



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

**RAFAELLE CASSEB GUIMARÃES**

**ASSOCIAÇÃO DE UM INDEL DA REGIÃO REGULADORA DO GENE DO  
RECEPTOR DA MELATONINA (MTRN1A) COM DESEMPENHOS LEITEIROS DE  
BÚFALAS MESTIÇAS NA REGIÃO AMAZÔNICA**

MACAPÁ  
2024

RAFAELLE CASSEB GUIMARÃES

**ASSOCIAÇÃO DE UM INDEL DA REGIÃO REGULADORA DO GENE DO  
RECEPTOR DA MELATONINA (MTRN1A) COM DESEMPENHOS LEITEIROS DE  
BÚFALAS MESTIÇAS NA REGIÃO AMAZÔNICA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia (PPGSPAA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção Animal na Amazônia.

Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho.  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elizabeth Machado  
Barbosa.

MACAPÁ  
2024

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

---

- G963a      Guimarães, Rafaelle Casseb  
             ASSOCIAÇÃO DE UM INDEL DA REGIÃO REGULADORA DO GENE DO RECEPTOR DA  
             MELATONINA (MTRN1A) COM DESEMPENHOS LEITEIROS DE BÚFALAS MESTIÇAS NA  
             REGIÃO AMAZÔNICA / Rafaelle Casseb Guimarães. - 2025.  
             41 f.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Saúde e Produção Animal na  
             AMAZÔNIA (PPGSPAA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia,  
             Belém, 2025.  
             Orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho  
             Coorientador: Profa. Dra. Elizabeth Machado Barbosa .
- 

1. Bubalinocultura . 2. Deleção. 3. Melhoramento. I. Silva Filho, Ednaldo da , *orient.* II. Título

338.17621109811

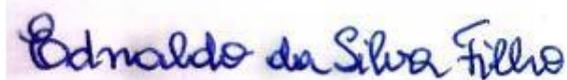
CDD

**RAFAELLE CASSEB GUIMARÃES**

**ASSOCIAÇÃO DE UM INDEL DA REGIÃO REGULADORA DO GENE DO  
RECEPTOR DA MELATONINA (MTRN1A) COM DESEMPENHOS LEITEIROS DE  
BÚFALAS MESTIÇAS NA REGIÃO AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Saúde e Produção Animal na Amazônia.

**BANCA EXAMINADORA:**



---

**Prof. Dr. Edinaldo da Silva Filho - Orientador**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA**



---

**Dr. Caio Santos Silva – 1º Examinador**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA**



---

**Dra. Taianara Tocantins Gomes Almeida – 2º Examinadora**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA**



---

**Dr. Fred Júlio Costa Monteiro – 3º Examinador**  
**SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAPÁ - SVS**

Documento assinado digitalmente  
 **PRISCILA DI PAULA BESSA SANTANA**  
Data: 14/01/2025 10:14:38-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

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

Dedico este trabalho primeiramente a Deus. Aos meus pais, Eronilson Guimarães e Denise Casseb pelo amor incondicional. Ao meu marido, Higo Favacho, pela paciência, parceria e amor sempre. As minhas filhas, Maria Cecília e Maria Olívia, meus presentes de Deus. As minhas irmãs, Emanuelle, Danielle e meus sobrinhos, Benício e Tomás. Ao meu orientador Profº. Ednaldo Filho e a minha coorientadora Profª. Dra. Elizabeth Machado, pelo exemplo de profissionais, dedicação à pesquisa, e inspiração nas horas difíceis. Aos meus amigos, pelas felicidades e tristezas compartilhadas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela dádiva da vida, saúde, fé e por todas as graças atendidas.

Aos meus pais, Eronilson Guimarães e Denise Casseb, por todo amor, dedicação e esforço. Um agradecimento especial à minha mãe, Denise Casseb, por cuidar das minhas filhas, permitindo que eu pudesse realizar minhas análises no laboratório.

Ao meu marido, Higo Favacho, pelo apoio incondicional, ajuda, amor, amizade, compreensão e companheirismo. Sua contribuição foi essencial para o meu crescimento profissional.

Às minhas filhas, Cecília e Olívia, que são a melhor parte de mim e a minha maior inspiração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ednaldo Filho, por mais esta oportunidade, pelos ensinamentos, compreensão e enorme paciência. Agradeço por ser um orientador excepcional, além de um excelente profissional, pai e amigo. Sua participação foi essencial para que eu pudesse alcançar este tão esperado título.

À minha coorientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Elizabeth Barbosa (Beth), pela dedicação, orientação, ensinamentos, amizade, conselhos, broncas e incentivos. Obrigada por toda a ajuda, tanto profissional quanto pessoal, e por não permitir que eu desistisse. Sou grata por acreditar no meu potencial, mesmo quando eu mesma não acreditava.

Às minhas amigas, Luana Santos e Juliana Vasconcelos, que estiveram ao meu lado durante todo o trabalho no laboratório. Obrigada pelo carinho, amizade, parceria e companheirismo de sempre.

Ao Dr. Caio Silva, pela ajuda, incentivo, disponibilidade, amizade e por sempre fornecer todos os reagentes necessários. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular da Universidade Federal Rural da Amazônia – Roberta, Ellen, Larissa, Diane e Dionísia – agradeço pela ajuda, amizade e paciência ao longo desta jornada.

Ao Prof. Casseb, pela disponibilidade e contribuição na elaboração e conclusão deste projeto.

À Fazenda Conquista, por disponibilizar os animais para as coletas, contribuindo significativamente para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

A bubalinocultura é uma importante atividade agropecuária, especialmente nos países em desenvolvimento e nas condições amazônicas, estes animais possuem um bom desempenho produtivo e reprodutivo. Os programas de melhoramento genético de animais visam a multiplicação de indivíduos com características, sendo fundamental a identificação de marcadores moleculares de importância econômica, os quais permitem que o potencial genético de um animal seja determinado antes mesmo da expressão do seu fenótipo. Nesse sentido, o presente estudo tem o objetivo de associar um bloco de inserção/deleção (INDEL) na região promotora do gene receptor da melatonina 1A (MTRN1A) com dados zootécnicos de produção de leite em um rebanho de búfalas mestiças da região amazônica. Para isso foram coletadas amostras de sangue de 70 búfalas mestiças provenientes de uma propriedade localizada no município de Bujaru, estado do Pará. O DNA genômico foi extraído utilizando o método fenólico. Em seguida selecionaram-se os diferentes iniciadores para realizar as reações em cadeia da polimerase (PCR), sendo seus produtos constituídos de 162 pb. Posteriormente, esses fragmentos foram sequenciados, editados e comparados com sequências de referência de búfalos no NCBI *GenBank*. Os resultados obtidos do sequenciamento foram tabulados, analisados, determinando-se as frequências alélicas, genotípicas, heterozigosidade observada e esperada, coeficientes de endocruzamento ( $F_{IS}$ ), e a probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg. As comparações foram realizadas pela análise de ANOVA com efeito fixo do genótipo e a comparação de média pelo teste de Tukey, através do programa SAS OnDemand com nível de significância de 0,05 %. Um total de 70 animais foram genotipados e observou-se, na posição -1482 da região reguladora do MTRN1A, os genótipos In/In, In/Del e Del/Del. O alelo mais frequente foi o In (0,64) e o genótipo mais frequente foi o In/Del (0,529). Os desvios entre os genótipos observados e os esperados não foram significativos ( $P > 0,05$ ), dessa maneira a população apresentou Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Comparando os dados zootécnicos da produção média diária das búfalas avaliadas no presente estudo, não se observou diferença significativa na associação com os diferentes genótipos ( $P > 0,05$ ). Desse modo, os genótipos avaliados não tiveram efeito na produção de leite em búfalas criadas na região Amazônica. Entretanto, os polimorfismos de Inserção/Deleção podem ser usados em estudos de variabilidade genética, assim como outros estudos para características reprodutivas nesses animais.

**Palavras-chave:** Bubalinocultura; Deleção; Melhoramento.

## ABSTRACT

Buffalo farming is an important agricultural activity, especially in developing countries and under Amazonian conditions. These animals have good productive and reproductive performance. Animal breeding programs aim to multiply individuals with characteristics, and it is essential to identify economically important molecular markers, which allow the genetic potential of an animal to be determined even before the expression of its phenotype. In this sense, the present study aims to associate an insertion/deletion block (INDEL) in the promoter region of the melatonin receptor 1A gene (MTRN1A) with zootechnical data on milk production in a herd of crossbred buffaloes from the Amazon region. For this purpose, blood samples were collected from 70 crossbred buffaloes from a property located in the municipality of Bujaru, state of Pará. Genomic DNA was extracted using the phenolic method. Then, different primers were selected to perform the polymerase chain reactions (PCR), and their products consisted of 162 bp. Subsequently, these fragments were sequenced, edited and compared with buffalo reference sequences in the NCBI *GenBank*. The results obtained from the sequencing were tabulated and detailed, determining the allele and genotypic frequencies, observed and expected heterozygosity, inbreeding coefficients (FIS), and the probability of Hardy-Weinberg equilibrium. Comparisons were performed by ANOVA analysis with fixed effect of the genotype and the comparison of means by Tukey test, through the SAS OnDemand program with a significance level of 0.05%. A total of 70 animals were genotyped, and at position -1482 of the MTRN1A regulatory region, the genotypes In/In, In/Del, and Del/Del were observed. The most frequent allele was In (0.64), and the most frequent genotype was In/Del (0.529). The deviations between observed and expected genotypes were not significant ( $P > 0.05$ ), indicating that the population was in Hardy-Weinberg equilibrium. Comparing the zootechnical data of the average daily production of the buffaloes evaluated in the present study, no significant difference was observed in the association with the different genotypes ( $P > 0.05$ ). Thus, the genotypes evaluated had no effect on milk production in buffaloes raised in the Amazon region. However, Insertion/Deletion polymorphisms can be used in studies of genetic variability, as well as other studies for reproductive characteristics of these animals.

Keywords: Buffalo farming; Deletion; Breeding.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
2.1	Objetivo Geral.....	12
2.2	Objetivos Específicos.....	12
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
3.1	Bubalino no mundo.....	13
3.2	Bubalinocultura na Amazônia Brasileira .....	14
3.3	Bubalinocultura leiteira.....	16
3.4	Marcadores moleculares.....	17
3.5	Gene do receptor da melatonina 1A (MTRN1A).....	19
	REFERÊNCIAS.....	21
<b>4</b>	<b>DESEMPENHO DE BÚFALAS LEITEIRAS ASSOCIADO A UM INDEL NA REGIÃO REGULADORA DO GENE RECEPTOR DA MELATONINA .....</b>	<b>27</b>
4.1	Introdução .....	27
4.2	Material e Métodos .....	28
4.3	Resultados .....	30
4.4	Discussão .....	31
4.5	Conclusão.....	33
	Referências.....	33

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Os búfalos desempenham um papel importante na economia pecuária em muitos países do mundo, especialmente nos países em desenvolvimento (Al-Zahery *et al.*, 2011). A maior parte da população bubalina encontra-se na Ásia, sendo adaptados a climas quentes, com boa tolerância a doenças, além de conseguirem aproveitar forragem de baixa qualidade, sendo utilizados para trabalho, produção de leite e carne (Maylem *et al.*, 2023; Minervino *et al.*, 2020).

A contribuição da búfala na produção leiteira no mundo é estimada em 15% (FAO, 2021). A composição do leite de búfala se destaca por sua composição única em relação a outros animais, pois seu teor de gordura confere características especiais na produção de tipos específicos de derivados (Catozzi *et al.*, 2019).

No Brasil, mais precisamente na Região Amazônica, estes animais possuem um bom desempenho produtivo e reprodutivo, mesmo quando criados em condições extensivas de várzea ou solos de inferior qualidade (Ribeiro, 2010), as criações de búfalos são caracterizadas pela falta de controle sanitário e nutricional, desconhecendo-se seus reais desempenhos quanto ao ganho de peso, produção e qualidade do leite e características reprodutivas (Tonhati, 1997).

As variações nas características reprodutivas e produtivas são resultantes de fatores genéticos e ambientais. Em geral as causas genéticas têm, individualmente, menor influência em comparação aos fatores ambientais, incluindo-se o clima, manejo, nutrição e doenças (Torres Júnior, 2018)

Os programas de melhoramento genético de animais de produção, entre eles os bubalinos, estão obtendo excelentes resultados em várias características desejáveis que possibilitem melhores performances de produção e reprodução (Garcia *et al.*, 2006).

Na pecuária, a utilização de marcadores moleculares possibilita à seleção de progenitores com o método que recebe o nome de Seleção Assistida por Marcadores (MAS, “Marker Assited Selection”), além da caracterização populacional, da identificação de regiões gênicas com variantes deletérias ou associadas a enfermidades e teste de paternidade e rastreamento de produtos de origem animal (Cardoso, 2012).

Uma estratégia bastante utilizada para identificar marcadores moleculares relevantes para fenótipos de importância econômica e que possam ser utilizados na MAS, baseia-se em estudos de associação entre os fenótipos e polimorfismos em genes candidatos (Cardoso, 2012). Dessa forma, dentre os diversos genes estudados com referência à produção de leite em animais domésticos, o gene do receptor de melatonina 1A (MTRN1A) que está localizado no cromossomo 1 do búfalo, codifica o receptor que afeta a estimulação da melatonina em períodos

de escuridão e desempenha um grande papel na regulação de muitas características produtivas e reprodutivas como a regulação do crescimento dos folículos ovarianos, taxa de prenhez e porcentagem de proteína do leite (Miziara *et al.*, 2007; Majidinia *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2010; Ramadan *et al.*, 2014; Zetouni *et al.* 2014).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Associar um bloco de deleção/inserção (INDEL) na região promotora do gene receptor da melatonina 1A (MTRN1A) com dados zootécnicos de produção de leite em um rebanho de búfalas mestiças da região amazônica.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Genotipar o Indel no rebanho leiteiro de búfalas;
- ✓ Associar o genótipo com desempenho das lactações.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Bubalino no mundo

No mundo, existem dois tipos de búfalo d'água (*Bubalus bubalis*), os búfalos de rio (*Bubalus bubalis bubalis*) e os búfalos de pântano (*Bubalus bubalis* vr. *Kerebeu*) cada um considerado uma subespécie com distribuição geográfica e características biológicas distintas, diferindo em tamanho corporal, capacidade de tração e produção de leite e carne (Minervino *et al.*, 2020).

Os búfalos do pântano possuem 48 cromossomos e os búfalos do rio apresentam 50 cromossomos, com o cromossomo 1 no búfalo do pântano sendo homólogo aos cromossomos 9 e 4 no búfalo do rio (Degrandi *et al.*, 2014).

Acredita-se que o búfalo aquático tenha sua origem na descendência de um búfalo aquático selvagem, o *Bubalus arnee*, nativo do sudeste da Ásia continental. Posteriormente, essa espécie expandiu-se para o subcontinente indiano, originando o búfalo de rio. Já o búfalo do pântano realizou dois eventos migratórios: um em direção ao sul, alcançando a Indonésia, e outro para o norte, chegando à China e Filipinas (Sun *et al.*, 2020).

Após a domesticação, ambos os tipos de búfalos aquáticos passaram por processos distintos, incluindo importação, isolamento e cruzamento. Esses eventos resultaram na formação de diversas raças de búfalos aquáticos e na introdução de material genético do búfalo de rio em algumas populações de búfalos do pântano (Colli *et al.*, 2018)

Embora os dois tipos de búfalos aquáticos habitem ambientes naturais distintos, o cruzamento natural entre eles pode ocorrer, resultando em híbridos férteis com 49 cromossomos (Cruz, 2013).

Sun *et al.* 2020, evidenciaram a presença de introgressão genética do búfalo de rio em algumas populações de búfalos de pântano, fenômeno relacionado, em parte, ao cruzamento intencional entre os dois tipos para aprimorar a produção de leite.

Considerando a história evolutiva recentemente, búfalos de rio foram importados para o Sudeste Asiático e países da América do Sul com o objetivo de melhorar a qualidade do leite e da carne (Herrera *et al.*, 2021)

Apesar das diferenças e adaptações, ambos os tipos são mais corretamente classificados como subespécies (Pineda *et al.*, 2024)

O búfalo de água desempenha um papel crucial no sustento das economias rurais ao redor do mundo, fornecendo leite e carne. A população global de búfalos é de aproximadamente

230 milhões de cabeças, concentrada principalmente no continente asiático, dessa forma, mais pessoas ao redor do mundo dependem do búfalo para sua subsistência do que de qualquer outro animal domesticado (FAO, 2022; Maylem *et al.*, 2023)

Nesse sentido, bubalinocultura é uma atividade economicamente importante, principalmente em regiões tropicais e subtropicais devido suas baixas exigências de manutenção, capacidade de aproveitar forragens de baixa qualidade, adaptação ao clima quente e úmido e maior tolerância a endo e ectoparasitoses (Warriach, 2015).

### **3.2 Bubalinocultura na Amazônia Brasileira**

Os primeiros relatos da introdução de bubalinos no Brasil se dá por volta de 1890, na ocasião do naufrágio de um navio destinado à Guiana Francesa, onde alguns animais conseguiram nadar até a ilha do Marajó, se adaptando às condições locais (Vasconcelos, 2012).

Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos - ABCB, (2019), a mais remota entrada que se tem confirmado, é o de uma importação por volta de 1902 feita por Bertino Lobato de Miranda, para sua fazenda situada às margens do rio Ararí, na Marajó. Eram Búfalos pretos (búfalo de rio), de procedência italiana. Já em 1906, Vicente Chermont de Miranda, realizou a importação de búfalos na costa norte da ilha, de búfalos “Rosilho”, posteriormente identificados da raça Carabao (búfalo de pântano), sendo esses os primeiros relatos oficiais de entrada de animais na ilha de Marajó.

Segundo estimativas recentes, o rebanho bubalino mundial é de aproximadamente 205 milhões de cabeças, com maior concentração na Índia, Paquistão e China (FAO, 2022). No Brasil, a espécie bubalina é de quase 1,6 milhões de cabeças, sendo o maior rebanho fora do continente asiático, onde a maior parte se concentra na região norte, com destaque para o Estado do Pará com 684 mil cabeças e o Estado do Amapá com 326 mil cabeças (IBGE, 2023).

Na Amazônia, a principal finalidade da criação de búfalos é a produção de carne, e secundária é a utilização do leite para a fabricação de queijo, que normalmente ocorre nas épocas mais favoráveis do ano, coincidindo com o período da lactação (Lourenço Junior; Garcia, 2006; ABCB, 2023).

Nas últimas décadas, a Região Amazônica tem registrado um crescimento significativo no rebanho de búfalos, acompanhado de avanços na produtividade, onde o rendimento médio de carcaça pós abate é de 52,1%, e a produção anual média de leite de 1.800 litros em 300 dias de lactação, demonstrando o potencial produtivo da espécie (Teixeira, 2005; Marques, 2019).

Atualmente, a Amazônia Legal é a principal produtora de búfalos na América do Sul e uma das mais importantes fora da Ásia. Esse desenvolvimento tem impulsionado a renda dos pecuaristas e gerado empregos em diversos setores da cadeia produtiva (Santos, 2019).

Na Amazônia, os búfalos aquáticos encontram um habitat ideal, onde predominam três subespécies: *Bubalis*, *Kerebau* e *Fulvus*. Esses animais são distribuídos entre as raças: a) Mediterrânea: selecionada na Itália, aptidão para carne e leite; b) Murrah: originária do noroeste da Índia, é considerada a melhor produtora de leite entre as raças de búfalos; c) Jafarabadi: originária da Índia, aptidão para produção de carne e leite, d) Carabao: originário da Indochina, no sudoeste da Ásia. É a raça mais adaptada a regiões pantanosas e bom desenvolvimento de massa muscular, utilizada para a produção de carne (ABCB, 2023).

A produção de búfalos ocorre em quatro tipos de ecossistemas de pastagem: (1) pastagens nativas alagadas na Ilha de Marajó, (2) pastagens alagadas no Baixo e Médio Amazonas, (3) pastagens nativas em áreas de terra firme e (4) pastagens cultivadas em áreas de terra firme, muitas vezes em sistemas integrados que combinam pastagens, árvores e animais. Também há criação em sistemas que mesclam pastagens nativas e cultivadas (Silva *et al.*, 2021).

Os búfalos amazônicos foram selecionados para aumentar sua produtividade, longevidade e boa docilidade. Demonstam elevada eficiência reprodutiva e produtiva, aproveitando de forma eficiente o território disponível e convertendo forragem de baixa qualidade em produtos de alto valor agregado (Marques *et al.*, 2019),

O estado do Pará detém um pouco mais de 40% do rebanho bubalino nacional (IBGE, 2023), sendo um importante impulsionador da produção e do mercado de leite e carne de búfalo na Amazônia brasileira (Silva *et al.*, 2021).

Embora possua o maior rebanho bubalino do Brasil, o Pará, contribui com apenas 14,06% da produção nacional de leite. Apesar de suas excelentes características para a produção de queijos, o leite bubalino tem uma produção limitada, já que o rebanho é predominantemente direcionado para a produção de carne (Oliveira *et al.*, 2020)

Outra característica notável é que 67,91% das propriedades bubalinas têm menos de 200 hectares e concentram 36,72% do rebanho, caracterizando pequenos produtores que utilizam pastagens nativas em sistemas extensivos. Com o tempo, esses sistemas tradicionais foram substituídos por pastagens perenes em terras firme, graças à adoção de tecnologias. Esse modelo intensivo aumenta a produtividade por hectare e melhora as propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo (Oliveira *et al.*, 2020; Lourenço Junior *et al.*, 2002).

Dessa forma um estudo avaliando a produção de leite entre 2006 e 2017 revelou um aumento no número de búfalas ordenhadas tanto no estado do Pará quanto no Brasil. Nesse período, o Pará registrou um crescimento de 4,90%, enquanto o Brasil apresentou uma taxa ainda mais expressiva, de 8,73% (IBGE, 2018).

### 3.3 Bubalinocultura leiteira

Desde a introdução dos búfalos no Brasil, em meados do século XIX, a principal finalidade desses animais era a produção de carne. No entanto, a partir da década de 1980, houve um crescente interesse na exploração leiteira, especialmente na região sudoeste do país. Inicialmente, a seleção dos animais mais produtivos era feita de forma empírica, mas, com o tempo, foram implementadas ferramentas para auxiliar os produtores, como programas de controle leiteiro, avaliação genética e monitoramento de índices produtivos, visando aumentar a rentabilidade da atividade (Cardoso, 2012).

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (2022), o Brasil ocupa a terceira colocação no ranking mundial na produção de leite, sendo que esta atividade ocorre predominante em pequenas e médias propriedades. De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, a bubalinocultura leiteira contribui com 15% da produção mundial de leite, e este mesmo índice pode ser aplicado para contribuição de leite no Brasil.

O leite bubalino possui características organolépticas e físico-químicas próprias e diferentes do leite de vaca. É ligeiramente mais adocicado e coloração mais branca (devido à ausência de caroteno em sua gordura), além de possuir teor de proteína de 4%; lipídios 8%; lactose 4,9%; água 82%. O que lhe proporciona um rendimento industrial na fabricação de produtos lácteos, 40% maior que o leite dos bovinos (Pacheco *et al.*, 2022).

Deste modo, para se produzir 1kg de manteiga, por exemplo, utiliza-se 14 litros de leite de búfala, enquanto, que para produzir a mesma quantidade de manteiga, são necessários 20 litros de leite de vaca (FAO, 2019; Pinto *et al.*, 2011).

O leite de búfala tem despertado crescente interesse por sua qualidade, destacando-se pelo alto teor de proteína e gordura, que proporciona maior rendimento na produção de laticínios. Sua composição o torna ideal para a fabricação de derivados como creme, queijo, iogurte de leite cru e iogurtes com adição de frutas, ampliando suas aplicações na indústria (Monteiro, 2015).

Estudos realizados no Brasil indicam que o leite de búfala apresenta, em média, teores de gordura entre 5,79% e 8,16%, proteínas entre 3,6% e 4,79% e lactose de 4,76% a 5,52%. Esses valores resultam em um teor total de sólidos variando de 15,37% a 17,42% (Bernades, 2014).

No Brasil, as búfalas produzem geralmente entre 1500 e 4500 L de leite por lactação, sendo a média nacional de 1482 a 1650 kg de leite (Ramos *et al.*, 2006).

Em um estudo com animais da raça Murrah em rebanhos localizados nos estados de São Paulo e Rio Grande do Norte, Barros *et al.* (2016) descreveram uma produção de leite de 1.872 kg durante a lactação.

Marques *et al.* (2020), trabalhando com búfalos das raças Murrah, Mediterrânea e mestiços, em pastagens cultivadas de capins dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum*, na Amazônia Oriental, observaram em média 1.806 kg de leite em 262 dias de lactação, com um teor de gordura de 6,96%.

Rodrigues *et al.* (2010), avaliando 1.182 registros de produção de fêmeas bubalinas murrah e seus mestiços, no Pará, observaram médias para produção de leite de 1.664 kg e demonstraram com seus resultados que ganhos genéticos podem ser obtidos pela seleção das produções de leite e gordura.

A diferença de produção entre grupos de bubalinos, se deve a influências ambientais ou qualidade genética do rebanho. Dessa forma, a seleção de animais superiores possibilita acompanhar a mudança na média da característica na população, ocasionando maior eficiência econômica, além de embasar decisões futuras dentro do empreendimento rural (Malhado *et al.*, 2007).

A síntese do leite é regulada por diversos genes que podem ser considerados candidatos para variações genéticas em características economicamente importantes em estratégias de seleção de animais superiores. Identificar polimorfismos nesses genes, como aqueles associados a características quantitativas é essencial para a seleção assistida por marcadores (Naserkheil *et al.*, 2019).

### **3.4 Marcadores moleculares**

A superioridade de um animal se manifesta, fenotipicamente, quando genes que expressam características de interesse econômico estão presentes no genótipo desses indivíduos (Rosa; Meneses; Egito, 2013).

Com o avanço do desenvolvimento tecnológico, a seleção genética entrou em uma nova fase na qual a avaliação fenotípica passou a contar com o auxílio da avaliação genômica dos animais, que ocorre por meio da identificação de genes através de marcadores moleculares, sendo que estes podem ser conceituados como marcações de um ponto específico do genoma, usados para marcar alelos que sejam de interesse econômico na atividade pecuária (Ramalho, 2012).

Nos programas de seleção e melhoramento genético animal, uma vantagem dos marcadores moleculares é apresentar o potencial complementar à seleção clássica, que pode ocorrer desde momentos imediatamente após o nascimento, ou até mesmo durante a fase embrionária, correlacionando a precocidade de avaliação dos animais para características específicas desejáveis (Garcia; Porto-Neto, 2006).

Além da objetividade proporcionada pela análise de DNA, outro benefício significativo é a possibilidade de selecionar características tradicionalmente difíceis de avaliar, como precocidade sexual e terminação de carcaça, devido a desafios técnicos de mensuração; características de alto custo de análise, como maciez e marmoreio da carne ou resistência a ectoparasitas; e características avaliadas tardiamente, como longevidade e produção de leite (Garcia, 2006)

Diversas técnicas de biologia molecular permitem detectar a variabilidade genética em nível de sequência de DNA, identificando polimorfismos genéticos. Essas ferramentas possibilitam a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares distribuídos por todo o genoma dos animais (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Polimorfismos são variações fenotípicas associadas a alelos de um gene ou a homólogos cromossômicos presentes em uma população ou entre populações. A identificação dessas variações tem diversas aplicações, como validação de genealogias, estudos voltados para a conservação de material genético e associação com características reprodutivas e produtivas entre outras áreas (Zetouni *et al.*, 2014).

Entre os exemplos estão os marcadores de polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) e de Inserção/Deleção (InDel), amplamente utilizados em programas de melhoramento genético para aumentar a produção de leite (Naserkheil *et al.*, 2019).

O SNP, que ocorre quando uma base do DNA é substituída por outra em uma região específica. Esses polimorfismos são amplamente distribuídos pelo genoma e têm grande relevância em estudos que associam marcadores genéticos a características fenotípicas. (Hou *et al.*, 2010).

Os polimorfismos de inserção/deleção (InDels) são variações no comprimento do DNA, resultantes da adição ou remoção de um ou mais nucleotídeos em uma região específica do genoma (Mills *et al.*, 2006).

Diversos estudos já relacionaram alelos específicos de SNPs e InDels a traços fenotípicos de interesse econômico em animais domésticos, contribuindo assim para o aumento da eficiência na seleção de indivíduos com estruturas genéticas distintas e melhor desempenho (Coizet *et al.*, 2018).

Os mecanismos responsáveis pela síntese do leite são controlados por diversos genes, que podem ser considerados candidatos na identificação de variações genéticas entre animais e relacionadas a características de grande relevância econômica em estratégias de melhoramento genético (Naserkheil *et al.*, 2019).

### **3.5 Gene do receptor da melatonina 1A (MTRN1A)**

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio secretado pela glândula pineal e está associada a diversas funções fisiológicas em várias espécies animais, inclusive o homem, sendo eles: ritmos circadianos, as funções cerebrais, vasculares, metabólicas, imunológicas, endócrinas e reprodutivas, muito embora, alguns de seus efeitos mediados por receptores ainda não são bem compreendidos (Liu *et al.*, 2016; Riaz *et al.*, 2018).

Diversos trabalhos realizados em mamíferos, descrevem a existência de dois tipos de receptores da melatonina acoplados a membrana celular: MTRN1A e MTRN1B, onde os receptores do tipo MTRN1A1 são expressos no cérebro, sistema cardiovascular, sistema imunológico, testículos, ovários, pele, fígado, rins, córtex adrenal, pâncreas, placenta, glândula mamária, retina, pâncreas e baço, além da, ação central nos ritmos circadianos, no sono e na termorregulação (Slominski, 2012).

O gene do receptor de melatonina (MTRN1A) desempenha um papel crucial na regulação de diversas características produtivas e reprodutivas. Por esse motivo, é fundamental investigar o gene associado a esse receptor, bem como, seus polimorfismos genéticos (Majidinia *et al.*, 2018).

O MTNR1A, localizado no cromossomo 1 nos búfalos, possui dois éxons responsáveis por codificar o receptor que regula a resposta à estimulação da melatonina durante os períodos do ano de menor luminosidade. Dessa forma, o MTNR1A está intimamente relacionado às características de produção e reprodução nesses animais, pois os padrões sazonais de

reprodução desses animais são influenciados e regulado pela liberação de melatonina (Al-Sarai & Al-Anabri, 2019).

Dentre os diversos genes estudados com referência à produção de leite em animais domésticos, o MTRN1A tem se mostrado um excelente marcador para estudos genéticos populacionais (Torres Júnior, 2018).

Segundo Suarez-Trujillo e Casey (2016), o polimorfismo no gene do receptor de melatonina desempenha um papel essencial na formação das glândulas mamárias e de seus canais secretores, de maneira que o comprimento e o diâmetro do teto estão relacionados à produção de leite.

Em uma pesquisa realizada utilizando genotipagem em búfalas da raça murreh na região sudeste do Brasil, Zetouni *et al.*, 2014, confirmaram a existência de polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) no éxon 2 (T>C) do gene MTRN1A, sem evidência de correlação direta com características reprodutivas, no entanto, verificaram sua associação com a porcentagem de proteína no leite, sugerindo que os polimorfismos encontrados no MTRN1A podem modular a quantidade de melatonina que afeta a quantidade de prolactina.

De maneira semelhante, Al-Sarai & Al-Anabri, 2019, associando diferentes genótipos (TT, TC e CC) do gene MTRN1A com a produção diária de leite em búfalas no Iraque, observaram que indivíduos heterozigotos apresentaram produção diária de leite superior aos demais genótipos. Assim como, as medidas do úbere representadas pelo comprimento do teto dianteiro esquerdo e comprimento do teto traseiro esquerdo foram influenciadas significativamente pelas diferenças entre o genótipo do gene MTRN1A, e ainda a diferença na medida de perímetro cardíaco, inferindo, segundo Yanar *et al*, 2000, maior produção de leite.

Barbosa *et al.* (2017), investigaram búfalas da raça Murreh na Amazônia quanto à presença de SNPs na região promotora do gene MTRN1A e detectaram 26 SNPs e um bloco de deleção ACAA na posição -1482 fortemente associados à fatores de transição.

Silva *et al*, 2021, caracterizaram geneticamente as populações búfalas murreh, mediterrâneas e mestiças com base em polimorfismos no gene (MTRN1A) e não observaram efeito dos diferentes genótipos na produção de leite, porém ressaltam que os SNPs, bem como, o INDEL encontrado na posição - 1482 podem ser utilizados em estudos de variabilidade genética.

## REFERÊNCIAS

- AL – SARAI, T. Q.; AL-ANABRI, N. N. Polymorphism of MTRN1A gene and its association with some productive traits in Iraqui buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Plant Archives**, vol. 19 n. 2, p. 3546-3550, 2019.
- AL – SARAI, T. Q.; AL-ANABRI, N. N. Relationship of MTRN1A gene polymorphism and some reproductive and measurements of body and udder in Iraqui buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Plant Archives**, vol. 19, n. 2, p. 3839-3843, 2019.
- AL-ZAHERY, N.; PALA, M.; BATTAGLIA, V.; GRUGNI, V.; HAMOD, M. A.; KASHANI, B. H.; SEMINO, O. In search of the genetic footprints of Sumerians: a survey of Y-chromosome and mtDNA variation in the Marsh Arabs of Iraq. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 288. 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS - ABCB. **Quem somos**. [S. l.]: ABCB, 2023. Disponível em: <https://www.bufalo.com.br/home/acbc/>. Acesso em: 09 fev. 2024.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS. **Boletim do Búfalo**. [S. l.]: ABCB, 2023. Disponível em: <https://www.bufalo.com.br/home/acbc>. Acesso em: 08 fev 2024.
- BARBOSA, E. M.; SOUZA, B. B.; GUIMARÃES, R. C.; AZEVEDO, J. S. N.; GONÇALVES, E. C.; RIBEIRO, H. F. L.; ROLIM FILHO, S. T.; SILVA FILHO, E. Polymorphism in the melatonin receptor gene in buffalo populations of the Brazilian Amazon. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n.2, 2016.
- BARROS, C. C.; ASPILCUETA-BORQUIS, R. R.; FRAGA, A. B.; TONHATI, H. Estimativas de parâmetros genéticos para características de produção e reprodução em búfalos leiteiros. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 1, p. 216–221, 1 jan. 2016.
- BERNARDES, O. Desafios na produção de leite de búfalas. Anais I Simpósio Brasileiro de Ruminantes Leiteiros (UDILEITE): Uberlândia, 2014. p. 33-72.
- CARDOSO, D.F. **Análise de polimorfismo em genes do eixo somatotrópico em bovinos nelores selecionados para crescimento**. Orientador: Humberto Tonhati. 2012. 9 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Jaboticabal, 2012.
- CATOZZI, C.; CUSCÓ A.; LECCHI, C.; CARLO, D.; VECCHIO, D.; MARTUCCIELLO, A.; CECILIANI, F. Impact of intramammary inoculation of inactivated *Lactobacillus rhamnosus* and antibiotics on the milk microbiota of water buffalo with subclinical mastitis. **PloS one**, v. 14, n. 1, p. e0210204. 2019.
- COIZET, B.; FRATTINI, S.; NICOLOSO, L.; IANNUZZI, L.; COLETTA, A.; TALENTI, A.; CREPALDI, P. Polymorphism of the STAT5A, MTNR1A and TNF  $\alpha$  genes and their effect on milk production in *Bubalus bubalis*. **Italian Journal of Animal Science**, v, 17, n. 1, p. 31-37, 2028.

- COLLI, L. *et al.* Novos insights sobre a diversidade genômica do búfalo aquático e rotas de migração pós-domesticação a partir de dados de chip SNP de média densidade. **Front Genet.**, v. 9, p. 1–17, 2018. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00053>
- Cruz, L. C. Changing faces of swamp buffaloes in an industrializing Asia. **Buffalo Bull**, v. 32, p. 32–49, 2013
- DEGRANDI, T. M.; MARQUES, J. R. F.; GUNSKI, R. J.; COSTA, M. R. T. da R.; MARQUES, L. C.; FIGUEIRO, M. R.; VINADÉ, L.; GARNERO, A. D. V.. Cytogenetic identification of four generations of crossbred buffaloes maintained in a conservation program in the Marajó island/Brazil. **J Biotechnol Biodivers**, v. 5, p. 162–71, 2014. <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v5n2.degrandi>.
- FAO. **Food and Agricultura Organization of the United Nations**. 2022. Disponível em <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em 10 de fev. 2024.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA D. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 3a edição, 1998.
- GARCIA, A.R. Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*). In: Encontro Internacional de Atualização em Nutrição, Melhoramento e Reprodução Em Bubalinos, 2007, Belém. Revista de Ciências Agrárias, nº 45, 2006. Suplemento.
- GARCIA, J. F.; PORTO-NETO, L. P. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, Supl. 1, p. 197-203, 2006.
- HERRERA, J. R. V.; FLORES, E. B.; DUIJVESTIJN, B.; MOGHADDAR, N.; JULIUS H VAN DER WERF, J. H. Accuracy of genomic prediction for milk production traits in Philippine dairy buffaloes. **Front Genet.**, v. 12, p. 682576, 2021. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.682576>.
- HOU, G.; WANG, D.; GUAN, S.; ZENG, H.; HUANG, X.; MA, Y. Associated analysis of single nucleotide polymorphisms of IGF2 gene's exon 8 with growth traits in Wuzhishan pig. **Molecular Biology Reports**, v.37, n.1, p.497-500, 2010.
- IANNUZZI A.; PARMA P.; IANNUZZI L. The cytogenetics of the water buffalo: a review. **Animals (Basel)**, v. 11, n. 11, p. 1–21, 2021 <https://doi.org/10.3390/ani11113109>.
- IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária. Produção da Pecuária Municipal Available. 2018. Disponível em: [https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com\\_mediaibge/arquivos/9130d7d3e67662a2277b97bde61a52d0.pdf](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/9130d7d3e67662a2277b97bde61a52d0.pdf). Acesso em: 23 de fevereiro de 2024.
- IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária. Rebanho bubalino. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bubalinos>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2024.

SILVA, J. A. R.; GARCIA, A. R.; ALMEIDA, A. M.; BEZERRA, A. S.; LOURENÇO JUNIOR, J. B. Water buffalo production in the Brazilian Amazon Basin: a review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, p. 343, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02744-w>

LIU, J.; CLOUGH, S. J.; HUTCHINSON, A. J.; ADAMAH-BIASSI, E.B.; POPOVSKA-GOREVSKI, M.; DUBOCOVICH, M. L. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. **Anu. Rev. Toxicol.** v. 56, p. 361–383, 2016. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124742.

LOURENÇO JUNIOR, J. B.; GARCIA, A. R. Produção animal no Bioma Amazônico: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 63-83, 2006.

LOURENÇO JUNIOR, J. B.; TEIXEIRA NETO, J. F.; COSTA, N. A.; BAENA, A. R. C.; MOURA-CARVALHO, L. O. D. Alternative systems for feeding buffaloes in Amazon Region. *In: 1st Buffalo Symposium of Americas*, (Embrapa/CPATU: Belém). P. 31-42, 2002

MAJIDINIA, M.; REITER, R. J.; SHAKOURI, S. K.; MOHEBBI, I.; RASTEGHAR, M.; KAVIANI, M.; YOUSEFIK, B. The role of melatonin, a multitasking molecule, in retarding the processes of ageing. **Ageing Research Reviews**, v.47, p.198-213, 2018.

MALHADO, C. H. M.; RAMOS, A. A.; CARNEIRO, P. L. S.; SOUZA, J. C.; PICCININ, A. Parâmetros e tendências da produção de leite em bubalinos da raça Murrah no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 376 – 379, 2007.

MARQUES, J. R. F.; SALES, R. L.; SILVA, A. O. A.; SOUZA, J. S.; MATOS, A. S.; MIRANDA, B. R. M.; MARQUES, L. C. Prova de ganho em peso (PGP) de búfalos na Amazônia. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 7, p. 8551-8555, 2019b. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n7-069>.

MAYLEM, E. R. S.; RAMOS, G.; RIVERA, S. M.; ATABAY, E. C.; ATABAY, E. P. Development of adaptability of foreign breeds of water buffalo in Philippine tropical climate. **Anim Front.**, v. 13, n. 5, p.89–91, 2023. <https://doi.org/10.1093/af/vfad041>.

MILLS, R. E.; LUTTIG, C. T.; LARKINS, C.; BEAUCHAMP, A.; CIRCE TSUI, C.; PITTARD W. S.; DEVINE, S. An initial map of insertion and deletion (InDel) variation in the human genome. **Genome Res.**, v. 16, n. 9, p. 1182-90. 2006.

MINERVINO, A. H. H.; ZAVA, M.; VECCHIO, D.; BORGHESE, A. *Bubalus bubalis*: A Short Story. **Front Vet Sci.**, v. 7, p. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.570413>.

Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). **Apresentação do Projeto de Melhoria da Competitividade do Setor Lácteo Brasileiro**. [S. l.]; MAPA, 2022. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camarasetoriais>. Acesso em: 09 fev. 2024.

MIZIARA, M. N.; GOLDAMMER, T.; STAFUZZA, N. B.; IANELLA, P.; AGARWALA, R.; SCHAEFFER, A. A.; ELLIOTT, J. S.; RIGGS, P. K.; WOMACK, J. E.; AMARAL, M. E. J. A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 1 (BBU1). **Cytogenetic and Genome Research.**, v. 19, p. 100-104. DOI: 10.1159/000109625, 2007.

MONTEIRO, R. C. R.; VELOSO, C. R.; NERES, L. S.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; PACHECO, E. A.; SATO, S. T. A.; SANTOS, M. A. S.; NAHUM, B. S.; RIBEIRO, I. A. Desenvolvimento e avaliação da qualidade de sorvete de iogurte simbiótico, de leite de búfala enriquecido com poupa de açaí (*Euterpe oleracea*). **Nucleus**, v. 12, n. 2, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3738/1982.2278.1162>.

NASERKHEIL, M., S.R. MIRAIE-ASHTIANI, S. R.; SADEGHI, M.; NEJATI-JAVAREMI, A.; PARK, C. W.; MIND, K. S.; LEE, D. Exploring novel single nucleotide polymorphisms and haplotypes of the diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) gene and their effects on protein structure in Iranian buffalo. *Genes Genom.*, v. 41, n. 11, p. 1265-1271, 2019. DOI: [10.1007/s13258-019-00854-2](https://doi.org/10.1007/s13258-019-00854-2)

OLIVEIRA, B. P. D.; REBELLO, F. K.; SANTOS, M. A. S.; LOURENÇO JUNIOR, J. B. Analysis of buffalo market setting in the State of Pará. **Brazilian Amazon Journal of Agricultural Studies**, v. 8, n. 3, p. 665-677. 2020. DOI:<https://doi.org/10.5296/jas.v8i3.16794>

PINEDA, P. S.; FLORES EB.; VILLAMOR, L. P.; PARAC, C. J. M.; KHATKAR, M. S.; THU, H. T.; SMITH, T. P. L.; ROSEN, B. D.; PAOLO AJMONE-MARSAN, P.; COLLI, L.; WILLIAMS, J. L.; LOW, W. Y. Disentangling river and swamp buffalo genetic diversity: initial insights from the 1000 Buffalo Genomes Project. **GigaScience**, v. 13, p. 1–14, 2024.

RAMADAN, T. A.; SHARMA, R. K.; PHULIA, S. K.; BALHARA, A. K.; GHUMAN, S. S.; SINGH, I. Effectiveness of melatonin and controlled internal drug release device treatment on reproductive performance of buffalo heifers during out-of-breeding season under tropical conditions. **Theriogenology**, v.82, p. 1296–1302. 2014.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P.; SOUZA, E. A.; GONÇALVES, F. M. A.; SOUZA, J. C. **Genética na agropecuária**. 5. ed. Lavras: UFLA, p. 14, 2012.

RAMOS, A. A.; MALHADO, C. H. M.; CARNEIRO, P. L. S.; GONÇALVES, H. C.; AZEVEDO, D. M. M. R. Caracterização fenotípica e genética da produção de leite e o do intervalo entre partos em bubalinos da raça Murrah. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1261-1267, 2006. doi:<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006000800008>.

RIBEIRO, H. F. L. Aspectos da fisiopatologia e biotécnicas na reprodução de bubalinos. In: V Congresso Norte-Nordeste de Reprodução Animal, **Anais[...]** Patos: CONERA, 2010. (CDROM), p. 217-233. 2010.

RODRIGUES, A. E.; MARQUES, J. R. F.; ARAÚJO, C. V.; R.N.C. CAMARGO JÚNIOR, R. N. C.; L.N.S. DIAS, L. N. S. Estimação de parâmetros genéticos para características produtivas em búfalos na Amazônia Oriental. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.3, p.712-717, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000300028>

ROSA, A. N.; MENEZES, G. R. O.; DO EGITO, A. A. Melhoramento genético aplicado em gado de corte: Programa Geneplus-Embrapa, 21 ed. 2013. 256 p.

SANTOS, M. A. S.; SANTANA, A. C.; HOMMA, A. K. O.; BEZERRA, A. S.; LOURENÇO JUNIOR, J. B. Economic efficiency of cattle production in the Brazilian Amazon. **International Journal of Food and Agricultural Economics**, v. 7, p. 293-301, 2019. DOI:[10.22004/ag.econ.296758](https://doi.org/10.22004/ag.econ.296758)

SILVA, C. S.; SILVA FILHO, E.; COSTA, M. R. T. R.; MATOS, A. S.; MARQUES, L. C.; SALES, R. L.; MARQUES, J. R. F. Polymorphisms in the MTRN1A gene promoter in buffaloes in the Amazon. **Buffalo Bulletin**, v. 40, n. 2, p. 293–299, 2021.

SINGH, J.; GHUMAN S. P. S.; DADARWAL, D.; HONPARKHE, M.; DHALIWAL, G. S.; JAIN, A. K. Estimations of blood plasma metabolites following melatonin implants treatment for initiation of ovarian cyclicity in true anestrus buffalo heifers. **Indian Journal of Animal Research. Sci**, v. 80, p. 229–231. 2010.

SLOMINSKI, R. M.; REITER, R. J.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.; OSTROM, R. S.; SLOMINSKI, A. T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. **Mol. Célula. Endocrinol**, v. 351, p. 152–166. 2012. DOI: 10.1016/j.mce.2012.01.004.

SUAREZ-TRUJILLO, A.; CASEY, T. M. Serotonergic and Circadian Systems: Driving Mammary Gland Development and Function. **Frontiers In Physiology**, v. 7, p. 301, 2016. DOI: 10.3389/fphys.2016.00301

SUN, T.; SHEN, J.; ACHILLI, A.; CHEN, N.; CHEN, Q.; DANG, R.; ZHENG, Z.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; WANG, S.; ZHANG, T.; LU, H.; MA, Y.; JIA, Y.; CAPODIFERRO, M. R.; HUANG, Y.; LAN, X.; CHEN, H.; JIANG, Y.; LEI, C. Genomic analyses reveal distinct genetic architectures and selective pressures in buffaloes. **Gigascience**, v. 9, n. 2, p. 166, 2020. DOI: 10.1093/gigascience/giz166.

TEIXEIRA, L. V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 29, p. 96-100, 2005.

TONHATI, H. Melhoramento genético de bubalinos para carne e leite. *In: OLIVEIRA, G.J.C.; ALMEIDA, A.M.L.; SOUZA FILHO, U.A.S. O búfalo no Brasil*. Cruz das almas: UFBA – Escola de Agronomia, p. 101-113, 1997.

TORRES-JÚNIOR, J.R. S.; SANTOS, L.S.; DIEGO L. S.; RIBEIRO, D. L. S.; FRANÇA, I. G.; CARVALHO-NETA, A. V. Aspectos Moleculares de Reprodução em Bubalinos. *In: Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal*. 2018. **Anais...** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.42, n.3-4, p.170-175, jul./dez. 2018. Disponível em [www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v42/n3-4/p170-175%20\(RB757\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v42/n3-4/p170-175%20(RB757).pdf)

VASCONCELOS, A. T. C. Búfalos no Maranhão. 1. ed. São Luís, MA. Amaury D`Ávila **Editoração Eletrônica**, p. 160, 2012.

WARRIACH, H.M. , MCGILL, D. M.; BUSH, R. D.; WYNN, P. C.; CHOHAN, K. R. A review of recent developments in buffalo reproduction. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.28, p. 451–455, 2015. DOI: 10.5713/ajas.14.0259.

YANAR, M.; AYDIN, R.; UGUR, F. Relationship of body measurements with milk production traits in Brown Swiss cattle. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 6, p. 444-447, 2000.

ZETOUNI, L.; CAMARGO G. M.; SILVA FONSECA, P. D.; CARDOSO, D. F.; GIL, F. M.; HURTADO-LUGO, N. A.; ASPILCUETA-BORQUIS, R. R.; CERVINI, M.; TONHATI, H.

Polymorphisms in the MTRN1A gene and their effects on the productive and reproductive traits in buffaloes **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 2, p. 337-340. DOI: 10.1007/s11250-013-0493-1, 2014.

#### 4 DESEMPENHO DE BÚFALAS LEITEIRAS ASSOCIADO A UM INDEL NA REGIÃO REGULADORA DO GENE RECEPTOR DA MELATONINA

(de acordo com as normas do Iraqi Journal of Veterinary Sciences)

##### RESUMO

A bubalinocultura, prática agropecuária relevante nos países em desenvolvimento e especialmente nas regiões amazônicas, envolve búfalos que apresentam bom desempenho produtivo e reprodutivo. O melhoramento genético visa a multiplicação de indivíduos com características econômicas importantes, sendo crucial a identificação precoce do potencial genético por meio de marcadores moleculares. Este estudo teve como objetivo associar um bloco de inserção/deleção (INDEL) no gene receptor da melatonina 1A (MTRN1A) com a produção de leite em búfalas mestiças da Amazônia. Foram coletadas 70 amostras de sangue de búfalas de uma propriedade em Bujaru, Pará, e o DNA foi extraído para realizar reações de PCR e sequenciamento. O sequenciamento foi comparado com sequências de referência no NCBI GenBank, e as frequências alélicas, genotípicas, heterozigosidade, coeficientes de endocruzamento e desvio de Hardy-Weinberg foram analisados. Encontraram-se três genótipos (In/In, In/Del, Del/Del), sendo o alelo In o mais frequente (0,64). A comparação zootécnica da produção de leite não revelou diferenças significativas entre os genótipos ( $P > 0,05$ ), indicando que os polimorfismos de INDEL no gene MTRN1A não influenciam a produção de leite nas búfalas da região amazônica. Embora não haja efeito na produção de leite, os polimorfismos INDEL podem ser úteis em estudos sobre variabilidade genética e características reprodutivas dos búfalos.

**Palavras chave:** deleção, melhoramento, produção.

##### 4.1 Introdução

A bubalinocultura é uma atividade agropecuária de grande importância econômica no fornecimento de carne e leite, e ainda, contribui com força de tração nas atividades no campo (1). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE (2), o Brasil possui o maior rebanho da América Latina, com cerca de 1.672.956 cabeças, sendo que a região Norte do país destaque na produção, com 67,5% do rebanho nacional.

Segundo a ABCB (3), cerca de 30% de todo o rebanho nacional é focado na produção de leite, sendo observado a sua crescente comercialização e de seus derivados, atraindo consumidores que buscam um produto diferenciado e com qualidade nutricional e funcional (4). Rosales e Batalha (5) complementam que componentes como gorduras e sólidos totais tornam o leite de búfala de qualidade superior ao leite de vaca.

Tais componentes são características que se expressam várias vezes ao longo da vida dos animais e seus registros, podem ser coletados e contribuem para uma estimativa mais acurada dos parâmetros genéticos e do valor genético dos animais, pois vários genes podem ser considerados candidatos para variação genética em características economicamente importantes em estratégias de seleção de gado (6).

Além disso, identificar polimorfismos nesses genes candidatos, incluindo aqueles associados à característica quantitativa para seleção assistida por marcadores, usando marcadores de polimorfismo de inserção/deleção de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (INDEL), por exemplo, que podem ser aplicados em programas de melhoramento para aumentar a produção de leite (7).

Nos mamíferos, a melatonina é sintetizada na glândula pineal e liberada de maneira periódica (luz e a escuridão), ela interage com seus receptores para realizar muitas funções biológicas, como a regulação do relógio biológico e do sono (7), sendo a *Pars tuberalis* da glândula pituitária a mais importante na expressão dos receptores de melatonina (9,10).

Em animais sazonais, a resposta da expressão dos receptores varia de acordo com a estação do ano, desta forma, o gene do receptor de melatonina 1A (MTRN1A) que está localizado no cromossomo 1 do búfalo, e, codifica o receptor que afeta a estimulação da melatonina em períodos de escuridão e desempenha um grande papel na regulação de muitas características produtivas e reprodutivas como a regulação do crescimento dos folículos ovarianos, taxa de prenhez e porcentagem de proteína do leite (11,10,12, 13, 14).

Diante disso, o objetivo da pesquisa é associar um bloco de deleção/inserção (INDEL) na região promotora do gene receptor da melatonina 1A (MTRN1A) com dados zootécnicos de produção de leite em um rebanho de búfalas mestiças da região amazônica.

## **4.2 Material e Métodos**

Todos os aspectos dessa pesquisa foram conduzidos de acordo com todos os padrões do bem-estar animal determinados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de

Experimentação Animal) do Brasil e aprovados em 25 de maio de 2022 pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) protocolo UFRA 2820150222 (ID 000479).

Foram coletadas amostras de sangue de 70 búfalas mestiças das raças Murrah e Mediterrâneo com idade entre 1 e 5 anos pesando entre 450 e 500 kg, provenientes de uma fazenda leiteira localizada no município de Bujaru, estado do Pará, Brasil, assim como seus dados quantitativos de média diária da produção de leite de cada animal.

Os animais foram submetidos à coleta de 5 ml de sangue e preservadas em EDTA, posteriormente, acondicionadas à temperatura de -20 °C, para o processamento de extração de DNA no Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular da Universidade Federal Rural da Amazônia.

A extração do DNA genômico foi realizada por meio do método fenol clorofórmio descrito por Sambrook (15). Este DNA foi quantificado em espectrofotômetro BioDrop (Thermo Scientific, Wilmington, UK) com absorvância a 260 nm sendo a pureza determinada pelas razões A260/230 e A260/280, sendo congelado e armazenado a -20°C.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em um volume final de 20 µL para amplificar um fragmento de 162 pb. Dois pares de primers foram desenhados baseados na sequência da região promotora do gene da Melatonina em ovinos depositado no *Genebank* com referência AY524665, *forward* 5'-TGCACACATCCTAGGACCTG-3' e *reverse* 5'-TCCAGGCCTTAAGGGTACAGTC-3'.

Para a amplificação do par de *primers* foi realizada a PCR (Reação em cadeia de Polimerase), com o volume final de 20 µL, sendo 50 ng de DNA genômico, 1X de Taq DNA Polymerase, 2X Master Mix (Ampliqon, Denmark), 10 nM de cada *primer* - *forward e reverse*, 10% de Solução-Q (Quiagen, Brasil) diluídos de água ultra pura.

As reações foram realizadas em um Termociclador (*2720 termal cycler Applied Biosystem*) com temperatura inicial de desnaturação de 95 °C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos com uma temperatura de desnaturação de 94 °C por 1 minuto, uma temperatura de anelamento de 61 °C por 1 minuto, uma temperatura de extensão de 72 °C por 2 minutos, seguida por uma temperatura de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos finais dos PCR's foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,0 % com corrente de 100 V/ 90mA por 60 minutos e a visualização dos tamanhos dos fragmentos (pb), ocorreram por meio do Transiluminador de luz ultravioleta M-20 (UVP) com o uso de um padrão de massa molecular *Ladder* de 1000 pb como referência.

Os produtos destas PCRs foram purificados utilizando o kit de Purificação de produtos de PCR em coluna (*Ludwig Biotec LTDA*, Alvorada, RS, BR), seguindo as recomendações do

fabricante, e foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% com corrente de 100 V/ 90mA por 45 minutos e a visualização ocorreu no Transiluminador de luz ultravioleta M-20 (UVP).

Estes foram sequenciados por meio do método de Sanger utilizando o reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Invitrogen Califórnia/EUA)* em um volume final de 10 µL em um sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa *Finch TV* versão 1.4.0 (Geospiza Research Team, USA), e a ferramenta BLAST para contrastar com as correspondentes sequências de referência de búfalos inseridas no NCBI *GenBank*, e por fim foram alinhadas no programa BioEdit 7.2 usando alinhamento múltiplo ClustalW (16).

Os resultados do sequenciamento obtidos foram submetidos ao programa Genepop v.5 (17), o qual determinou as frequências alélicas, genotípicas, heterozigosidade observada e esperada, coeficientes de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) e a probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0.05$ ).

As associações foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) com efeito fixo do genótipo e comparação de média pelo teste de Tukey, através do programa SAS OnDemand (versão livre), com nível de significância menor que 0,05 %.

### 4.3 Resultados

Foram genotipados 70 animais com 162 pb e após o sequenciamento, foram obtidos 03 (três) genótipos: In/In (semelhante ao genótipo selvagem, apresentaram sequência ACAA na posição – 1482), In/Del (com uma deleção de ACAA na posição – 1482) e Del/Del (com duas deleções, ACAA e TGTT, na posição – 1482) conforme demonstrado na Tabela 01.

**Tabela 01.** Demonstração dos genótipos obtidos.

Genotypes	Upstream	Indel Position -1482	Downstream
NC_059157.1	5'TGCACACATCCTAGGACCTG	ACAA	AGGTCCGGAATTCCCATGTCAG <sup>3'</sup>
In/In	5'TGCACACATCCTAGGACCTG 5'TGCACACATCCTAGGACCTG	ACAA ACAA	AGGTCCGGAATTCCCATGTCAG <sup>3'</sup> AGGTCCGGAATTCCCATGTCAG <sup>3'</sup>
In/Del	5'TGCACACATCCTAGGACCTG 5'TGCACACATCCTAGGACCTG	ACAA ....	AGGTCCGGAATTCCCATGTCAG <sup>3'</sup> AGGTCCGGAATTCCCATGTCAG <sup>3'</sup>
Del/Del	5'TGCACACATCCTAGGACCTG 5'TGCACACATCCTAGGACCTG	.... ....	AGGTCCGGAATTCCCATGTCAG <sup>3'</sup> AGGTCCGGAATTCCCATGTCAG <sup>3'</sup>

O alelo mais frequente foi o In (0,64) e o genótipo mais frequente foi o In/Del (0,529). A população apresenta Equilíbrio de Hardy-Weinberg, porque os desvios entre os genótipos observados e os esperados não são significativos ( $P > 0,05$ ).

É possível observar que o resultado do  $F_{IS}$  demonstra que a população não está sob forte influência de endogamia (Tabela 02).

**Tabela 02.** Estimativas de diversidade genética e probabilidade de Hardy-Weinberg.

Alelos	Frequência	Genótipos	Observado	Esperado	$F_{IS}$	PHW
In	0,64	In/In	0,371	0,402	-0,1342	0,3098
In/Del	0,36	In/Del	0,529	0,466		
Del		Del/Del	0,100	0,131		

$F_{IS}$ = Coeficiente de endocruzamento; PHW= Probabilidade de Hardy-Weinberg.

A análise de associação dos genótipos com a produção de leite média diária não foi significativa ( $P > 0,05$ ). Os resultados estão representados na Tabela 03.

**Tabela 03.** Associação da produção de leite média diária com os diferentes genótipos.

Genótipos	Média da produção de leite diária (l)	DP	Probabilidade de F
In/In	5,187	1,664	0,3259
In/Del	5,461	1,745	
Del/Del	6,472	1,402	

l= litros; DP= Desvio Padrão

#### 4.4 Discussão

As variações nas características reprodutivas e produtivas são expressões resultantes de fatores genéticos e ambientais (18), e, o fator ambiental mais importante que afeta a regulação da sazonalidade reprodutiva em búfalos é o fotoperíodo, que atua biologicamente através de seu efeito na secreção do hormônio melatonina (19).

Com o avanço do desenvolvimento tecnológico, a seleção genética então passa a auxiliar a avaliação genômica dos animais, através de marcadores moleculares, usados para marcar alelos que sejam de interesse econômico na atividade pecuária (20).

Diversos genes são estudados com referência à produção de leite em animais domésticos, sendo que o gene do receptor de melatonina 1A (MTRN1A) tem se mostrado um excelente marcador para estudos genéticos populacionais (18). Kininis e Kraus (21) observaram que as mutações que ocorrem na região promotora dos genes, podem gerar alterações na expressão gênica resultando em diferentes papéis produtivos ou reprodutivos nos búfalos.

Carcangiu (22) Luridiana (23) encontraram uma associação entre atividade reprodutiva sazonal e polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em búfalos italianos e Gunwant (24) em búfalos indianos Murrah. Barbosa (25), investigando a região promotora do gene do receptor

de melatonina, detectaram um ponto polimórfico na posição -1511 e a região indel na posição -1482, sendo este indel também observado nos resultados do presente estudo.

Silva (26) ao analisarem 69 búfalos, sendo 38 da raça Murrah, 18 da raça Mediterrâneo e 13 mestiços de Murrah com o Mediterrâneo sendo o haplótipo A (posição -1511 T e -1482 apresenta ACAA) e o haplótipo B (posição -1511 C e -1482 não apresenta ACAA) foram encontrados em todos os grupos e as frequências dos haplótipos foram na raça para Murrah x Mediterrânea (mestiça) sendo  $A=0,65$  e  $B=0,35$  e o genótipos  $AA=0,46$ ,  $AB=0,39$  e  $BB=0,15$ , dados convergentes com da pesquisa.

Al-Sarai e Al-Anabri (27) investigando criações de búfalos em Bagdá encontraram também três genótipos, TT (Selvagem) TC (Heterozigoto) e CC (Mutante) e suas proporções de distribuição foram 34%, 28% e 38% respectivamente, e que as diferenças entre essas porcentagens foram altamente significativas ( $P<0,01$ ), e a frequência alélica foi 0,51 e 0,49 para ambos os alelos A e B, respectivamente, dados inferiores ao encontrados no estudo supracitados.

Bora (19) identificaram o polimorfismo genético no gene MTNR1A em búfalos do pântano de Assam (Luit) e Manipur (Manipuri eroi) utilizando PCR-RFLP e encontraram três genótipos CC, CT e TT foram detectados na população de búfalos Luit com frequências 0,37, 0,47 e 0,16, respectivamente, enquanto o genótipo TT não foi encontrado nos búfalos de Manipuri.

No presente estudo, analisando a população de búfalos mestiços, há equilíbrio de Hardy-Weinberg, visto que os desvios entre os genótipos observados e os esperados não são significativos ( $P>0,05$ ), bem como encontrado por Silva (26) e por Bora (19) e essa baixa variabilidade indica que ocorreu endogamia, sendo contra ponto ao encontrado no presente estudo.

Os genótipos avaliados não tiveram efeito na produção de leite, assim como observado por Silva (26). Já Zetouni (14) ao analisarem fêmeas bubalinas da raça Murrah verificaram a presença de polimorfismos no éxon 2 do gene MTRN1A em búfalos através do PCR-RFLP e perceberam sua associação significativa com a porcentagem de proteína no leite, porém sem evidência de correlação direta com características reprodutivas.

Já Al - Sarai e Al-Anabri (27) encontraram o efeito significativos dos genótipos do MTRN1A na produção diária de leite ( $P<0,05$ ), sendo as bufalas com genótipo TC apresentaram a maior produção diária de leite ( $9,41 \pm 0,47$  kg) influenciando diretamente nos componentes do leite estudado (proteína, gordura, lactose, sólidos não gordurosos solúveis e cinzas) ( $P<0,01$ ).

## 4.5 Conclusão

Pode-se concluir que a utilização do gene MTRN1A como marcador é um método estratégico de melhoramento genético para os búfalos e o polimorfismo de inserção/deleção (INDEL) pode ser utilizado para investigação de variabilidade genética, sendo a variante alélica IN mais representativa.

Os diferentes genótipos não foram associados à produção de leite no presente estudo. No entanto, a variabilidade na população indica um potencial em aumentar o desempenho produtivo do rebanho, implicando na seleção adequada, métodos e sistemas de criação. Sugere-se a ampliação de estudos, com amostras maiores e a inclusão de outras variáveis genéticas, ambientais e fenotípicas, para melhor compreensão das interações entre os fatores que impactam a produção.

## Referências

1. Warriach HM, McGill DM, Bush RD, Wynn PC, Chohan KR. A review of recent developments in buffalo reproduction—a review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2015;28(3):451–455. doi: 10.5713/ajas.14.0259
2. IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2023. Produção da Pecuária Municipal, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, Brasil. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>
3. ABCB. Associação Brasileira de Criadores de Búfalo. Disponível em: <https://bufalo.com.br/acbc/>. Acesso em: 16/11/2024
4. Araújo, KBS, AHN Rangel, FCE Fonseca, EM Aguiar, AA Simplício, LP Novaes e DML Júnior. Influence of year and calving season on the production, composition and yield of buffalo mozzarella cheese in the state of Rio Grande do Sul, North, Brazil. *Ital. J. Anim. Sci.*, 2012;11(16): 87-91. DOI: <https://doi.org/10.4081/ijas.2012.e16>
5. Rosales FP, Batalha MO. Coordination of the Chain of Buffalo Milk in Sao Paulo State (Brazil). *Buffalo Bulletin*. 2013;32:1200-1203. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/290009157>
6. Mrode RA. *Linear Models for the Prediction of Animal Breeding Values*. 3° ed. CABI. 2014; 360 p. DOI:10.1079/9780851990002.0000
7. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003;17:273-285. DOI: 10.1016/s1521-690x(03)00016-2
8. Naserkheil M, Miraie-Ashtiani SR, Sadeghi M, Nejati-Javaremi A, Park CW, Min KS, Lee D. Exploring novel single nucleotide polymorphisms and haplotypes of the diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) gene and their effects on protein structure in Iranian buffalo. *Genes Genom*. 2019;41(11):1265-1271. DOI: 10.1007/s13258-019-00854-2
9. Hong LY, Hong WS, Zhu WB, Shi Q, You XX, Chen SX. Cloning and expression of melatonin receptors in the mudskipper *Boleophthalmus boddarti*: their role in synchronizing its semilunar spawning rhythm. *General and Comparative Endocrinology*. 2014;195:138-150. DOI: 10.1016/j.ygcen.2013.11.004

10. Majidinia M, Reiter RJ, Shakouri SK, Mohebbi I, Rasteghar M, Kaviani M, Yousefik B. The role of melatonin, a multitasking molecule, in retarding the processes of ageing. 2018. *Ageing Research Reviews*. 2018;47:198-213. DOI: 10.1016/j.arr.2018.07.010
11. Miziara MN, Goldammer T, Stafuzza NB, Ianella P, Agarwala R, Schaeffer AA, Elliott JS, Riggs PK, Womack JE, Amaral MEJ. A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 1 (BBU1). *Cytogenetic and Genome Research*. 2007;19(1-2):100-104. DOI: 10.1159/000109625, 2007.
12. Singh J, Ghuman SPS, Dadarwal D, Honparkhe M, Dhaliwal GS, Jain AK. Estimations of blood plasma metabolites following melatonin implants treatment for initiation of ovarian cyclicity in true anestrus buffalo heifers. *Indian Journal of Animal Research Sci*. 2010;80:229–231. Disponível em: //epubs.icar.org.in/index.php/IJAnS/article/view/120/114
13. Ramadan TA, Sharma RK, Phulia SK, Balhara AK, Ghuman SS, Singh I. Effectiveness of melatonin and controlled internal drug release device treatment on reproductive performance of buffalo heifers during out-of-breeding season under tropical conditions. ***Theriogenology***, 82: 1296–1302. 2014. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.08.014
14. Zetouni L, de Camargo GM, da Silva Fonseca PD, Cardoso DF, Gil FM, Hurtado-Lugo NA, AspilcuetaBorquis RR, Cervini M, Tonhati H. Polymorphisms in the MTRN1A gene and their effects on the productive and reproductive traits in buffaloes. *Trop Anim Health Prod*. 2014;46:337-340. DOI://doi.org/10.1007/s11250-013-0493-1
15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. In: *A Laboratory Manual*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Sinalização do Receptor Nuclear. 1989;6:1-11. DOI: 10.1621/nrs.06005.
16. HALL TA. Bioedit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999; 41:95-98.
17. Raymond M, Rousset F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 1995;86:248-249. DOI://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573
18. Torres-Júnior JRS, Santos LS, Ribeiro DLS, França IG, Carvalho-Neta AV. Aspectos Moleculares de Reprodução em Bubalinos. *Revista Brasileira Reprodução. Animal Belo Horizonte*, v.42, n.3-4, p.170-175, jul./dez. 2018. Disponível em: cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v42/n3-4/p170-175%20(RB757).pdf.
19. Bora A, Bora P, Majumdar S, Singh N, Kalita G, Behera P, Mayengbam P, Tolengkomba TC. Genetic polymorphism of Melatonin receptor (MTNR1A) gene in Swamp buffalo of Assam and Manipur, India. *International Journal of Livestock Research*, 2021;11(3):119-123. DOI:10.5455/ijlr.20201123013556
20. Ramalho MAP, Santos JB, Pinto CABP, Souza EA, Gonçalves FMA, Souza JC. *Genética na agropecuária*. 5<sup>st</sup> ed. Lavras: UFLA; 2012. 14 p.
21. Kininis M, Kraus WL. A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis. *Nucl Recept Signal*. 2008;15:6:e005. DOI: //doi.org/10.1621/nrs.06005
22. Carcangiu V, Mura MC, Pazzola M, Vacca GM, Paludo M, Marchi B, Daga C, Bua S, Luridiana S. Characterization of the Mediterranean Italian buffaloes melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene and its association with reproductive seasonality. *Teriogenology*. 2011;76(3): 419-426. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.02.018
23. Luridiana S, Mura MC, Pazzola M, Paludo M, Cosso G, Dettori ML, S. Bua S, Vacca GM, Carcangiu V. 2012. Associação entre o polimorfismo do gene do receptor de melatonina 1A (MTNR1A) e o desempenho reprodutivo de búfalos italianos do Mediterrâneo. *Reprod. Fertil. Develop*. 2012;24(7):983-987. DOI: 10.1071/RD11297
24. Gunwant P, Pandey AK, Kumar A, Singh I, Kumar S, Phogat JB, Kumar V, Patil CS, Tomar P, Kumar S, Magotra A. Melatonin receptor gene (MTNR1A) polymorphism and its

- association with seasonal reproduction in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Ciência*, 2018;199:51-59. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2018.10.006
25. Barbosa EM, Souza BB, Guimarães RC, Silva LKN, Azevedo JSN, Gonçalves EC, Ribeiro HFL, Rolim Filho ST, Silva Filho E. Polymorphisms in the melatonin receptor gene promoter and their associations with fertility characteristics in buffalo herd in Eastern Amazon. *Genet Mol Res.*16, n.2, 2017. DOI: 10.4238/gmr16029610
26. Silva CS, Silva Filho E, Costa MRTR, Matos AS, Marques LC, Sales RL, Marques JRF. Polymorphisms in the MTRN1A gene promoter in buffaloes in the Amazon. *Buffalo Bulletin.* 2021;40:293–299.
27. Al-Sarai TQ, Al-Anabri NN. Polymorphism of mtrnia gene and its association with some productive traits in iraqi buffaloes. *Plant Archives.* 2019;19(2):3546-3550. DOI: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20219950709>

## **ANEXO**

Regras para formatação de artigos do Iraqi Journal of Veterinary Sciences.

### **AUTHORS' GUIDELINES FOR MANUSCRIPT PREPARATION**

Authors should submit their manuscripts electronically through the Journal website submission system to the Editorial Office. IJVS Website: [www.vetmedmosul.com](http://www.vetmedmosul.com)

#### **Download Documents**

- 1- [Manuscript Template \(Reviewers version\)](#)
- 2- [Manuscript Template \(Revised version\)](#)
- 2- [Title Page](#)
- 3- [Authors' Guidelines \(PDF version\)](#)

#### **1: PREPARATION OF MANUSCRIPTS**

Manuscripts must be submitted in English and written according to proper grammar and terminology. Manuscripts should be typed in Times New Roman of 12 pt. font and MS Word format in one column using letter paper size; the marginal space from up and the downside is 2.98 cm, from the left side 2 cm, while from the right side 1.61. No line number should be applied to the manuscript. Manuscript submission must be applied once to obtain only one submission ID number. More than one submission for a single manuscript can lose the chance of manuscript consideration.

##### **1-1: English Language Writing**

All publications in the IJVS are in the English language. Authors whose first language is not English should ensure their manuscript is written in conversational English before submission. Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture). The IJVS provides no language and copy-editing services; hence, authors who feel their manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors are encouraged to obtain such services before submission. Authors are responsible for all costs associated with such services.

##### **1-2: New Submissions**

Submission to the IJVS journal proceeds online, and authors will be guided stepwise through creating and uploading the manuscript files. As part of the manuscript, authors may submit the manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a Word document (\*.docx) used by referees to evaluate the manuscript. All figures and tables should be embedded and included in the main manuscript file in the result section; separating these items at the end of the manuscript will increase the chance of manuscript rejection.

### **1-3: References**

References list must be provided according to the format of the IJVS references in a consistent style. Where applicable, it should be formatted as follows,

Author(s) name(s). article title. Journal abbreviation. year of publication;volume(issue number);pagination. DOI or URL:

**Please note that don't print your references using Mendeley or Endnote software or any other references citation software; using manual print using MS Word is the only method that is acceptable by IJVS, else a state of rejection will be chosen. In addition, the DOI is obligatory to be embedded at the end of each reference; if this ID is not available, the reference URL can be used; failure to conduct these minimal requirements for reference format and style will increase the chance of manuscript rejection.**

### **1-4: Revised Submissions**

Regardless of the file format of the original submission, at revision, the authors are instructed to submit their Manuscript in IJVS format in a Word document with extension \*.docx only. Keep the layout of the text as simple as possible. To avoid unnecessary errors, the authors are strongly advised to use 'spell-check' and 'grammar-check' for the submitted manuscript. **At this stage, the author(s) name, affiliation, emails, and ORCID should be inserted in the main manuscript file.**

## **2: MANUSCRIPT STRUCTURE**

Manuscript literature and tenses must be structured as Title; Abstract; Keywords; Article Highlights; Introduction; Materials and Methods; Results and Discussion; Conclusion; Acknowledgements; and References submitted in a file with limited size.

### **2-1: Manuscript Title**

The title of up to 17 words should not contain the name of the research's locations, countries, or cities, as well as abbreviations. Avoid complicated and technical expressions, and do not use vague expressions. **The author whose Arabic language is their native language should submit an Arabic title.**

#### **2-2: Abstract**

An abstract of 150 to 250 words that sketches the purpose of the study; basic procedures; main findings, novelty; discussions, and principal conclusions, should not contain any undefined abbreviations or references. **The author whose Arabic language the native language should submit Arabic abstract.**

#### **2-3: Keywords**

Provide 3 to 5 keywords that can be used for indexing purposes. Keywords should not repeat the words of the manuscript title or contain abbreviations and shall be written in alphabetical order as separated by a semicolon. Abbreviations should be defined at first mention and used consistently throughout the text.

#### **2-4: Highlights**

Highlights are mandatory for the IJVS journal. A highlight is a concise, short phrase conveying the core findings of your research. The approximate length of a highlighted item will be between 3 to 5 points only.

#### **2-5: Introduction**

Describes the background of the investigation with updated information briefly and state the aim of the study.

#### **2-6: Materials and Methods**

Provide sufficient details to enable the experiments to be reproduced. Support the techniques and methods used with references. Investigations on animals must comply with institutional and/or equivalent guides for the care and use of animals. Metric and standard international units should be used in this section and throughout the manuscript. Specify the computer software used for statistical analysis and define statistical terms, abbreviations, and symbols applied.

#### **2-7: Results**

Present the results and their significance. Graphs and tables should be self-explanatory. Do not repeat in figures the data presented in tables. Tables and figures should be numbered in the order of their mention in the text.

### **2-8: Discussion**

Relevant updated references support deals with critical review and interpretations of the results. Repetition of data should be avoided. It should end with brief conclusions. In Short Communications, Results and Discussion may be combined.

### **2-9: Conclusion**

This section should highlight the major firm discoveries and state the added value of the main finding without literature references.

### **2-10: Acknowledgements**

Acknowledgments of people, grants, funds, etc., should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full. Financial support affiliation of the study, if it exists, must be mentioned in this section. Thereby, the Grant number of financial support must be included.

### **2-11: Conflict of Interest**

A conflict of interest statement must be placed in the manuscript below: "The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication and/or funding of this manuscript."

### **2-12: References**

**Please note that don't print your references using Mendeley or Endnote software or any other reference format software; using manual print only by using MS Word is the only method that is acceptable by IJVS.** Literature references should be numbered (in brackets) consecutively in the text in the order in which they are first mentioned and listed at the end of the manuscript. Titles of journals should be abbreviated according to the List of Journals Indexed for MEDLINE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Personal communications or unpublished data should not be mentioned in the text or list of references.

## **3: EXAMPLE of REFERENCES**

**Please note that don't print your references using Mendeley or Endnote software or any other reference format software;** manual print using MS Word is the only method that is acceptable by IJVS.

1- **Journal article:** Bingham CM, Wilson PR, Davies AS. Real-time ultrasonography for pregnancy diagnosis and estimation of fetal age in farmed red deer. *Vet Rec.* 1990;126:102-106. Doi: 10.23.23455.6565.837363

2- **Book:** Wanamaker BP, Pettes CL. *Applied pharmacology for the veterinary technician.* 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1996. 372 p.

3- **Chapter in a book:** Chabala JC, Miller MW. Chemistry of antiprotozoal agents. In: Campbell WC, Rew RS, editors. *Chemotherapy of parasitic diseases.* New York: Plenum Press; 1986. 25-85 p.

4- **Ph.D. Dissertation:** Zhao C. Development of nanoelectrospray and application to protein research and drug discovery [Ph.D. dissertation]. Buffalo: State University of New York at Buffalo; 2005. 276 p.

5- **Master's thesis:** Roguskie JM. The role of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin glycan in virulence [master's thesis]. Pittsburgh: Duquesne University; 2005. 111 p.

#### 4: TABLES

Do not submit tables as a photograph. Tables should be set within the text and have a clear and rational structure and consecutive numerical order. All tables should be numbered (1, 2, 3, etc.). Give enough information in subtitles so that each table is understandable without reference to the text. For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table. Identify any previously published material by referencing the source at the end of the table caption.

#### 5: FIGURES

Figures/ illustrations should be in high-quality artwork, within 200-300 dpi. Ensure that figures are clear, labeled, and of a size that can be reproduced legibly in the journal. Figures should be set within the text. The following remarks should be applied to the figures:

1- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text of the manuscript.

2- Figure captions begin with the term Figures. Figures should be with captions placed below the figure.

3- No punctuation is to be placed at the end of the caption.

4- Identify all elements found in the figure in the figure caption, and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

5- Identify previously published material by giving the source as a reference citation at the end of the figure caption.

## **6: SUBMISSION OF FINAL CHECKLIST**

To **download the Submission Checklist**, **click this link**.

1. Read the Journal's Guide for Authors and make sure that the manuscript (text, tables, and figures) meets Journal requirements.
2. The manuscript contains the main sections outlined in Journal's Guide for Authors.
3. Spell-check the Manuscript.
4. All authors must read the Ethics in publishing, Plagiarism prevention, Violation of publication ethics, and Handling misconduct cases before being submitted to the IJVS.
5. The manuscript has been read and approved by all listed authors.
6. The Corresponding Author and the whole contributors of the manuscript are advised to be registered at the journal website to keep their names in the manuscript bio-sketches.