. *Trypanossoma vivax* e *Anaplasma marginale*;
- ✓ Determinar a expressão gênica do mRNA do IFN- $\gamma$  e do miRNA 125b das amostras de sangue de búfalas com diagnóstico negativo e positivo para *Trypanossoma vivax*;
- ✓ Prospectar a associação da expressão do mRNA do IFN- $\gamma$  e o miRNA 125b com os genótipos gerados para cada diagnóstico.

### 3. ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO INTERFERON GAMA (IFN- $\gamma$ ) E MIRNA 125B ASSOCIADO AO SNP G.4667 G>A NA 3' UTR DE BÚFALAS LEITEIRAS COM E SEM HEMOPARASITOSE

(De acordo com as normas da revista Pakistan Veterinary Journal)

#### RESUMO

O objetivo do estudo foi associar o Polimorfismo g4467 G>A ao perfil de expressão gênica do IFN- $\gamma$  e do miRNA 125b em búfalas leiteiras com e sem hemoparasitoses. Para esse fim, foram examinadas 145 fêmeas bubalinas. A extração de DNA foi realizada através do método fenolclorofórmio, seguido do diagnóstico molecular dos agentes *Babesia* spp. *Trypanosoma vivax* e *Anaplasma marginale*, respectivamente através da Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (PCR) e em Tempo Real (RT-PCR). Em seguida, a Técnica do Polimorfismo de Comprimento de Fragmento (PCR-RFLP) foi realizada para genotipar o SNP g4467 G>A em todos os animais. A PCR em tempo real (RT-qPCR) quantificou a expressão dos genes IFN- $\gamma$  e miRNA 125b, a partir de RNAs extraídos de 9 búfalas. A PCR-RFLP revelou os genótipos GG, GA e AA, nas proporções 3,4%, 2,1% e 94,5%, respectivamente sendo o alelo A o mais frequente (95,5%) na população. O SNP encontrado apresentou desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ( $P < 0,05$ ) e déficit de heterozigotos com  $F_{IS}$  0,759. Todos os animais dos genótipos encontrados expressaram ambos os genes, exceto o GG positivo para *T. vivax*. A expressão do IFN- $\gamma$  foi maior para os genótipos GA e GG negativos ( $P < 0,05$ ) e AA positivos. No entanto, a expressão do miRNA 125b foi menor para os genótipos AA e GA positivos e maior para todos os três genótipos negativos. Com isso, as búfalas AA positivas para *T. vivax* podem exibir susceptibilidade devido a maior expressão de IFN- $\gamma$  e menor do miRNA 125b. As búfalas GG e GA negativas por sua vez, exibiram maior expressão para ambos os genes, podendo sugerir que possuem maior resistência comparada às positivas. O SNP avaliado na população em estudo apresentou baixa variabilidade por se tratar de um rebanho leiteiro que provavelmente se encontra sob pressão de seleção.

Palavras chave: Búfalas, melhoramento genético, SNP, sistema imune, IFN- $\gamma$ , miRNA 125b.

### 3.1. Introdução

A produção de bubalinos (*Bubalus bubalis*) é de maneira universal um sistema financeiramente valioso para produção de carne, leite e os seus principais derivados (SAFARI *et al.*, 2018). Nesse contexto, o Brasil tem cerca de 1,5 milhão de cabeças com a maior população de búfalos situada na região Amazônica. Nesta, os estados do Pará e Amapá se destacam na criação bem como no número de cabeças, contem os maiores rebanhos do Brasil e da América Latina (IBGE, 2020).

Do ponto de vista biológico a criação de búfalos na Amazônia é beneficiada por conta da condição climática, solo, variabilidade genética de forrageiras, adaptabilidade inerente à espécie e espaço físico, entretanto mesmo com todas essas características benéficas o ambiente amazônico ainda se mostra desafiador para a produção animal por conta de seu clima tropical com alta umidade, elevada temperatura e elevado índice pluviométrico (GARCIA, 2013; DA SILVA *et al.*, 2021).

E essas condições climáticas acabam favorecendo o surgimento significativo de vetores, principalmente os carrapatos que são uns dos principais transmissores de muitos agentes patológicos aos rebanhos. A presença expressiva desse vetor em determinadas áreas proporciona que estas sejam caracterizadas como enzoóticas (RADOSTITS *et al.*, 2002; BUTENSCHOEN *et al.*, 2011). Além do mais, a presença dos vetores e conseqüentemente dos agentes instituem efeito no estado imunológico dos hospedeiros, tornando-os resistentes ou susceptíveis a enfermidades (GARCIA, 2013).

O emprego da seleção assistida por marcadores moleculares nos programas de melhoramento tem permitido o melhor aproveitamento do potencial genético destes, viabilizando a transmissão das características de resistência a doenças dentro dos rebanhos (SINGH *et al.*, 2014). Em se tratando das hemoparasitoses que são responsáveis por gerar grandes perdas econômicas para os sistemas de produção, o uso de métodos moleculares para o diagnóstico precoce tem se tornado uma alternativa eficaz, uma vez que a PCR é o método direto com maior sensibilidade e especificidade sendo capaz de detectar a presença do agente infeccioso em animais assintomáticos (POSADA-GUAZMÁN *et al.*, 2015; SGORBINI *et al.*, 2015).

Essas ferramentas moleculares também permitem a identificação de genes candidatos envolvidos na imunologia dos mamíferos. Dentre os genes, destaca-se o da citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$  sintetizada pelas células T e NK e caracterizada uma considerável molécula imunomoduladora do sistema imune inato dos vertebrados. A expressão do IFN- $\gamma$  é

desencadeada por vários fatores como infecções virais (DAY *et al.*, 2017), bacterianas intracelulares, especialmente por micobactérias (JAVED *et al.*, 2021).

Tanto a caracterização molecular para identificação de SNPs quanto à expressão gênica de uma gama de citocinas foram demonstradas em várias espécies (SHEBANNAVAR; RASOOL, 2015; XIANG *et al.*, 2017) compreendendo também os búfalos tanto doméstico quanto o africano (PREMRAJ *et al.*, 2005; MINGALA *et al.*, 2006; SUZUKI *et al.*, 2012). Estudo de caracterização molecular do gene IFN- $\gamma$  em búfalos já foi reportado, porém em sua região promotora (PREMRAJ *et al.*, 2006).

Em contra partida, estudos direcionados para as regiões não traduzidas (UTRs) dos genes pertencentes às classes das citocinas ainda não são bem estabelecidos, particularmente para o gene IFN- $\gamma$  na espécie bubalina, sendo observado apenas em estudo anterior que demonstrou a presença do SNP g4467 G>A associado ao miRNA 125b conferindo susceptibilidade para bTB em búfalos (IANNACCONE *et al.*, 2018b).

A partir do desenvolvimento de investigações embasadas na determinação genética dos búfalos bem como, no conhecimento da expressão de genes associados ao sistema imune inato e adaptativo da espécie podem ser utilizados como marcadores moleculares futuramente em estudos fenotípicos com a finalidade de viabilizar a seleção de animais resistentes a patógenos nos programas de melhoramento genético (BOICHARD *et al.*, 2016). Á vista disso, o objetivo do presente estudo foi analisar o SNP g4467 G>A na 3' UTR do gene IFNG com seu perfil de expressão gênica bem como a do miRNA 125b ligado na sequência do SNP em Búfalas leiteiras sem hemoparasitoses.

## 3.2. Material e Métodos

### 3.1. 1 Ética e Animais coletados

Todos os procedimentos que envolvem a utilização de animais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) utilizando metodologias aprovadas e fiscalizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com parecer de permissão N° 0054/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS.

No presente estudo foi utilizado um total de 145 búfalas pertencentes a uma propriedade privada localizada no município de Belém/PA.

### 3.1. 2 Coleta de sangue e Local do experimento

As búfalas foram submetidas à coleta de 5 ml de tecido sanguíneo através de punção a vácuo da veia jugular em tubos contendo 7.5 mg de anticoagulante (EDTA). Após homogeneização 700 µL foram transferidos para tubos de 1,5 µL contendo 300 µL de RNAlater (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Após a coleta, as amostras foram armazenadas a temperatura de 4° C até o processamento no laboratório.

O experimento foi realizado no Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular localizado na Universidade Federal Rural da Amazônia, campus Belém.

### 3.1. 3 Extração de DNA

A extração do DNA total foi realizado por meio do método fenólico descrito por Sambrook *et al.*, (1989). As amostras de DNA foram eluídas em 60 µL de tampão de eluição (T.E). Todas as amostras de DNA extraídas foram submetidas à eletroforese horizontal a 100 V durante 20 minutos em gel de agarose 1,5% e em tampão de TAE 1X e corado com *GelRed* (Biotium – Califórnia/USA), para a visualização da qualidade do DNA.

Posteriormente, foi realizada a quantificação em espectrofotômetro BioDrop µLITE (BioDrop), visando determinar a pureza do DNA através da relação  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ .

### 3.1. 4 Diagnóstico molecular das hemoparasitoses

- *Babesia* spp.

Para a detecção de *Babesia* spp foi utilizado o par de primer BAB 1F (5'AAG TAC AAG CTT TTTA CGG TG3') e BAB 2R (5'CCT GTA TTG TTA TTT CTT GTC ACT ACC TC3') descrito por Kordick *et al.* (1999) e Martin *et al.* (2006) que amplifica um fragmento de

420-440 pb. A reação de *Babesia spp.* foi realizada para volume final de 25 µl, sendo 2 µl de DNA e 12,5 µl de tampão de reação de amplificação Taq Pol - Master mix (2X) Green que possui a seguinte composição Master mix de DNA polimerase termoestável, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, KCl, MgCl, corante, tampão de carregamento de gel e estabilizantes (Cellco Biotec, São Carlos- SP/BR) e 1,0 µL de cada *primer - forward e reverse* - (10 pmol/µL). Como controle positivo foi utilizado um DNA de um animal positivo para *B. bigemina* e para o controle negativo água ultra pura.

As reações foram executadas no termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), onde as condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida de 45 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização a 61 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 45 s e extensão final a 72 °C por 10 min.

- *Trypanosoma vivax*.

Para a detecção de *T. vivax*. foi utilizado o par de primer TIV 2 (5' GCC ATC GCC AAG TAC CTC GCC GA 3') e DTO 156 (5' TTA GAA TTC CCA GGA GTT CTT GAT GAT CCA GTA 3') descrito por Reis et al., (2019), que amplifica um fragmento de 177 pb. A reação de *T. vivax*. foi realizada com volume final de 25 µl, sendo 2 µl de DNA e 12,5 µl de tampão de reação de amplificação Taq Pol - Master mix (2X) Green que possui a seguinte composição Master mix de DNA polimerase termoestável, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, KCl, MgCl, corante, tampão de carregamento de gel e estabilizantes (Cellco Biotec, São Carlos-SP/BR) e 0,5 µL de cada *primer - forward e reverse* - (10 pmol/µL). Como controle positivo foi utilizado um DNA de um animal positivo para *T. vivax*. e para o controle negativo água ultra pura.

As reações foram executadas no termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), onde as condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização a 55 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 30 s e extensão final a 72 °C por 10 min.

Após a realização das PCRs os produtos foram analisados em eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% para *Babesia spp.* e 2% para *T. vivax*. em tampão TAE 1x (TRIS 400 mM, Ácido Acético 1% e EDTA 20 mM), corado com Safedye Nucleic Acid Stain - 10.000x (Cellco Biotec, São Carlos-SP/BR) e corrente de 100V/90 mA por 50 minutos.

Os produtos amplificados para ambos os hemoparasitas foram identificados através da comparação com uma escala molecular de 100 pb *Ladder* (Cellco Biotec, São Carlos-SP/BR), juntamente com uma amostra positiva do gênero *B. bigemina* e *T. vivax*. A visualização dos

tamanhos dos fragmentos (pb) foi realizada por meio do Transiluminador de luz ultravioleta M-20 (UVP).

#### - *Anaplasma marginale*

Para detecção de *A. marginale* foi utilizado o par de primer AM-1 (5' TTG GCA AGG CAG CAG CTT 3') e AM-2 (5' TTC CGC GAG CAT GTG CAT 3') descrito por Carneiro (2019) que amplifica uma região de 95 pb. A reação de RT-PCR para *A. marginale* foi realizada com volume final de 10µL, sendo 1µL de DNA e 5,0µL de tampão de reação de amplificação Master mix for real-time qPCR Green-fluorescent DNA Stain (Cellco Biotec, São Carlos -SP/BR), 0,5µL de cada primer -forward e reverse - (10 pmol/µM) e 3,0µL de água ultra pura. Como controle positivo foi utilizado o gBlock na diluição de 10<sup>-1</sup> e para o controle negativo água ultra pura.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador CFX96 Touch™ Real-Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), onde as condições de amplificação foram: ativação enzimática a 94 °C por 2 min, seguida de 44 ciclos com desnaturação a 95° C por 5 s, Hibridização/Extensão a 58° C por 30 s e curva de dissociação a 65-95° C (Incremento de 0,5° C) por 5 s.

#### 3.1.5 PCR do Gene IFN-γ

Para a investigação do SNP g4467 G>A foi utilizado o par de primers F (5'TCC TGT GAC TAT TTC ACT TGA CC3') e R (5'TGA CTA GAT GGC ATC ATT TCA TT3'), desenhado através do *Primer3Plus* baseado na sequência de referência depositada no *Genbank* (ID: 102416494) e possui fragmento de 182 pares de bases (pb). As reações foram realizadas com volume final de 20 µL, obedecendo a seguinte condição de reagentes: 10 µL de tampão de reação de amplificação Taq Pol - Master mix (2X) Green que possui a seguinte composição (Master mix de DNA polimerase termoestável, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, KCl, MgCl, corante, tampão de carregamento de gel e estabilizantes), 0,5/µL de cada primer - *forward* e *reverse*- (10 pmol/µL) e 2 µL de DNA genômico.

As reações foram executadas no termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), onde as condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30 s, hibridização a 59 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 30 s e extensão final a 72 °C por 1 min.

Os produtos finais dos PCRs foram visualizados em eletroforese horizontal em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1X (TRIS 400 mM, Ácido Acético 1% e EDTA 20 mM), corado com *GelRed* (Biotium – Califórnia/USA), corrente 100V/90mA por 45 minutos. Uma escala molecular de 100 pb foi utilizada como referência para o produto gerado no PCR. A visualização ocorreu por meio do transiluminador de luz ultravioleta M-20 (UVP).

### 3.1. 6 Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP)

Os produtos do PCR do gene IFN- $\gamma$  foram submetidos à enzima de restrição *BspLI* (*NlaIV*) (Invitrogen), selecionada através da ferramenta Mapa de Restrição do software BioEdit 7.2 para a investigação dos genótipos do polimorfismo g4467 G>A na 3'UTR do gene IFN- $\gamma$ .

As reações foram realizadas com volume final de 15  $\mu$ L com às seguintes condições de reagentes: 5  $\mu$ L do produto da PCR, 0,35  $\mu$ L da enzima *BspLI* e 1,5  $\mu$ L de tampão da reação, completando o restante do volume com água deionizada. A condição de amplificação da reação de RFLP foi: restrição a 37 °C durante 3 horas, de acordo com a recomendação do fabricante. Os genótipos gerados foram visualizados em gel de agarose 3,0% com corado com *GelRed* (Biotium – Califórnia/USA).

### 3.1. 7 Extração de RNA

Foram selecionados 9 animais negativos, três de cada genótipo e 8 animais positivos para *T. vivax*, 2 do genótipo heterozigoto e 6 do genótipo homozigoto mutante detectado pela PCR-RFLP. A extração de RNA foi realizada a partir de 300  $\mu$ L de sangue de cada amostra, sendo estas colocadas em tubos novos de 1,5  $\mu$ L contendo 700  $\mu$ L de Trizol (Life Technologies, USA), o restante dos procedimentos seguiu as recomendações do fabricante.

Após a extração foram realizadas as quantificações em espectrofotômetro BioDrop  $\mu$ LITE (BioDrop), visando determinar a pureza do RNA através da relação  $A_{260nm}/A_{280nm}$ . Após a quantificação as amostras foram diluídas para obterem concentração igual a 30 ng/ $\mu$ L.

### 3.1. 8 Expressão Gênica (RT-PCR)

As reações de RT-PCR foram elaboradas a partir dos primers descritos na tabela 1. Os primers utilizados com exceção do miRNA 125b descrito por Iannaccone et al. (2018b), foram confeccionadas através do programa *Primer3Plus*. As análises foram realizadas para determinar o perfil de expressão gênica da citocina IFN- $\gamma$  e miRNA 125b. E como controles



foram utilizados os genes endógenos GAPDH e Let-7a. A reação foi realizada com volume final de 10  $\mu$ L com 2x do Master mix for real-time qPCR Green-fluorescent DNA Stain (Cellco), 1  $\mu$ L de RNA, 0,5  $\mu$ L de ambos os primers *Forward* e *Reverse*, 0,04  $\mu$ L de Transcriptase reversa e 3,0  $\mu$ L de água ultra pura.

As reações foram executadas no termociclador CFX96 Touch TM Real-Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). O protocolo adotado seguiu as recomendações do fabricante do kit utilizado. Os valores de Ct (limiar do ciclo) foram obtidos e determinados pelo método relativo através da equação  $2^{-\Delta Ct}$ , onde  $\Delta Ct$  significa a diferença entre o Ct do gene alvo e o Ct do gene endógeno (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1

Seqüências de *primers* sintetizadas de acordo com o ID Genbank para análises de expressão gênica em búfalos.

Genes	Oligonucleotídeos (5' - 3')	ID Genbank
IFN- $\gamma$	F: CAG ATC ATT CAA AGG AGC ATG GA	102416494
	R: GTC CTC CAG TTT CTC AGA GCT	
miRNA 125b	F: GCA GTC CCT GAG ACC CT	351208
	R: CCA GTT TTT TTT TTT TTT TCA CAA GT	
GAPDH	F: ACC CAG AAG ACG GTG GATG	102404028
	R: CCG TTG AGC TCA GGG ATGA	
LET-7a	F: GCA GTG AGG TAG TAG GTTG	030971.1
	R: GGT CCA GTT TTT TTT TTT TTT TAA CTA TAC	

### 3.1.9 Análise estatística

Todos os animais foram genotipados com a presença ou ausência do sítio de restrição. A partir de então foram estimadas suas frequências alélicas e genotípicas, probabilidade do equilíbrio de Hardy Weinberg ( $P > 0.05$ ) e coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) foram obtidos através do software *GenePop* (RAYMOND; ROUSSET, 1995b).

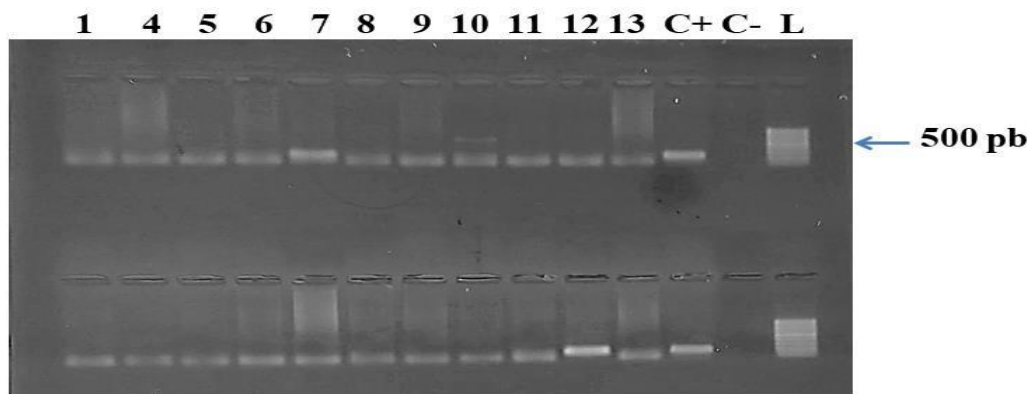
Os padrões de expressão gênica relativa foram executadas no software SAS OnDemand (versão livre), no qual assumindo a não distribuição normal dos dados, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis que determina se existem diferenças significativas entre as medianas dos genótipos para o IFN- $\gamma$  e miRNA 125b. O nível de significância adotado foi de 0,05.

### 3.3. Resultados

#### Diagnóstico de hemoparasitas

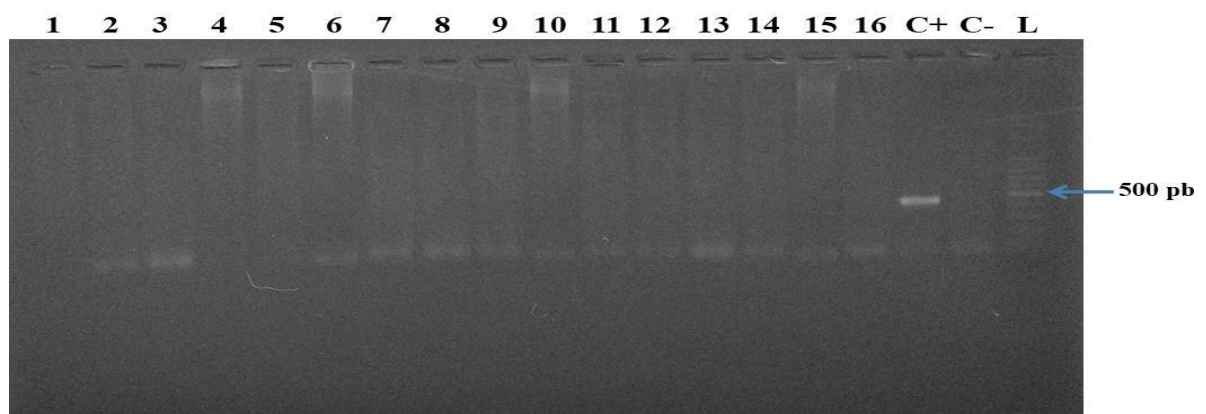
Do total de 145 búfalas avaliadas no presente estudo, 12 foram positivas apenas para *T. vivax* correspondendo a aproximadamente 8,27% (12/145) da população (Figura 1). No entanto, todas as búfalas foram negativas (145/145) para os hemoparasitas *Babesia* spp. e *A. marginale* (Fig. 2, 3 e 4.), respectivamente.

Fig.1. Gel de agarose corado com Safedye. PCR diagnóstico de *T. vivax*. [1 4 5 6 10 11 12 13]: amostras positivas para *T. vivax*; [10, 31] [C+]: Controle positivo 177 pb (*T.vivax*) [C-]: Controle negativo, [L]: Padrão de massa molecular *Ladder* de 100 a 1000 pb (Cellco Biotec).



Fonte: Santos 2021

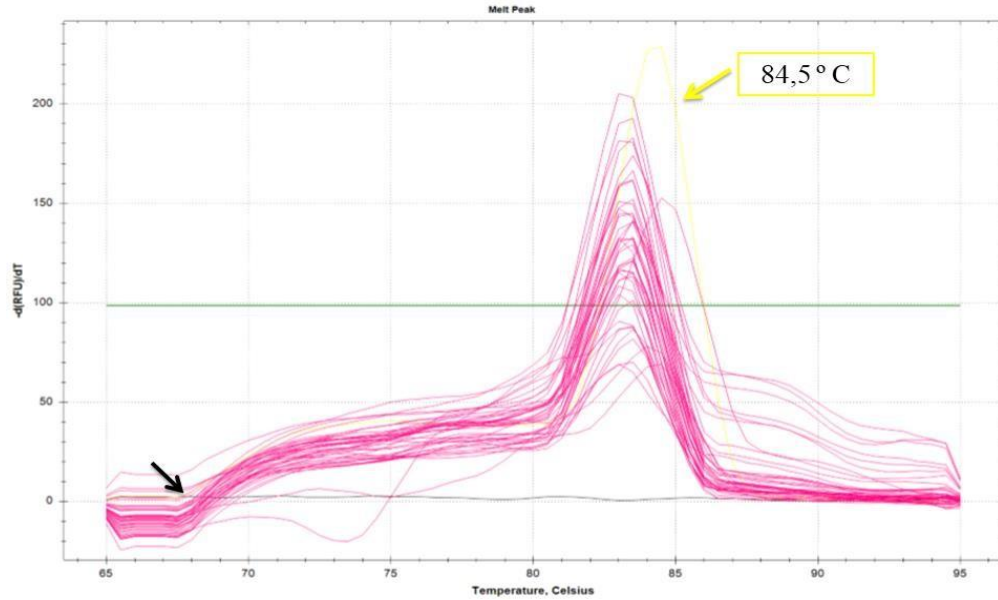
Fig.2. Gel de agarose corado com Safedye. PCR diagnóstico de *Babesia* spp. [1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16]: amostras negativas para *Babesia* spp. [C+]: Controle positivo 420-440 pb (*B. bigemina*) [C-]: Controle negativo da reação, [L]: Padrão de massa molecular



*Ladder* de 100 a 1000 pb (Cellco Biotec).

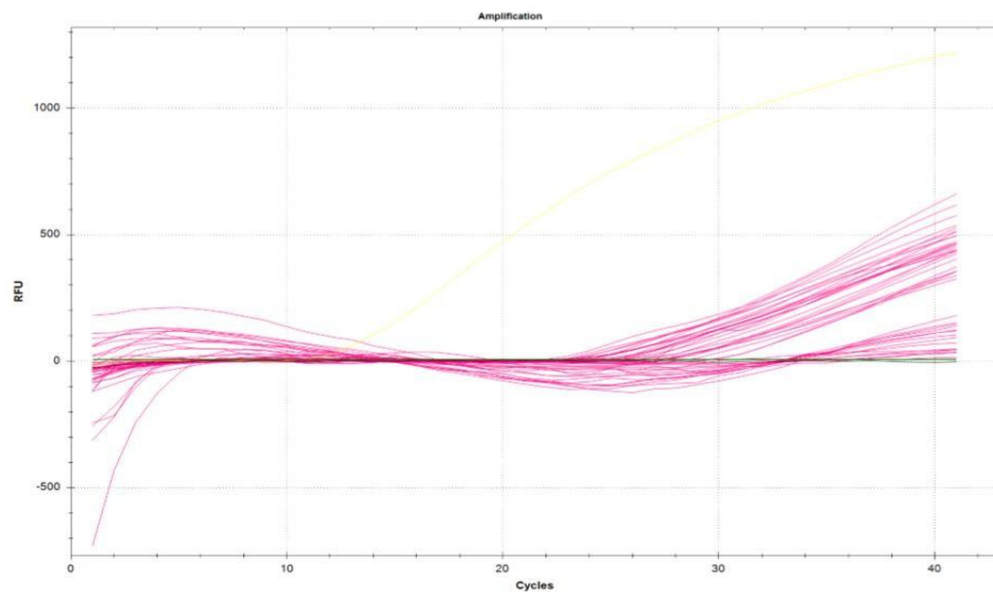
Fonte: Santos 2021

Fig.3. Teste de especificidade alcançado pela RT-PCR para *A. marginale* (MSP1), a seta preta indica o controle negativo, a seta amarela indica o controle positivo -Gblock- de *A. marginale* com curva de dissociação de 84,5°C.



Fonte: Santos 2021

Fig.4. Reação de RT-PCR de *A. marginale*, referentes às amostras de búfalas 1 a 42. A amplificação aconteceu no Ct 10,68 com curva de dissociação na temperatura de 84,5 °C. O ponto de cisão foi definido para o ciclo 30. Todas as amostras que exibiram as curvas de Ct após este foram consideradas negativas.



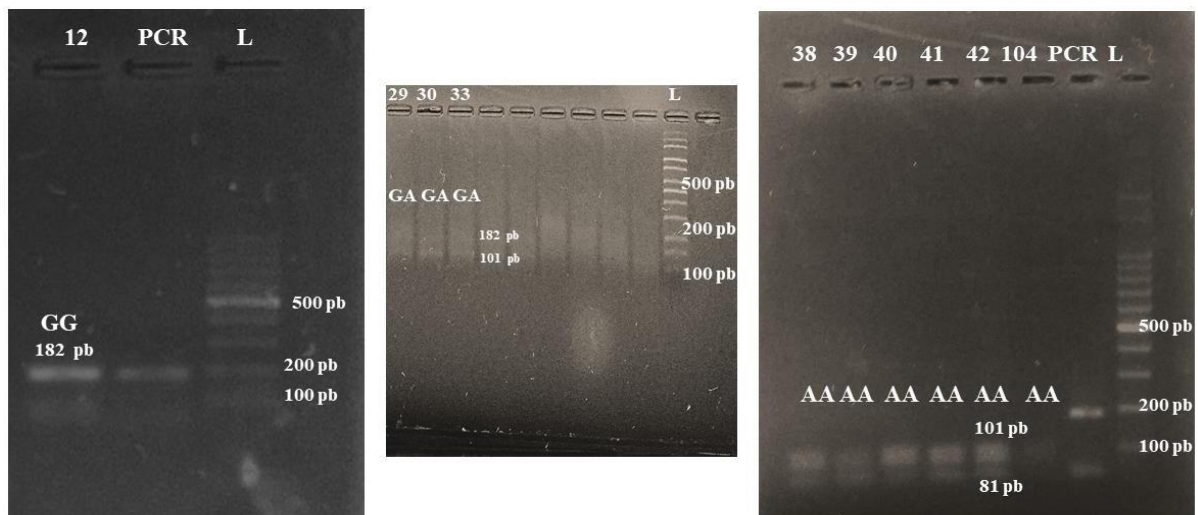
Fonte: Santos 2021

### Identificação do SNP g4467 G>A na região 3' UTR de IFN- $\gamma$ pela PCR-RFLP

Todas as búfalas foram genotipadas para detecção do SNP g4467 G>A na 3' UTR do IFN- $\gamma$ . A enzima *BspLI* (*NlaIV*), gerou padrões de banda diferentes para cada genótipo encontrado. Os genótipos gerados foram AA, GG e GA, ambos homozigotos para alelo mutante, homozigotos para o alelo selvagem e heterozigotos, respectivamente. Os três foram encontrados em todos os animais negativos (145) para as três hemoparasitoses avaliadas, porém nos animais positivos para *T. vivax* (12) somente foram encontrados os genótipos homozigotos mutantes e heterozigotos, com ausência do homozigoto selvagem.

Para os homozigotos GG os padrões de bandas verificados não foram cortados pela enzima *BspLI* (*NlaIV*) sendo demonstrado um fragmento de 182 pb, para os heterozigotos GA a enzima realizou corte no alelo A gerando fragmentos de 182 pb, 101 pb e 81 pb e para o homozigoto AA a mesma realizou corte nos dois alelos gerando fragmentos de 101 pb e 81 pb, os mesmos estão descritos na Figura 6.

Fig.6. Padrão dos genótipos para o SNP g 4467 G>A na 3' UTR do IFN- $\gamma$ . [12], [29 30 33] e [38 39 40 41 42 104]: amostras de búfalas e seus respectivos genótipos; [PCR]: PCR do gene IFN- $\gamma$  usado como controle para o GG; [L]: Padrão de massa molecular *Ladder* de 100 a 1000 pb (Cellco Biotec).



Fonte: Santos 2021

Além disso, o SNP analisado no presente estudo faz parte de uma região reconhecida pelo miRNA 125b o qual atua como um biomarcador de infecções e está descrito na Figura 7.

Fig.7. SNP g. 4467 G>A do gene IFN- $\gamma$  de búfalo pertence à sequência alvo do miRNA 125b. A ligação do miRNA 125b maduro é mostrada e o SNP g. 4467 G>A no qual consta o alelo A (mutante) está na primeira linha dentro da área demarcada em vermelho.

```

IFNG SNP Pos 4447-4470      5' AUUUCAAGGU UUUAU-CUCA AGGG 3'
IFNG REFERÊNCIA          5' AUUUCAAGGU UUUAU-CUCA GGGG 3'
                               |||      |||| |||
miRNA 125b                3' --AGUGUUCA AUCCCAGAGU CCCU 5'

```

Fonte: Santos 2021

### Diversidade genética da população

Apoiado nas frequências alélicas, genóticas, coeficiente de endocruzamento e no equilíbrio de Hardy-Weinberg foi possível identificar as diversidades genéticas (tabela 2) da população de búfalas leiteiras. Logo, o equilíbrio de Hardy-Weinberg determina que as frequências genóticas de GG, GA e AA para o SNP g4467 G>A foram de 3,4 %, 2,1 % e 94,5 % respectivamente. Assim como, o SNP avaliado apresentou desvio do EHW ( $P < 0,05$ ) e déficit de heterozigotos podendo ser evidenciado pelo valor de  $F_{IS}$  positivo (0,759). Sendo o alelo mutante do SNP (G→A) o que apresentou maior frequência (95,5%) em relação ao alelo selvagem (4,5%).

Tabela 2 - Diversidade genética da população bubalina para o SNP g4467 G > A na 3' UTR do gene IFN- $\gamma$ .

SNP	Alelos		Genótipos Observados			$F_{IS}$	EHW
g4467 (G → A)	G	A	GG (0,034)	GA (0,021)	AA (0,945)	0,759	0.000

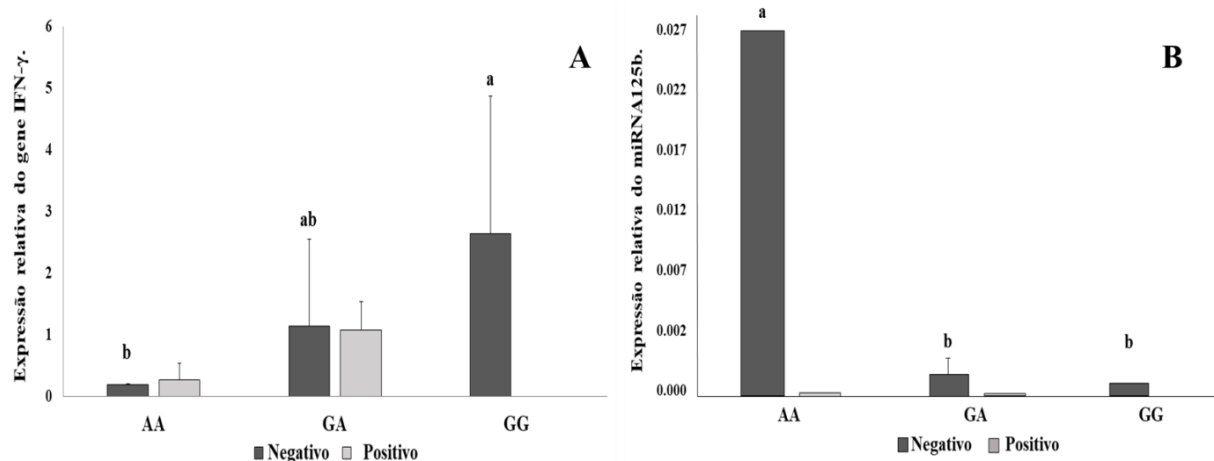
EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0,05$ );  $F_{IS}$ : coeficiente de endocruzamento da estatística F.

### Expressão da citocina IFN- $\gamma$ e miRNA 125b

Os animais negativos dos três genótipos exibiram níveis distintos de expressão tanto do IFN- $\gamma$  quanto do miRNA 125b assim como, os animais positivos para *T. vivax* com exceção do GG que não foi encontrado (Figura 8). Para o IFN- $\gamma$  as expressões foram maiores para os genótipos GA e GG negativos e AA positivo, com diferença estatística entre os genótipos GG e AA negativos ( $P < 0,05$ ) com o heterozigoto semelhante estatisticamente aos homozigotos. Contudo, para o miRNA 125b as expressões foram menores para os genótipos

AA e GA positivos e maiores para os três genótipos negativos, com diferença estatística do AA com o GA e com o GG ( $P < 0,05$ ). (Figura 8).

Fig.8. Expressão relativa do gene IFN- $\gamma$  (A) e miRNA 125b (B) nos diferentes genótipos (AA, GA e GG) de búfalas da região Amazônica negativas e positivas para *T. vivax*. Segundo a equação  $2^{-\Delta Ct}$ . Letras diferentes acima das barras indicam comparações pareadas significativas de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



Fonte: Santos 2021

### 3.4. Discussão

A planície Amazônica é uma área considerada de estabilidade enzoótica para as infecções provocadas pelo *T. vivax* e nesse local normalmente acontece de forma assintomática com a parasitemia contida pela resposta imune do hospedeiro em virtude da exposição contínua ao parasito (MADRUGA *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2016).

Tal resultado foi evidenciado no presente estudo, visto que aproximadamente 8,27 % das búfalas foram positivas assintomáticas para o *T. vivax* provavelmente, devido ao fato de estarem em constante contato com o agente infeccioso. O que pode estar relacionado com a presença de moscas e mutucas na propriedade, fato que aumenta a possibilidade de transmissão do *T. vivax* no rebanho acontecendo principalmente de animais altamente parasitados para outros (DESQUESNES *et al.*, 2009).

Nos búfalos a infecção é caracterizada por baixa parasitemia o que pode favorecer o estabelecimento de um equilíbrio entre o mesmo e o parasito, permitindo que a doença fique assintomática por um longo tempo, tipificando a fase crônica da doença (SHAW; LAINSON, 1972; RADOSTITS *et al.*, 2000). Em pesquisas realizadas na Venezuela as maiorias dos búfalos positivos para o gênero *Trypanossoma* apresentaram baixas parasitemias,

manifestando infecções crônicas (GARCÍA *et al.*, 2006). Todavia, os casos agudos de tripanossomose promovem perdas na produção de leite, abortos e infertilidade nos ruminantes gerando assim, grandes dispêndios econômicos que impactam diretamente na pecuária (BATISTA *et al.*, 2008b).

Além da importância da PCR no diagnóstico de muitas doenças infecciosas, as técnicas baseadas nela são empregadas em estudos epidemiológicos bem como, no uso de SNPs em programas de melhoramento animal abordando a genotipagem com intuito de viabilizar as informações contidas nos mesmos (COUTINHO *et al.*, 2010; GEURDEN *et al.*, 2010; LIMA, 2014). Em estudo realizado com crianças infectadas pelo parasita intestinal *Giardia lamblia* a reação RFLP através da enzima *BspLI* (*NlaIV*) juntamente com o sequenciamento do gene  $\beta$ -giardina revelou o genótipo AA com maior frequência (77,5%) na população geral, revelando também os subgenótipos AII, BIII/BIV e AI demonstrando que as infecções caracterizadas pelos diferentes subgrupos tem relação com a população humana, localização da mesma e contato com animais (HOOSHYAR *et al.*, 2017).

A enzima *BspLI* (*NlaIV*) também foi capaz de distinguir os genótipos para o SNP rs43382671 A>G no gene HDAC9 envolvido em processos de regulação e desenvolvimento de tecidos musculares em bovinos Canchim, onde o alelo G (mutante) apresentou frequência de 79,81% e o genótipo GG 61,27% sendo as maiores encontradas para o SNP. Além disso, o SNP apresentou efeito significativo sobre o valor genético aditivo (VGA) ( $P < 0,05$ ) para área de olho de lombo (AOL) (LIMA, 2014). A RFLP com uso da enzima *BspLI* empregada no presente estudo foi capaz de demonstrar os diferentes genótipos presentes do rebanho sendo o primeiro estudo de genotipagem em búfalos a utilizá-la (Fig. 6.).

De acordo com proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) os alelos dos genes são combinados de maneira aleatória formando os genótipos. Entretanto, quando ocorre alguma alteração essa pode indicar qual o processo genético estaria influenciando na variabilidade genética. Apoiado nisso, o SNP analisado no presente estudo apresentou desvio no EHW ( $P < 0,05$ ), sendo verificado déficit de heterozigotos baseado no valor de Fis positivo (MEEÛS, 2017). De forma que é provável que essa redução de indivíduos heterozigotos seja devido a fatores como efeitos de seleção, agrupamento de populações e o cruzamento consanguíneo, pois diminuem o número de alelos de uma população, aumentando consequentemente os indivíduos homozigotos (RAYMOND; ROUSSET, 1995; WILKINSON *et al.*, 2011).

Os polimorfismos encontrados em regiões não traduzidas dos genes (UTRs), em especial a 3' UTR influenciam na tradução de mRNA pós-transcricional, modificando os

sítios de ligação de miRNAs. Estudos principalmente em humanos demonstram que muitos SNPs localizados na 3' UTR ligados a sequência de miRNAs tem sido implicados na susceptibilidade ou início de doenças infecciosas (APPS *et al.*, 2013; HORNE *et al.*, 2016; RYAN, 2017; RAMSURAN *et al.*, 2018). Em bovinos e búfalos estudos de SNPs na 3'UTR de vários genes relacionados susceptibilidade ou resistência a doenças infecciosas foram reportados dentre elas a brucelose, tuberculose bovina (bTB) e mastite (GANGULY *et al.*, 2008; BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2013; IANNACCONE *et al.*, 2018b; EL-HALAWANY *et al.*, 2018).

A expressão de IFN- $\gamma$  observada nas búfalas negativas *T.vivax* avaliadas no presente estudo foi semelhante à expressão de IFN- $\gamma$  encontrada em bovinos Canchim com baixa parasitemia para *B. bovis* e *B. bigemina* (BILHASSI *et al.*, 2019). E essa expressão, pode estar ocorrendo devido ao papel da IL-10 não conseguir inibir a expressão regular de mRNA do IFN- $\gamma$ , o que talvez seja consequência de mecanismos de controle imunológico, acrescentado de perda ou processamento modificado de RNA (MOREIRA *et al.*, 2017).

Os perfis de expressão gênica de várias citocinas foram estudados em células mononucleares do sangue periférico de bovinos (PBMC) resistentes (N'Dama) e susceptíveis (Boran) a tripanossomose africana, sendo verificado aumento da expressão de mRNA de IFN- $\gamma$  em 4,3 vezes no gado resistente, esse aumento permite que os animais sejam capazes de controlar a infecção de forma mais eficaz por meio da resposta imune Th1 responsável pela regulação da liberação de IFN- $\gamma$  (HERTZ *et al.*, 1998). Com isso, pode-se inferir que as búfalas positivas assintomáticas do genótipo AA detectadas no estudo apresentaram níveis maiores de expressão do IFN- $\gamma$  para tentar controlar o parasitismo conferindo às mesmas susceptibilidade a infecção por *T. vivax*, quando comparadas aos genótipos negativos. Por outro lado, quanto ao heterozigoto GA e o homozigoto GG negativos pode-se inferir que, ambos podem conferir às búfalas resistência a infecção por *T. vivax*, pois, apresentaram níveis de expressão maiores do IFN- $\gamma$  além de possuírem o alelo G na sequência o que potencializa seu pareamento com o miRNA 125b fazendo-o expressar-se mais.

Em búfalos africanos (*Syncerus caffer*) a elevada resistência à tripanossomose se deu através da evolução em virtude da síntese de anticorpos específicos para a glicoproteína de superfície variante silenciosa (VSG) e a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molécula tripanocidas que provoca a eliminação do parasita no sangue (BLACK *et al.*, 2001). Por se tratar de uma hemoparasitose endêmica na região amazônica estudos voltados à evolução da espécie *Bubalus bubalis* com o foco na resistência a tripanossomose devem ser realizados baseados nos genes VSGs, bem como a expressão das citocinas pró-inflamatórias.



Aliado aos estudos de expressão estão os miRNAs, que podem se ligar na sequência alvo dos mRNAs atuando no processo de regulação e devido a isso, são considerados potenciais candidatos como biomarcadores de infecção (VELU *et al.*, 2012). Mas em animais de produção em geral os estudos voltados a expressão de miRNAs se concentraram essencialmente em funções na regulação de características para a produção como progresso e hipertrofia muscular, incremento de tecido adiposo e fertilidade (WANG *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2019; CAPRA *et al.*, 2020).

Uma vez que são apontados como competentes biomarcadores de imunidade Chen *et al.* (2014) demonstraram que a expressão de vários miRNAs dentre eles o miRNA 125b eram reduzidas em vacas saudáveis entretanto, aumentavam em vacas com mastite em 14 genes do complexo do Fator de Transcrição kappa B (NF- $\kappa$ B) envolvido na regulação da expressão de muitos genes ligados a resposta inflamatória. O que corrobora com a baixa expressão significativa ( $P < 0,05$ ) do miRNA 125b observada nas búfalas negativas dos genótipos GG, GA e AA para as hemoparasitoses. Desse modo, pode-se deduzir que a expressão reduzida do miRNA 125b reprime a expressão gênica na via de sinalização do NF- $\kappa$ B de animais saudáveis objetivando preservar o equilíbrio imunológico.

Outra pesquisa realizada com bubalinos demonstrou que a genotipagem do SNP g4467 G>A no gene IFN- $\gamma$  revelou indivíduos AA com uma forte pré-disposição para bTB devido a presença do alelo A na sequência inibir a ligação do miRNA 125b com o mRNA do IFN- $\gamma$ , provocando então a susceptibilidade. Propondo também que o SNP pode ser um relevante marcador molecular em programas de melhoramento animal (IANNACCONE *et al.*, 2018b). Logo, o desenvolvimento de pesquisas de potenciais marcadores de imunidade associado à presença de miRNAs diretamente relacionados às hemoparasitoses em búfalos se faz extremamente necessário, dado que para outras doenças infecciosas estes se mostram bem estabelecidos.

### 3.5. Conclusão

A determinação da expressão gênica aliada aos genótipos para o SNP avaliado no estudo forneceu mais esclarecimentos de como os processos imunológicos acontecem em búfalas negativas e positivas assintomáticas para *T. vivax*. No qual, as búfalas negativas do genótipo GG foram capazes de demonstrar maior resistência a infecção devido as maiores expressões da citocina IFN- $\gamma$  bem como do miRNA 125b, quando comparadas as búfalas positivas dos genótipos GA e AA com expressão maior da citocina IFN- $\gamma$  e menor do miRNA 125b. Dessa

maneira, o presente estudo pode favorecer o desenvolvimento de futuras pesquisas referentes à resistência ou susceptibilidade de tripanossomose na espécie.

## REFERÊNCIAS

- Apps R, Qi Y, Carlson J, *et al.*, 2013. Influência do nível de expressão de HLA-C no controle do HIV. *Ciência* 340 :87-91.
- Balasubramaniam S, Kumar S, Sharma A, *et al.*, 2013. Microsatellite (GT)<sub>n</sub> polymorphism at 3'UTR of SLC11A1 influences the expression of brucella LPS induced MCP1 mRNA in buffalo peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol.* Apr 15;152(3-4):295-302.
- Batista JS, Bezerra FSB, Lira RA, *et al.*, 2008b. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.1, p.63-69.
- Bilhassi TB, Giglioti R, Okino CH, *et al.*, 2019. Differential IL10 mRNA Profiles Associated to *Babesia bovis* and *B. bigemina* Infection Levels in Persistently Infected Animals. *Open Journal of Veterinary Medicine* , 9, 161-169.
- BlackSJ, Seed JR, Murphy NB, *et al.*, 2001. Innate and acquired resistance to african trypanosomiasis. *Journal of Parasitology, Lawrence*, v. 87, n. 1, p. 1-9.
- Boichard D, Ducrocq V, Croiseau P, *et al.*, 2016. Genomic selection in domestic animals: principles, applications and perspectives. *Comptes rendus biologiques*, v. 339, p. 274–277.
- Butenschoen O, Scheu S, Eisenhauer N. 2011. Interactive effects of warming, soil humidity and plant diversity on litter decomposition and microbial activity. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 1902-1907.
- Capra E, Lazzari B, Russo M, *et al.*, 2020. Seasonal effects on miRNA and transcriptomic profile of oocytes and follicular cells in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Scientific Reports*. 10:13557.
- Carneiro DS, 2019. Avaliação da taxa de transmissão transplacentária de *babesia bovis* e *Anaplasma marginale* e monitoramento quantitativo da parasitemia em bezerros bovinos. 2019. 46f. Dissertação (mestrado) Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém/Pará.
- Chen L, Liu X, Li Z, *et al.*, 2014. Expression differences of miRNAs and genes on NF-κB pathway between the healthy and the mastitis Chinese Holstein cows. *Gene*, 545(1), 117–125.
- Coutinho LL, Rosário MFD, Jorge EC 2010. *Biotechnologia animal. Estudos avançados*, v 24, n. 70, p. 123-147.
- Da Silva JAR, Garcia AR, De Almeida AM, *et al.*, 2021. Water buffalo production in the Brazilian Amazon Basin: a review. *Tropical Animal Health and Production*, 53(3).
- Day PM, Thompson CD, Lowy DR, *et al.*, 2017. Interferon gamma prevents infectious entry of human papillomavirus 16 via an I2-dependent mechanism. *Journal of virology*, v. 91, p. 1-19.
- De Meeûs T, 2017. Revisiting FIS, FST, Wahlund effects, and null alleles. *Journal of Heredity*, v. 109, n. 4, p. 446-456.

Desquesnes, M, Biteau-Coroller F, Bouyer J, *et al.*, 2009. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. *Int. J. Parasitol.* 39: 333–346.

El-Halawany N, Shawky Abd-El-Monsif A, Al-Tohamy AFM, *et al.*, 2018. Effect of complement component 5 polymorphisms on mastitis resistance in Egyptian buffalo and cattle. *Res vet sci.* aug;119:45-51.

Ganguly I, Sharma A, Singh R, *et al.*, 2008. Association of microsatellite (GT)<sub>n</sub> polymorphism at 3'UTR of NRAMP1 with the macrophage function following challenge with *Brucella* LPS in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Microbiol Veterinário.* 129(1-2):188-96.

Garcia AR, 2013. Conforto térmico na reprodução de bubalinos criados em condições tropicais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 37: 121-130.

García H, García ME, Pérez G, *et al.*, 2006. Trypanosomiasis in venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 100, p. 297-305, 2006.

Garcia HA, Ramírez OJ, Rodrigues CMF, *et al.*, 2016. *Trypanosoma vivax* in water buffalo of the Venezuelan Llanos: An unusual outbreak of wasting disease in an endemic area of typically asymptomatic infections. *Veterinary Parasitology*, v. 230, p. 4955.

Geurden T, Vercruysse J, Claerebout E, *et al.*, 2010. Is Giardia a significant pathogen in production animals? *Exp Parasitol.* Jan;124(1):98-106.

Hertz CJ, Filutowicz H, Mansfield JM, *et al.*, 1998. Resistance to the African trypanosomes is IFN-gamma dependent. *J Immunol* 161: 6775– 6783.

Hooshyar H, Ghafarinasab S, Arbabi M, *et al.*, 2017. Genetic Variation of Giardia lamblia Isolates from Food-handlers in Kashan, Central Iran. *Iran J Parasitol: Vol. 12, No. 1, Jan-Mar* pp.83-89.

Horne DJ, Graustein AD, Shah JA, *et al.*, 2016. Variação do ULK1 humano e suscetibilidade à infecção por Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis.* 214 :1260-7.

Huang J, Wang S, Feng X, *et al.*, 2019. miRNA transcriptome comparison between muscle and adipose tissues indicates potential miRNAs associated with intramuscular fat in Chinese swamp buffalo. *Genome.* nov;62(11):729-738.

Iannaccone M, Cosenza G, Pauciullo A, *et al.*, 2018b. The SNP g.4667G>A at 3'-UTR of IFNG gene is associated with susceptibility to bovine tuberculosis in Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal genetics.* 49 (5).

Ibge – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM) Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>> Acesso em: 03 agosto 2021.

Javed M, Raza SA, Nadeem A, *et al.*, 2021. Exploring the potential of interferon gamma gene as major immune responder for bovine tuberculosis in river buffalo. *Biomed research international*, p. 1-7.

Kordick SK, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, *et al.*, 1999. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in north carolina. *Journal of clinical microbiology, washington*, v. 37, p. 2631-2638.

Lima AO, 2014. Validação de SNPs associados com área de olho de lombo em bovinos Canchim. 89f. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2014.

Livak KL, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta C_t}$  method. *Methods*. 25: 402–408.

Madruga CR, 2009. Epidemiologia do *Trypanosoma vivax* no Brasil. *Cien. Anim. Bras., Suppl. 1*, p. 1-10.

Martin AR, Dunstan RH, Roberts TK, *et al.*, 2006. *Babesia canis vogeli*: a novel PCR for its detection in dogs in australia. *Experimental parasitology, new york*, v. 112, p. 63-65.

Mingala CN, Odbileg R, Konnai S, *et al.*, 2006. Comparative assessment of th1 and th2 cytokines of swamp type buffalo and other bubaline breeds by molecular cloning, sequencing and phylogenetics. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 113, p. 348–356.

Moreira-Teixeira L, Redford PS, Stavropoulos E, *et al.*, 2017. T Cell-Derived IL-10 Impairs Host Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *The Journal of Immunology* , 199, 613-623.

Posada-guzmán MF, Dolz G, Romero-zúñiga J.J, *et al.*, 2015. Detection of babesia caballi and theileria equi in blood from equines from four indigenous communities in costa rica. *Vet. Med. Intern.* 2015:1-6.

Premraj A, Sreekumar E, Nautiyal B, *et al.*, 2005. Molecular cloning and expression profile analysis of interleukin-10 and interleukin-18 cDNA of indian water buffalo (*bubalus bubalis*). *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 107, p. 337–347.

Premraj A, Sreekumar E, Rasool TJ, 2006. Cloning and biological characterization of buffalo (*bubalus bubalis*) interferon- $\gamma$ . *Molecular immunology*, v. 43, p. 717–724.

Radostitis OM, Blood DC, Gay CC, 2002. Clínica veterinária um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara, 1737pp.

Radostits OM, Mayhew IG, Houston DM, *et al.*, 2000. *Veterinary clinical examination and diagnosis*: WB Saunders. 1ª ed., 800p.

Ramsuran V, Ewy R, Nguyen H, *et al.*, 2018. Variation in the Untranslated Genome and Susceptibility to Infections. *Front. Immunol.* 9:2046.

Raymond M, Rousset F, 1995b. Genepop version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity*, v. 86, p. 248-249.

Reis MO, Souza FR, Albuquerque AS, *et al.*, 2019. Epizootic Infection by *Trypanosoma vivax* in Cattle from the State of Minas Gerais, Brazil. *Korean J Parasitol* 2019. v. 57, No. 2: 191-195. *Korean J Parasitol* Vol. 57, No. 2: 191-195.

Ryan BM, 2017. microRNAs in Cancer Susceptibility. *Adv Cancer Res.* 135:151-171.

Safari A, Ghavi NH, Shadparvar AA, *et al.*, 2018. A review on breeding and genetic strategies in Iranian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Tropical Animal Health and Production* 50: 707–714.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.y., cold spring harbor laboratory press, 1659 p.

Sgorbini M, Bnelli F, Nardoni S, *et al.*, 2015. Seroprevalence and molecular analysis of babesia caballi and theileria equi in horses from central italy during a 10-year period. *J. Eq. Vet. Sci.* 35: 865-868.

Shaw JJ, Lainson R, 1972. *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Annals of tropical medicine and parasitology.* 66(1):25-32.

Shebannavar S, Rasool T, 2015. Molecular cloning, sequence, and phylogenetic analysis of t helper 1 cytokines of pashmina goats. *Animal biotechnology*, v. 26, p. 120–129.

Suzuki S, Konnai S, Okagawa T, *et al.*, 2012. Molecular cloning and characterization of th1 and th2 cytokines of african buffalo (*syncerus caffer*). *International journal of immunogenetics*, v. 39, p. 170–182.

Velu VK, Ramesh R, Srinivasan AR, 2012. Circulating MicroRNAs as Biomarkers in Health and Disease. *J. Clin. Diagn Res.* 6, 1791–1795.

Wang X, Gu Z, Jiang H, *et al.*, 2013. MicroRNAs in farm animals. *Animal.* 7, 1567–1575.

Wilkinson S, Wiener P, Teverson D, *et al.*, 2011. Characterization of the genetic diversity, structure and admixture of British chicken breeds. *Animal Genetics*, v. 43, n. 5, p. 552-563.

Xiang Y, Liu W, Jia P, *et al.*, 2017. Molecular characterization and expression analysis of interferon-gamma in black seabream *acanthopagrus schlegelii*. *Fish & shellfish immunology*, v. 70, p. 140–148.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

Em conclusão, o processo de genotipagem das búfalas leiteiras realizado pela técnica PCR RFLP mostrou-se apropriado, podendo ser aplicado em outros rebanhos. Entretanto, para a população investigada o SNP g4467 G>A encontrado apresentou baixa variabilidade devido ao fato do rebanho leiteiro certamente encontrar-se sob pressão de seleção. Ademais, a detecção do SNP g4467 G>A na 3' UTR do gene IFN- $\gamma$  juntamente com a associação significativa para o miRNA 125b dos animais negativos GA e GG para *T. vivax* através do pareamento parcial com o mRNA do IFN- $\gamma$ , pode promover a inibição da tradução além de interferir diretamente com os fatores de transcrição ou alterar a função da cauda poli-A. Logo, a mesma deve ser investigada mais a fundo em bubalinos visando a utilização do SNP como possível marcador molecular de resistência as principais hemoparasitoses endêmicas na região Amazônica, a exemplo da tripanossomose.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Cellular and molecular immunology - 9. ed. - **Elsevier**, 2019. - Com Student Consult.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (2018). Cellular and Molecular Immunology, 9ª edição, ed. **Elsevier**.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular - 8. ed. - Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2015. 549p.
- ABCB. Raças. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Disponível em: <<https://www.bufalo.com.br/racas/>> Acesso em: 03 novembro 2021.
- ALMEIDA, L. S.; SENA, L. M.; BARIONI, G.; MORAES, T. M. A.; OLIVEIRA, R. E. Comparação entre métodos de avaliação direta para o diagnóstico de babesiose em bovinos. **Research, Society and Development**, 8(10). (2019).
- ANDRADE, A. Q.; MENDONÇA, C.; SOUTO, R.; SAMPAIO, P.; FIDELIS JUNIOR, O.; ANDRÉ, M. R. et al. Diagnostic, Clinical and Epidemiological aspects of dairy cows naturally infected by *Trypanosoma vivax* in the states of Pernambuco and Alagoas, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, 2019.
- AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of Bovine anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, n. 1, p. 1–30, 2011.
- BALTIMORE, D.; BOLDIN, M. P.; O'CONNELL, R. M.; RAO, D. S. TAGANOV, K. D. (2008) MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. **Nat Immunol** 9, 839-845.
- BARTEL, D. P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell** 136, 215-233.
- BASSI, P. B. **Cinética dos parâmetros clínicos, hematológicos e imunológicos em bovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax***. 2014. 91f. Dissertação (Mestrado), Universidade de Uberaba – UNIUBE, Uberaba, 2014.
- BASSI, P. B.; ARAÚJO, F. F. DE; GARCIA, G. C.; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, C. J. F.; BITTAR, E. R.; GOMES, M. S.; AMARAL, L. R.; SILVA, M. F. C.; NASCENTES, G. A. N.; JUNIOR, V. R.; MARTINS-FILHO, O. A.; ARAÚJO, M. S. S.; BITTAR, J. F. F. Parasitological and immunological evaluation of cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Experimental Parasitology**, v. 185, p. 98–106, 2018.
- BATISTA, H. R.; SARTURI, C.; STELMACHTCHUK, F. N.; OLIVEIRA, D. R.; MORINI, A. C.; GENNARI, S. M.; MARCILI, A.; BASTOS, F. A. N.; L.; BARATA, E. S.; MINERVINO, A.; H. H. Prevalence and risk factors associated with ectoparasite infestation of buffaloes in an Amazonian ecosystem. **Parasites & Vectors** (2018) 11:335
- BATISTA, J. S., RODRIGUES, C. M.; OLINDA, R. G.; SILVA, T. M.; VALE, R. G.; CÂMARA, A. C.; TEIXEIRA, M. M. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax*



infectious in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitology Research**, 110(1), 73-80. 2012.

BATISTA, J. S.; OLIVEIRA, A.; RODRIGUES, C.; DAMASCENO, C.; OLIVEIRA, I.; ALVES, H.; PAIVA, E.; BRITO, P.; MEDEIROS, J.; RODRIGUES, A.; TEIXEIRA, M. M. G. Infection by *Trypanosoma vivax* in goats and sheep in the Brazilian semiarid region: from acute disease outbreak to chronic cryptic infection. **Vet. Parasitol.** 165 (2009) 131–135.

BATTILANI, M. et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. Infection, **Genetics and Evolution**, v. 49, p. 195–211, 2017

BOICHARD, D.; DUCROCQ, V.; CROISEAU, P.; FRITZ, S. Genomic selection in domestic animals: Principles, applications and perspectives. **Comptes Rendus Biologies**, v. 339, p. 274–277, 2016.

BRITO, L. G.; BARBIERI, F. S.; FERREIRA, T. A. A.; CARNEIRO, D. S.; AMARAL, T. M.; FIGUEIRÓ, M. R.; OLIVEIRA, M. C. S. **Transmissão congênita de *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* na epidemiologia da tristeza parasitária bovina**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2019. 18p. (Embrapa Amazônia Oriental. Circular técnica, 48).

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick Immunobiology. **Parasitology**: 129, p. 161-176, 2004.

BROWN, W. C. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. **Vet. Parasitol.** 101, 233–248.

BUCHMANN, K. Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 1-8, 2014.

CHAUDHURI, A. A.; SO, A. Y.; SINHA, N. et al (2011) MicroRNA- 125b potentiates macrophage activation. **J Immunol** 187, 5062-5068.

COSTA, S. C. L.; MAGALHÃES, V. C. S.; OLIVEIRA, U. V.; CARVALHO, F. S.; ALMEIDA, C. P.; MACHADO, R. Z.; MUNHOZ, A. D. Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens: Frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 2, p. 270–275, 2016.

COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F. D.; JORGE, E. C. **Biotecnologia animal. Estudos Avançados**. 2010; 24: 123-47.

DABUS, D. M. M.; CAMPOS, D. F.; NEVES, M. F. *Trypanosoma vivax*. **Revista Eletrônica Científica da UERGS.**, 2161, 12. 2011.

DAMÉ, M. C. F. **Sanidade de Bubalinos**. In: PESSOA, R.; BERNARDES, O.; Assumpção, J. C.; ROSSATO, C.; GHASPAR, J. **Boletim do Búfalo**. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB). São Paulo, n. 03, p. 9-10, 2019.

DHARAP, A.; POKRZYWA, C.; MURALI, S.; PANDI, G.; VEMUGANTI, R. MicroRNA miR324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. **PLoS One** 2013;8(11):e79467.

ESTES, D. M.; BROWN, W.C. The type 1/type 2 paradigm and regulation of humoral immune responses in cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 90, 10. 2002.

FARBER, M.; WILKOWSKY, S.; GUILLEMI, E.; ARIAS, L. L.; ORTIZ, J. J.; PAOLETTA, M.; MONTENEGRO, V.; FOURNIERE, S. “Bovine Sadness Complex” (piroplasmosis), a great problem for tropical and subtropical regions. **Biological and Health Sciences.** (2016).

FERREIRA, T. A. A. **Diagnóstico molecular e taxas de infecção de Anaplasma marginale e Babesia bovis em rebanhos bovínos e artrópodes parasitas na Amazônia.** Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Aplicada a Agropecuária. Belém: Universidade Federal Rural da Amazônia. (2019).

FIGUEIRÓ, M. R.; SARAIVA, N. Z. **Principais estratégias de manejo sanitário na bubalinocultura.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 2018. 32p.

FRIEDMAN, J. M.; JONES, P. A. (2009) MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease. **Swiss Med Wkly** 139, 466-472

GALAY, R. L.; LLANETA, C. R.; MONREAL, M. K. F. B.; ARMERO, A.L. III.; BALUYUT, A. B. D.; REGINO, C. M. F.; SANDALO, K. A. C.; DIVINA, B. P.; TALACTAC, M. R.; TAPAWAN, L. P.; MOJARES, M. C. L.; ALVAREZ, C. R.; MAGO, E. R.; ENCARNACION, N. D.; ANDOH, M.; TANAKA, T. Molecular Prevalence of Anaplasma marginale and Ehrlichia in Domestic Large Ruminants and Rhipicephalus (Boophilus) microplus Ticks From Southern Luzon, Philippines. **Front. Vet. Sci.** 8:746705. (2021).

GALIZA, G. J.; GARCIA, H. A.; ASSIS, A. C.; OLIVEIRA, D. M.; PIMENTEL, L. A.; DANTAS, A.F.; SIMOES, S.V.; TEIXEIRA, M. M. G.; RIET-CORREA, F. High mortality and lesions of the central nervous system in trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. **Vet. Parasitol.** 182 (2011) 359–363.

GARCIA, H. A.; RAMÍREZ, O. J.; RODRIGUES, C. M.; SÁNCHEZ, R. G.; BETHENCOURT, A. M.; PÉREZ, D. M. G.; MINERVINO, A. H.; RODRIGUES, A. C.; TEIXEIRA, M. M. G. Trypanosoma vivax in water buffalo of the Venezuelan llanos: an unusual out break of wasting disease in an endemic area of typically asymptomatic infections, **Vet. Parasitol.** 230 (2016) 49–55.

GIL, F. M. M.; CAMARGO, G. M. F.; SOUZA, F. R.; CARDOSO, D. F. ; FONSECA, P. D. S.; ZETOUNI, L.; BRAZ, C. U.; ASPILCUETA-BORQUIS, R. R.; TONHATI, H. Polymorphisms in the ghrelin gene and their associations with milk yield and quality in water buffaloes. **Journal of dairy science,** v. 96, n. 5, p. 3326-3331, 2013.

IANNACCONI, M.; COSENZA, G.; PAUCIULLO, A.; MARTINO, G.; CAPPARELLI, R. The SNP g.4667G>A at 3'-UTR of IFNG gene is associated with susceptibility to bovine tuberculosis in Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal genetics.** 2018b. 49 (5).

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM) Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>> Acesso em: 03 agosto 2021.

ILIOPOULOS, D. (2014) MicroRNA circuits regulate the cancer-inflammation link. **Sci Signal** 7, p.8.

IOANNIDIS, J. P.; NTZANI, E. E.; TRIKALINOS, T. A.; CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D. G. Replication validity of genetic association studies. **Nat Genet** 29, 2001;29(3):306-9.

KATO, C. D., MATOVU, E., MUGASA, C. M., NANTEZA, A., ALIBU, V. P. The role of cytokines in the pathogenesis and staging of *Trypanosoma brucei* rhodesiense sleeping sickness. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* v. 12, n. 4, p. 1-10, 2016.

LAI, Y-C.; FUJIKAWA, T.; MAEMURA, T.; ANDO, T.; KITAHARA, G.; ENDO, Y.; YAMATO, O.; KOIWA, M.; KUBOTA, C.; MIURA, N. Inflammation-related microRNA expression level in the bovine milk is affected by mastitis. **PLoS ONE** 12(5): e0177182. (2017).

LEE, H. M.; KIM, T. S.; JO, E. K. MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. **BMB Reports**. 49(6): 311-318. 2016.

LINDSAY, M. A. (2008) microRNAs and the immune response. **Trends Immunol** 29, 343-351.

LOURENÇO, J.; J.; B. GARCIA, A.; R. Produção animal no bioma amazônico: atualidades e perspectivas. **Anais de Simpósios da 43ª Reunião Anual da SBZ – João Pessoa – PB, 2006.**

MANICA, S. **Tristeza Parasitária Bovina Revisão Bibliográfica.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. (2013).

McDANIELL, R.; LEE, B. K.; SONG, L.; LIU, Z.; BOYLE, A. P.; ERDOS, M. R.; SCOTT, L. J.; MORKEN, M. A.; KUCERA, K. S.; BATTENHOUSE, A.; KEEFE, D.; COLLINS, F.S.; WILLARD, H. F.; LIEB, J.D.; FUREY, T. S.; CRAWFORD, G. E.; IYER, V. R.; GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 381–391, 2009.

MENDES, N. S. **Ocorrência e diversidade genética de babesia bovis em bovinos de corte amostrados no pantanal sul mato-grossense.** Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agropecuária. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista. (2019).

MINERVINO, A.H.H., ZAVA, M., VECCHIO, D., BORGHESE, A. *Bubalus bubalis*: A short story. **Frontiers in veterinary Science**, Suíça, v. 7, art. 570413, p.1-15, dec. 2020.

NASCIMENTO, E. C.; CRUZ, B. E. V.; CALVI, M. F. Queijos diferentes, origem geográfica comum: história e tradição da produção dos queijos do Marajó. **Ateliê Geográfico - Goiânia-GO**, v. 13, n. 3, dez./2019, p. 190 – 208.

NCBI. **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).** Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>> Acesso em: 07 dezembro 2021.

NÉO, T. A. **Níveis de infecção de Babesia bovis, B. bigemina e Anaplasma marginale em búfalos criados no estado de São Paulo.** 2016. 93 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Front Endocrinol** (Lausanne). 2018. 9:402. Review.

O'CONNELL, R. M.; RAO, D. S.; CHAUDHURI, A. A.; BALTIMORE, D. (2010) Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. **Nat Rev Immunol** 10, 111-122

PEREIRA, H. D.; SIMÕES, S. V. D.; SOUZA, F. A. L.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, M. F. B.; CADIOLI, F. A.; SAMPAIO, P. H. Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 38(5) 896-901. 2018.

PIMENTEL, P. G. **Nutrição de Búfalos. Os búfalos, nós e os desafios que enfrentamos.** In: PESSOA, R.; BERNARDES, O.; Assumpção, J. C.; ROSSATO, C.; GHASPAR, J. **Boletim do Búfalo.** Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB). São Paulo, n. 03, p. 7-8, 2019.

PLOTNIKOVA, O.; BARANOVA, A.; SKOBLOV, M. Comprehensive analysis of human microRNA-mRNA interactome. **Front Genet.** 2019;10:933

RAJAEI, A.; BARNETT, R.; CHEADLE, W. G. Pathogen- and Danger-Associated Molecular Patterns and the Cytokine Response in Sepsis. **Surgical Infections**, v. 19 (2), p. 107-116, 2018.

REHMAN, S. U.; HASSAN, F. U.; LUO, X.; LI, Z.; LIU, Q. Whole-Genome Sequencing and Characterization of Buffalo Genetic Resources: Recent Advances and Future Challenges, **Animals**, v. 11, p. 904, 2021.

REIS, M. O.; SOUZA, F. R.; ALBUQUERQUE, A. S.; MONTEIRO, F.; OLIVEIRA, L. F. D. S.; RAYMUNDO, D. L.; WOUTERS, F.; WOUTERS, A. T. B.; PECONICK, A. P.; VARASCHIN, M. S. Epizootic infection by *Trypanosoma vivax* in cattle from the state of Minas Gerais, Brazil. **Korean J. Parasitol.** 57 (2019) 191-195, 2019. 57.2.191.

ROLDAN-MONTES, V.; CARDOSO, D. F.; HURTADO-LUGO, N. A.; DO NASCIMENTO, A. V.; SANTOS, D. J. A.; SCALEZ, D. C. B.; DE FREITAS, A. C.; HERRERA, A. C.; ALBUQUERQUE, L. G.; DE CAMARGO, G. M. F.; TONHATI, H. Polymorphisms in TLR4 Gene Associated With Somatic Cell Score in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Front. Vet. Sci.** 7:568249. 2020.

ROSA, A. N.; MENEZES, G. R. O.; EGITO, A. A. Recursos genéticos e estratégias de melhoramento. In: ROSA, A. N.; MARTINS, E. N.; MENEZES, G. R. O.; SILVA, L. O. C. (Ed.). Melhoramento genético aplicado em gado de corte: Programa Geneplus-Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 26-41 p.

ROSÁRIO, C.J.M.; DOMINICI, M.F.; BRAGA, M.S.C.O.; LIMA, C.A.A.; PEREIRA, J.G.; MELO, F.A. Quantification of IL-10 and IFN- $\gamma$  in dogs with or without clinical signs of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, p. 129-132, jan. 2018.

RUSSELL, C. D.; WIDDISON, S.; LEIGH, J. A.; COFFEY, T. J. "Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine Toll-like receptor 1 gene and association with health traits in cattle," **Veterinary Research**, vol. 43, no. 1, p. 17, 2012.

SANTOS, C.L.R.; SANTOS JÚNIOR, J.B.; CUNHA, M.C.; NUNES, S.R.F.; BEZERRA, D.C.; TORRES JÚNIOR, J.R.S.; CHAVES, N.C. Nível tecnológico e organizacional da cadeia produtiva da bubalinocultura de corte no estado do Maranhão. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.83, p.1-8, art.e0022014, 2016.

SANTOS, L. R.; GASPAR, E. B.; BENAVIDES, M. V.; TRENTIN, G. (2019). **Tristeza Parasitária Bovina - Medidas e controle atuais**. Cap 6, p. 86 - 97. In: ANDROTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. (Ed.). Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Brasília, DF: Embrapa.

SCHMIDT, P.; KÜHN, C.; MAILLARD, J. C.; PITRA, C.; TIEMANN, U.; WEIKARD, R.; SCHWERIN, M. "A comprehensive survey for polymorphisms in the bovine IFN- $\gamma$  Gene reveals a highly polymorphic intronic DNA sequence allowing improved genotyping of Bovinae," **Journal of Interferon & Cytokine Research**, vol. 22, no. 9, pp. 923–934, 2002.

SIGNOR, S. A.; NUZHIDIN, S. V. The evolution of gene expression in cis and trans. **Trends Genet.** 34(7): 532–544. 2018.

SILVA, J. B.; FONSECA, A. H.; BARBOSA, J. D.; CRUZ, A. C.; FUENTE, J. L. Low genetic diversity associated with low prevalence of *Anaplasma marginale* in water buffaloes in Marajó Island, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 801–804, 2014.

SILVEIRA, J.A.G.; OLIVEIRA, C.H.S.; SILVESTRE, B.T.; ALBERNAZ, T.T.; LEITE, R.C.; BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; RIBEIRO, M. F. B. Molecular assays reveal the presence of *Theileria* spp. and *Babesia* spp. in Asian water buffaloes (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758) in the Amazon region of Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, Amsterdam, v. 7, p. 1017-1023, July. 2016.

SINGH, U.; DEB, R.; ALYETHODI, R. R.; ALEX, R.; KUMAR, S.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K.; SHARMA, A. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. **Biomarkers and Genomic medicine**, v. 6, n. 2, p. 49-58, 2014.

SOUZA, V. F. Manejo sanitário do rebanho. In: ROSA, A. N.; MARTINS. E. N.; MENEZES, G. R. O.; SILVA, L. O. C. (Orgs.). **Melhoramento genético aplicado ao gado de corte: Programa Geneplus-Embrapa**. Brasília: Embrapa, 2013. 256p. cap.07

STIJLEMANS, B.; RADWANSKA, M.; TREZ, C. DE; MAGEZ, S. African trypanosomes undermine humoral responses and vaccine development: Link with inflammatory responses? **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 582, 2017.

TISDELL, C. A.; HARRISON, S. R.; RAMSAY, G. C. The economic impacts of endemic diseases and disease control programmes. **Rev Sci Tech.** (1999).


VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genet Sel Evol.** 2002; 34(3): 275-305.

ZHANG, X. H.; ZHANG, Y. N.; LI, H. B. et al (2012) Overexpression of miR-125b, a novel regulator of innate immunity, in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Am J Respir Crit Care Med** 185, 140-151.

## ANEXO

## Regras para formatação de artigos da revista Pakistan Veterinary Journal

## Author's Guide

 Check list

 Copyright Release Form

## GUIDELINES FOR AUTHORS

**Introduction:** The Pakistan Veterinary Journal (PVJ), a peer reviewed journal with **Impact Factor: 1.803** in JCR 2021 has been published quarterly by the Faculty of Veterinary Science, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan, since 1981.

**Scope:** It publishes original research manuscripts and review articles on health and diseases of animals including its various aspects like pathology, microbiology, pharmacology, parasitology and its treatment.

**Manuscripts** are accepted for publication on the understanding that they have not been published and are not being considered for publication elsewhere. It is assumed that all named authors agree with the contents and form of the manuscript and are responsible for the validity and originality of data contained therein. It is the author's responsibility to validate the contents of the manuscript, however, management of the PVJ will not be responsible for the contents of manuscripts published.

Submitted manuscripts are subjected to check for Similarity Index (by applying appropriate software) with the published papers in different journals and various internet sources. If the Similarity Index is more than 19%, manuscript is liable to be rejected.

It is also assumed that the study has been conducted in accordance with the animal welfare laws of the country where the work was undertaken. The PVJ will reject any manuscript where there is enough reason to believe that animals/birds have been subjected to unnecessary or avoidable pain or distress.

The copyright of manuscripts accepted for publication belongs to PVJ. All contributions are subjected to editorial revision. Editorial Board/ Editor's decision regarding manuscript acceptance/ rejection will be final and can't be challenged anywhere.

Manuscript must be submitted through E-mail: [editor@pvj.com.pk](mailto:editor@pvj.com.pk); [editor.pvj@uaf.edu.pk](mailto:editor.pvj@uaf.edu.pk). Manuscripts should be English (US spellings) typewritten using Times New Roman font size 12 on A4 size paper with 1" margin on each side and double spaced throughout. All pages must be numbered in the upper right corner and line-numbered continuously.

**Title/first page** of the manuscript should carry full title, the initials and surname(s) of the author(s), the name and address of the institution(s) where the work was carried out and addresses of co-author(s) if different from that of the first author. **Statement of novelty** about the manuscript be explained in 3-4 sentences at first pages. The statement of novelty must not be a repetition of the abstract. While concocting the novelty statement make sure to address the significance and innovation/originality of the work, with respect to existing literature, and the scientific impact and interests to our readership. **Manuscript lacking novelty is liable to be rejected.**

The category of the article i.e. original full length article, review article, short communication, or case report should be clearly indicated on top left corner of the first page. Each author should be identified using a superscript number and the corresponding author designated by an asterisk. All the text, tables, and figures should be included in one file, i.e., MS Word or compatible. Tables and figures must be arranged at the end of the text.

**Authors contribution:** Authors will declare the contribution of each author like JV and MP conceived and designed the review/project/study. DL, MC and IL executed the experiment and analyzed the sera and tissue samples. IJ analyzed the data. All authors interpreted the data, critically revised the manuscript for important intellectual contents and approved the final version. Place author's contribution before references.

**Potential reviewers:** At the time of submission, names of three potential reviewers (their designation, institute, **official postal address, telephone, fax and official e-mail address**) must be provided on a separate sheet/file. Among these, two proposed reviewers must be from technologically advanced countries, viz., Australia, Canada, France, Germany, Italy, Korea, New Zealand, UK or USA.

**Review process:** Journal has double blind review policy. The journal's management will try to get the submitted manuscript reviewed as early as possible. Usually reviewers are requested to complete the review as early as possible; however, delay in the review process will not be on the part of PVJ management. If all processes from complete submission to revision go smoothly, then 10-12 weeks are required to reach to a conclusion (Acceptance/Rejection).

**Files required at the time of submission:** Following files/documents are required: 1) Manuscript (MS Word or compatible); 2) Check list (available at: <http://pvj.com.pk/Check-list-Submission.pdf>); if in checklist any point is not answered in yes, then it will be incomplete submission, and 3) List of potential reviewers.

**Review article** must address subjects related to health and diseases of animals including its various aspects like pathology, microbiology, pharmacology, parasitology and its treatment. These articles must digest at least 60 articles published on the subject matter. References of books be avoided as book is already a review. An abstract not exceeding 250 words be provided. These articles must contain an introduction, text with appropriate headings and a conclusion section. Introduction should elucidate the importance of the subject; the text should be comprehensive and meticulous. Review article must not exceed 6500 words including references and be supported with the original published studies.

**Original full length article** must not exceed 4500 words including up to 30 references and 8 figures/tables. Abstract must not exceed 250 words, should include a brief account of the objectives of the study, methodology, salient findings and main conclusion. Abstract be followed by 4-6 key words (indexing terms). The main manuscript may be divided into sections like: Introduction, Materials and Methods (not exceeding 600 words), Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgment (if any), Author's contribution and References. **Writing Results and Discussion under one heading in Original full length article is discouraged.**

**Short communication** must not exceed about 2000 words including up to 10 references. It must contain an Abstract of about 150 words comprised of a brief account of the objectives of the study, methodology, salient findings and conclusion. Other headings could be "Introduction" "Materials and Methods" and "Results and Discussion". Tables and Figures must not exceed three in total.

**Case report** should contain an Abstract of about 150 words and not exceed about 2000 words including up to 10 references. It may include the following sections: Introduction (explaining why the case is being reported, with references where necessary to previous reports), History, Clinical Examination and Postmortem Findings of the case if applicable, Diagnosis and Differential Diagnosis, Treatment adopted, Discussion and References. Tables and Figures must not exceed three in total.

**References:** In each article whatever the category is, author(s) must ensure to cite at least 30% references of manuscripts published during the last five years (2017-2021). References of 1980's and beyond are not allowed in the manuscript except in materials and methods section. Only papers closely related to the author's work should be included. References should be cited in the text as: Haefner (2013) or (Haefner, 2013), Kousar and Javed (2015) or (Kousar and Javed, 2015), Chen *et al.* (2016) or (Chen *et al.*, 2015), Tan *et al.* (2016) or (Tan *et al.*, 2016). If the enlisted authors are three, then write surname and initials of all authors, however in text write Wilkes *et al.* (2016). If the enlisted authors are more than three, then write surname and initials of first three authors, other authors will be replaced by *et al.*, e.g., Chen *et al.* (2016). The list of references at the end of manuscript must be arranged alphabetically and each reference in the list should appear in the following form:

Chen L, Jiang T, Li X, *et al.*, 2016. Immunomodulatory activity of  $\beta$ -glucan and mannan-oligosaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* on broiler chickens challenged with feed-borne *Aspergillus fumigatus*. Pak Vet J 36:297-301.

Haefner S, 2013. The Hitchhiker's guide to the blood system. Microbes Infect 15:645-8.

Kousar S and Javed M, 2015. Diagnosis of metals induced DNA damage in fish using comet assay. Pak Vet J 35:168-72.

Tan W, Li M and Xie ZX, 2016. An overview of avian influenza A H10N8 subtype viruses. Pak Vet J 36:251-7.

Authors are expected to avoid citing references to books, monographs, proceedings or thesis due to limited availability everywhere. If necessary to cite, these should include: 1) author(s) or editor(s); 2) year of publication, 3) title, 4) edition, 5) Publisher and place of publication and 6) beginning and final page numbers of the relevant chapter, as shown below:

Ray DE, 2001. pyrethroid insecticides: mechanisms of toxicity, systemic poisoning syndromes, paresthesia and therapy. In: Handbook of Pesticide Toxicology: Vol 2: Agents (Krieger R, J Doull and D Ecobichon, eds): Academic Press, San Diego, USA, pp:1289-1303.

Stevens JB, Anderson F, Olson WG, *et al.*, 1980. Metabolic profile testing. In: Bovine Medicine and Surgery (Amstutz HE, ed). 2nd Ed, American Veterinary Publications, California, USA, pp:597-612.

Reference to proceedings of Symposia/Congresses must include: (1) author(s), (2) title of the article, (3) Symposium/Congress title, (4) city and country where held, (5) day, month and year of the event and (6) page numbers of the article, as shown below:

Hafez MF, 2015. Enteric disorder in poultry: never-ending story. Proc "International Seminar on Poultry Diseases", Faisalabad, Pakistan, 14-15 Dec, 2015, pp:53-61.

Saleemi MK, Altaf Q, Khan MZ, *et al.*, 2014. Immunopathological effects of Ochratoxin A in broiler chicks and its amelioration with baker's yeast. Proc "2<sup>nd</sup> World Veterinary Poultry Association Asian Poultry Health Meeting", Bangkok, Thailand; 11-12 Sep 2014, pp:85-95.

Soomro AH, Raunaq S, Sheikh SA and Khaskheli M, 2015. Assessment of microbial quality of farm buffalo milk. Proc "8<sup>th</sup> Asian Buffalo Congress", Istanbul, Turkey; 21-25 April, 2015, pp:46.

**Figures:** Soft copy of all figures (at least 300 dpi)/graphs prepared in Excel program be provided so that quality or size be adjusted. Figures provided as electronic files should be saved in JPEG format. Figures will be adjusted in column while composing, therefore, figure's width must not exceed 3" and height must be appropriate. The size of lettering and numerals should be of appropriate to that of the figure. The legends for photomicrographs must state the staining method and magnification. Captions should be typed separately from the figures/graphs and Arabic numbered. Figures must not be embedded in the manuscript text but arranged at the end of the text. The journal will publish figures in colors online and in hard copy will print black/white. Color printing of figures in hard copy can be accomplished on payment basis that can be inquired from the Editor.

**Tables:** These should be as few as possible and should contain only essential data. Each table must be typewritten on separate sheet and Arabic numbered according to its sequence in the text and arranged at the end of text. The text should include references to all tables. Each table should have a brief and self-explanatory title. Duplication of the data in the text and tables or tables and graphs/figures is not allowed.



**Symbols and Abbreviations:** The policy of the journal with respect to units and symbols is that Systems Internationals Symbols be used. Each scientific abbreviation must be given in full at its first occurrence in the manuscript, however, following abbreviations may be used without any definition:

ALP	alkaline phosphatase	M	molar
ALT	alanine aminotransferase	MCH	mean corpuscular hemoglobin
AMY	$\alpha$ -amylase	MCHC	corpuscular hemoglobin concentration
ANOVA	analysis of variance	MCV	mean corpuscular volume
AST	aspartate aminotransferase	ME	metabolizable energy
B cell	bursal-derived, bursal-equivalent derived cell	min	minute
bp	base pairs	mRNA	messenger ribonucleic acid
BSA	bovine serum albumin	MRT	Milk ring test
BW	body weight	N	normal
cDNA	complementary DNA	n	number of observations
CF	crude fiber	NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
CFT	complement fixations test	NADH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
cfu	colony-forming units	NS	not significant
CI	confidence interval	P value	P<0.001; P<0.05; P>0.05
CK	creatinase kinase	PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
CMT	California mastitis test	PBS	phosphate-buffered saline
CP	crude protein	PCR	polymerase chain reaction
CV	coefficient of variation	PCV	packed cell volume
df	degrees of freedom	r	correlation coefficient
dL	deci liter	R2	coefficient of determination, multiple
DM	dry matter	r2	coefficient of determination, simple
DNA	deoxyribonucleic acid	RBC	red blood cells
EDTA	ethylene diamine tetraacetate	RFLP	restriction fragment length polymorphism
ELISA	enzyme-linked immunosorbent antibody assay	RH	relative humidity
g	gram	RIA	radioimmunoassay
g	gravity	RNA	ribonucleic acid
GLM	general linear model	rpm	revolutions per minute
h	hour	s.c.	subcutaneous
Hb	hemoglobin	SCC	somatic cell count
Hct	hematocrit	SD	standard deviation
HPLC	high-performance liquid chromatography	SDS	sodium dodecyl sulfate
i.m.	intramuscular	SE	standard error
i.p.	intra-peritoneal	SEM	standard error of the mean
i.v.	intravenous	SRBC	sheep red blood cells
IFAT	indirect fluorescent antibody technique	T cell	thymic-derived cell
Ig	immunoglobulin	T3	triiodothyronine
IU	international units	T4	thyroxine
IVC	<i>in vitro</i> culture	TBA	thiobarbituric acid
IVF	<i>in vitro</i> fertilization	TCA	Tris-citric acid buffer
kb	kilobase pairs	Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
kDa	kilodalton	UV	ultraviolet
L	liter	vs	versus
LDH	lactate dehydrogenase	WBC	white blood cells
LSD	least significant difference	wk	week
$\mu$	micron	wt/vol	weight to volume
m	meter	wt/wt	weight to weight

#### Manuscript Handling/Processing Fee & Printing

##### Cost

**Inland:** Authors of accepted manuscript will have to pay manuscript handling/processing/printing charges Rs. 25,000 on acceptance of their manuscript from August 01, 2022. This amount can be paid as cash or through bank draft in favor of "Pakistan Veterinary Journal." Payment through cheque is not accepted.

**Foreign:** Author(s) of manuscripts originating from outside Pakistan have to pay manuscript handling/processing/publication charges @US\$400 on acceptance of their article from August 01, 2022. **Foreign authors are requested not to send handling/processing/publication charges before acceptance otherwise PVJ management will not be responsible to reimburse the processing fee in case of manuscript rejection.**

**Proofs:** Upon satisfactory revision and acceptance, the manuscripts are typeset. Proofs will be sent to authors for correction via E-mail, which should be returned within 72 hours. Only minor corrections/ changes at this stage are possible.

**Reprints:** A web link will be provided to access the published paper. Reprints will not be provided, if it is deemed necessary to have reprints, authors have to place order well in time on extra payment.

Modified: July 31, 2022