



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

JULIANA VASCONCELOS FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DO GENE DO HORMÔNIO ANTI-MULLERIANO (AMH) EM
FÊMEAS BUBALINAS SUBMETIDAS À SINCRONIZAÇÃO DE CIO, NA
AMAZÔNIA.**

**BELÉM - PA
2025**

JULIANA VASCONCELOS FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DO GENE DO HORMÔNIO ANTI-MULLERIANO (AMH) EM
FÊMEAS BUBALINAS SUBMETIDAS À SINCRONIZAÇÃO DE CIO, NA
AMAZÔNIA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte final das exigências do Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia, para obtenção de título de mestre.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho.

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

F475a Figueiredo, Juliana Vasconcelos

Avaliação do gene do *hormônio anti-mulleriano (AMH)* em fêmeas bubalinas submetidas à sincronização de cio, na Amazônia. / Juliana Vasconcelos Figueiredo. - Belém, 2025.
48 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em Reprodução Animal na Amazônia (ReproAmazon), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2025.

Orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho.

1. Bubalinos. 2. Fertilidade em bubalinos. 3. Polimorfismo. I. Silva Filho, Ednaldo da, *orient.* II. Título.

CDD - 636.08926

JULIANA VASCONCELOS FIGUEIREDO

AVALIAÇÃO DO GENE DO HORMÔNIO ANTI-MULLERIANO (AMH) EM FÊMEAS BUBALINAS SUBMETIDAS À SINCRONIZAÇÃO DE CIO, NA AMAZÔNIA.

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte final das exigências do Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia, para obtenção de título de mestre. Área de concentração: Reprodução Animal.

BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 EDNALDO DA SILVA FILHO
Data: 21/02/2025 16:55:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 NATHALIA NOGUEIRA DA COSTA DE ALMEIDA
Data: 21/02/2025 18:22:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Nathalia Nogueira da Costa de Almeida - 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ – UFPA

Documento assinado digitalmente
 SIMONE DO SOCORRO DAMASCENO SANTOS
Data: 24/02/2025 17:06:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Simone do Socorro Damasceno Santos - 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ – UFPA

Documento assinado digitalmente
 ELIZABETH MACHADO BARBOSA
Data: 24/02/2025 16:50:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Elizabeth Machado Barbosa - 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ – UNIFAP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Águida de Cássia Silva Vasconcelos e Clarindo Carneiro dos Santos Filho, à minha tia Márcia Jeane Vasconcelos dos Santos, ao meu irmão Thiago Vasconcelos dos Santos, ao meu grande amor Fernando Henriques Furtado Filho, meus familiares e amigos, que não mediram esforços para me ajudar nessa jornada. Minhas amigas de laboratório, Luana e Rafaelle que deixaram a trajetória mais feliz e mais leve. Vocês foram incansáveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda a glória alcançada em minha vida, por toda a força concedida nos momentos difíceis que enfrentei durante minha trajetória pessoal, acadêmica e profissional. Obrigada, Deus, pela saúde que me permite continuar. Toda honra e toda glória a Ti, Senhor.

Aos meus pais e familiares: minha mãe, Cássia Vasconcelos, que, dia após dia me fortalece para continuar e nunca desistir, independentemente do processo ou do sonho. Por todo amor, dedicação e por ser minha inspiração como mulher. Eu te amo muito, rainha, e ainda quero te encher de orgulho, até poder te mandar mais Pix (piada nossa). Minha avó, Teresinha Vasconcelos (*in memoriam*), pelos princípios e valores que transmitiu à minha vida. Você foi e sempre será minha mãe e meu grande amor. Meu pai, Clarindo Carneiro; minha tia, Jeane Vasconcelos; e meu irmão, Thiago Vasconcelos, que sempre me apoiaram na realização dos meus sonhos e permaneceram firmes comigo nessa grande jornada da vida. Vocês são o meu porto seguro, meu alicerce e minha família. Minha prima, Lia Mara Vasconcelos, por toda ajuda e incentivo para alcançar voos mais altos. Você também é uma inspiração de mulher para mim, e nem imagina o quanto. A todos os meus familiares: primos, tios, tias e sobrinhos, que sempre estiveram ao meu lado e torcendo por mim, o meu mais sincero amor e gratidão.

Ao meu noivo, Fernando Furtado Filho, que, desde o dia em que entrou na minha vida, só multiplicou o amor, o carinho e a dedicação. Juntos, compartilhamos momentos e histórias incríveis. Obrigada por sempre estar comigo, por me incentivar, apoiar, acalmar e por fazer parte dos meus sonhos e por estarmos construindo nossa história e família juntos. Eu te amo muito, meu amor. Obrigada por tudo.

Aos meus amigos e colegas: de infância, do meio acadêmico, do meio profissional, da vila, da UNAMA, UFRA, UFPA, Instituto Evandro Chagas, que sempre estiveram presentes, seja por mensagens, seja pessoalmente, com brincadeiras, risadas e apoio nos momentos em que precisei. Todos, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui. Sou imensamente grata a Deus por cada um de vocês em minha vida.

Durante esse processo do mestrado, algumas pessoas foram essenciais para que o experimento acontecesse. Minhas amigas do laboratório, do campo e da vida: Luana Santos, Rafaelle Casseb, Vitória Moraes, Lana Cardoso, Ana Bagot e Gabriela Rodrigues, que me ajudaram nas coletas, no processamento das amostras e por muitas vezes ficávamos juntas desde cedo da manhã, até tarde da noite na UFRA. Muito obrigada pela amizade e parceria de sempre. Eu amo demais vocês.

Ao meu orientador, Professor Dr. Ednaldo da Silva, por todo o conhecimento transmitido, pela paciência em ensinar e pelo apoio aos nossos projetos. Muito obrigada por me acolher em sua equipe.

Agradecer a Dra. Priscilla Azevedo que não só me apresentou ao professor Dr. Ednaldo para que eu pudesse expressar meu interesse em concorrer uma vaga no ReproAmazon, como também, me auxiliou em muitas etapas durante o mestrado. Obrigada também, Msc. Roberta Silva, pela companhia no laboratório e parceria.

A toda equipe técnica do laboratório da UFRA, aos profissionais da limpeza e da secretaria, que sempre me deram suporte.

À banca julgadora, que contribuiu com sugestões valiosas e orientações para o aprimoramento deste trabalho. Muito obrigada pelo apoio: Dra. Elizabeth, Dra. Natália e Dra. Simone. Vocês são incríveis, minha sincera gratidão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia (ReproAmazon). Às secretárias do ReproAmazon, Dona Val e Dona Pit, que sempre me auxiliaram nas burocracias do programa. Muito obrigada.

A Fazenda que cedeu os animais com as amostras de sangue, ao Médico Veterinário Elevelton Souza que não mediu esforços em ajudar nas coletas de dados e na organização dos animais na fazenda. Muito obrigada.

RESUMO

O manejo reprodutivo em búfalos é essencial para a produtividade do setor agrícola brasileiro, especialmente na região amazônica. O hormônio anti-mulleriano (AMH) é considerado um marcador significativo da reserva ovariana, e compreender a relação entre genótipos e fertilidade é importante para a produção pecuária sustentável. Assim, o presente estudo objetivou investigar a presença de polimorfismo no éxon 5 do gene *AMH*, e suas associações com a eficiência reprodutiva das fêmeas. A pesquisa foi realizada com 54 búfalas multíparas da raça Murrah, localizadas em uma propriedade no município de Bujaru, Pará. As fêmeas foram submetidas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Inicialmente, todas as fêmeas selecionadas para o estudo não estavam gestantes. Somente após a sincronização do cio e a realização do diagnóstico de gestação, os animais foram subdivididos em dois grupos: gestantes e não gestantes. A coleta de sangue para extração de DNA e a avaliação ultrassonográfica dos ovários foram realizadas no dia 11 do protocolo. Após a coleta foi realizada a extração do DNA e para a amplificação do gene *AMH* através da técnica de PCR e por conseguinte, os produtos foram purificados para o sequenciamento. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software SAS, considerando um nível de significância de 0,05, e métodos ANOVA foram empregados para comparar as médias das variáveis reprodutivas. Os resultados mostraram a ausência de polimorfismos no éxon 5 do gene *AMH* em búfalas. Porém observou-se uma diferença significativa da contagem de folículos antrais (AFP) via ultrassonografia transretal em búfalas gestantes e não gestantes ($p = 0,02$). Além disso, variáveis como volume ovariano (V) e folículo dominante (FD) não apresentaram diferenças significativas, sugerindo que esses fatores podem ter um papel menos evidente no âmbito reprodutivo. Estes achados demonstram a conservação do gene *AMH*, além disso destaca a presença dos folículos antrais como preditores da eficiência reprodutiva no presente estudo. A pesquisa destaca a necessidade de futuros estudos em outras regiões do gene *AMH* e a associação com fatores genéticos que podem influenciar na fertilidade. Por fim, os resultados apresentados contribuem para o desenvolvimento de estratégias futuras mais eficazes na reprodução assistida, visando aumentar a eficiência produtiva em rebanhos de búfalas, na região amazônica.

Palavras-chaves: *AMH*; Bubalinos; Fertilidade; Polimorfismo.

ABSTRACT

Reproductive management in buffaloes is essential for the productivity of the Brazilian agricultural sector, especially in the Amazon region. The anti-Müllerian hormone (*AMH*) is considered a significant marker of ovarian reserve, and understanding the relationship between genotypes and fertility is important for sustainable livestock production. Thus, the present study aimed to investigate the presence of polymorphism in exon 5 of the *AMH* gene and its associations with the reproductive efficiency of female buffaloes. The research was conducted with 54 multiparous Murrah breed buffaloes, located on a farm in the municipality of Bujaru, Pará. The females were subjected to a fixed-time artificial insemination (FTAI) protocol. Initially, all females selected for the study were non-pregnant. Only after estrus synchronization and pregnancy diagnosis were the animals subdivided into two groups: pregnant and non-pregnant. Blood collection for DNA extraction and ultrasonographic evaluation of the ovaries were performed on day 11 of the protocol. Following collection, DNA extraction was carried out, and the *AMH* gene was amplified using the PCR technique; subsequently, the products were purified for sequencing. Statistical analyses were performed using SAS software, with a significance level of 0.05, and ANOVA methods were employed to compare the means of reproductive variables. The results showed the absence of polymorphisms in exon 5 of the *AMH* gene in buffaloes. However, a significant difference was observed in antral follicle count (AFC) via transrectal ultrasonography between pregnant and non-pregnant buffaloes ($p = 0.02$). Additionally, variables such as ovarian volume (V) and dominant follicle (DF) did not present significant differences, suggesting these factors may play a less prominent role in reproductive performance. These findings demonstrate the conservation of the *AMH* gene and highlight the presence of antral follicles as predictors of reproductive efficiency in this study. The research underscores the need for future studies in other regions of the *AMH* gene and the association with genetic factors that may influence fertility. Finally, the results presented contribute to the development of more effective future strategies in assisted reproduction, aiming to increase productive efficiency in buffalo herds in the Amazon region.

Keywords: *AMH*; Buffaloes; Fertility; Polymorphism.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	10
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Rebanho bubalino	12
3.2 Aspectos reprodutivos das búfalas	12
3.3 Ciclo estral das búfalas	13
3.3.1 Atividade ovariana e folicular	14
3.3.2 Dinâmica folicular e ovariana.....	16
3.4 Uso da ultrassonografia ovariana para avaliação da fertilidade bubalina	16
3.5 Hormônio anti-mulleriano – AMH	17
3.5.1 Receptores do Hormônio Anti-mulleriano (AMH-R).....	19
3.6 Polimorfismo do gene <i>AMH</i>	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
4. ARTIGO – De acordo com as normas da revista Iraqi Journal of Veterinary Sciences (IJVS)	29
4.1 Avaliação do gene do hormônio anti-mulleriano (<i>AMH</i>) em fêmeas bubalinas submetidas à sincronização de cio, na Amazônia.	29
RESUMO	29
ABSTRACT	29
4.2 Introdução	30
4.3 Material e métodos	31
4.3.1 Ética, animais coletados e local da coleta.....	31
4.3.2 Protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF), em búfalas.	32
4.3.3 Coleta de sangue.	32
4.3.4 Avaliação morfológica do ovário.....	33
4.3.5 Avaliação de polimorfismo.....	33
4.3.5.1 Extração de DNA.....	33
4.3.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da amplificação do gene <i>AMH</i>	33
4.3.5.3 Purificação e sequenciamento do produto da PCR.....	33
4.4 Análises estatísticas	34
4.5 Resultados	34
4.6 Discussão	36

4.7 Conclusão.....	38
Referências	39
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	40
ANEXO I.....	41

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A criação de búfalos se apresenta como uma opção viável para pecuaristas que desejam aumentar a eficiência do sistema de produção, através dos métodos de reprodução (Pinto et al., 2021), diante da capacidade dos animais de se adaptarem as variadas condições climáticas e de solo Brasil.

No estado do Pará, a pecuária de búfalos é uma atividade econômica relevante, e a compreensão dos fatores genéticos que afetam a fertilidade desses animais é crucial para melhorar a eficiência reprodutiva e produtiva, que pode ser alcançada por meio do aprimoramento genético animal, biotécnico explorando seu potencial genético e transmitindo características de interesse para as gerações futuras através de marcadores moleculares (Silva e Ribeiro, 2021).

Os marcadores moleculares são importantes para a seleção de animais com base em determinadas características, em um ambiente específico, permitindo prever o comportamento desses animais quando submetidos a condições apropriadas de manejo, sendo possível observar características que possam selecionar boas fêmeas reprodutoras, através do estudo sobre a fertilidade (Manzoor, Nadeem e Javed., 2019).

A fertilidade da fêmea está fortemente associada à população folicular onde se encontra o tamanho, quantidade de folículos e capacidade de crescimento, sendo estas características desejáveis para produção de oócitos viáveis nas fêmeas. Neste contexto, o hormônio Anti-mulleriano (AMH) é empregado como um biomarcador para avaliar a reserva ovariana. Em búfalas, essas características afetam a fertilidade, e a variação no gene *AMH* pode influenciar as características foliculares e a fertilidade (Pierucci et al., 2019).

A análise da variabilidade genética do *AMH* envolve a identificação de polimorfismos que podem estar correlacionados com a quantidade e qualidade dos folículos ovarianos. Esses polimorfismos podem afetar a produção do AMH e, conseqüentemente, a capacidade reprodutiva das búfalas. Compreender essas associações pode levar ao desenvolvimento de estratégias de manejo e seleção genética que favoreçam animais com maior potencial reprodutivo (Penzias et al., 2020).

O gene *AMH* é estudado em bovinos e bubalinos para detecção de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) quanto a expressão gênica. Porém, a associação do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na região do éxon 5 do gene do *AMH* aliado as características reprodutivas, ainda não foi reportado em bubalinos, tornando este estudo promissor, podendo revelar se o SNP pode ser um marcador genético para a espécie.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Identificar polimorfismos na região do éxon 5 do gene do *AMH* e associar com características ovarianas na predição da fertilidade em búfalas.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar a presença de polimorfismos na região do éxon 5 no gene *AMH*, em búfalas;
- Correlacionar a média de população folicular dos ovários ao diâmetro dos folículos dominantes, em búfalas;
- Correlacionar a média de população folicular dos ovários ao volume ovariano, em búfalas;
- Correlacionar taxa de prenhez com população folicular antral, volume ovariano e folículo dominante, em búfalas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Rebanho bubalino

O estado do Pará lidera a produção de búfalos, tanto na criação quanto na quantidade de animais, possuindo os maiores rebanhos do Brasil e América Latina, com aproximadamente 683.604 cabeças, representando 66% do rebanho nacional, sendo a região Norte distribuída em (69,2%). Já as demais regiões do Brasil, se distribuem nas seguintes proporções: Nordeste (8,2%), Sudeste (13%), Sul (6,1%) e Centro Oeste (3,3%) (IBGE, 2023).

A criação de búfalos na Amazônia é favorecida em termos biológicos devido ao clima, solo, diversidade genética de forrageiras. No entanto, mesmo com todas essas vantagens, o ambiente amazônico continua sendo um desafio para a produção animal devido ao seu clima tropical úmido, temperatura elevada e grande quantidade de chuvas (Da Silva et al., 2021).

Em se tratando de Amazônia, Lima (2016) discute como os búfalos são adaptáveis aos diferentes ambientes da Amazônia, abordando a importância de práticas de manejo sustentáveis e estratégias que considerem as condições climáticas e ecológicas únicas da região, destacando que os búfalos têm um potencial significativo para contribuir para a segurança alimentar e o desenvolvimento econômico local.

Além da importância econômica da exploração desses animais, eles fornecem benefícios como fertilidade, longevidade, eficiência de conversão alimentar e aptidão para produção de leite com alto teor de gordura e proteína, sendo utilizado na produção de laticínios como queijos e iogurtes; além da produção de carne reconhecida por ser magra e saborosa (Teixeira, 2022).

Embora apresentem maior habilidade em se adaptarem a climas adversos, a atividade reprodutiva dos bubalinos é fortemente influenciada por questões ambientais como a disponibilidade de alimentos e o fotoperíodo. Em áreas próximas à linha do Equador, onde a duração do dia é semelhante ao longo do ano, a escassez de alimento é o fator que mais afeta a reprodução (Vale et al., 1996), resultando em atraso da puberdade e aumentando o intervalo entre partos. Ao contrário, regiões com latitude elevada, onde ocorre uma maior variação na duração da luminosidade diária ao longo do ano, o fotoperíodo exerce uma influência na atividade ovariana, aumentando a fertilidade em meses, com dias de menor duração da luminosidade (Campanile et al., 2010).

3.2 Aspectos reprodutivos das búfalas.

Os aspectos reprodutivos em búfalos podem apresentar desafios por diversas razões em búfalas, como: discreta manifestação do cio e dificuldade de detecção folicular, influência de

fatores ambientais e condições de manejo que podem alterar a reprodução dessas fêmeas (Das et al., 2023). Em relação à fisiologia ovariana, as búfalas apresentam ondas de crescimento folicular semelhante às vacas durante o ciclo estral, como recrutamento, seleção, dominância e atresia folicular (Almeida, 2019).

Nesta espécie, são relatadas de uma a três ondas de crescimento, sendo mais comum o padrão de duas ondas de crescimento folicular. Além disso, são animais que produzem e reproduzem até a idade de 15 a 20 anos, podendo apresentar uma taxa de natalidade acima de 80% e taxa de mortalidade abaixo de 3% ao ano (Da Costa; Moreira; Valentim, 1994).

Na região amazônica o desempenho reprodutivo das búfalas que, apesar das condições desafiadoras, como umidade elevada e temperaturas variáveis, essas têm uma boa capacidade de adaptação e podem manter um desempenho reprodutivo relativamente estável. Práticas de manejo podem melhorar a eficiência reprodutiva das búfalas na Amazônia, incluindo nutrição adequada, controle de doenças e manejo de estresse (Lima, 2016).

A detecção do estro é um desafio significativo na reprodução de búfalas e este problema é frequentemente discutido em estudos sobre manejo reprodutivo de búfalos. Autores como Da Silva et al. (2021) e Carvalho, Almeida e Rorigues (2023) abordam a importância de métodos eficazes para a detecção do estro, que pode ser complicado devido às características comportamentais e fisiológicas das fêmeas. Tavares, Silva e Pereira (2019) estudaram a aplicação de tecnologias de monitoramento na detecção do estro de búfalos, como sensores eletrônicos e sistemas de monitoramento remoto para a detecção do estro em búfalos, bem como discutem como a implementação dessas tecnologias pode reduzir os erros na detecção e melhorar o planejamento da inseminação artificial, além de proporcionar dados mais confiáveis para a gestão reprodutiva.

3.3 Ciclo estral das búfalas.

Assim como nos bovinos, o ciclo estral da búfala é dividido em quatro etapas distintas: proestro (dois a três dias); estro (média de 20 horas) como fases foliculares; metaestro (dois a quatro dias) e diestro (14-17 dias) como fases lúteas. Cada uma dessas etapas tem uma duração média de 21 dias, com uma variação de 18 a 32 dias (Warmling., 2018).

A fisiologia reprodutiva da espécie bubalina é distinta e de acordo com Borghese, Rasmussen e Thomas, (2007), os búfalos começam a apresentar o primeiro estro aos 15-18 meses para as espécies de rio (raças: Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi) e aos 21-24 meses para as espécies de pântano (raça: Carabao), com condições favoráveis. São animais que tem uma vida reprodutiva mais longa em comparação aos bovinos (Zicarelli et al., 2005).

Na zona equatorial, onde não existe variação anual na duração de horas de luz conforme a estação do ano, as fêmeas bubalinas são consideradas animais poliéstrais contínuas. Entretanto, na região centro-sul do País são classificadas como animais poliéstricos estacionais de dias curtos, semelhante aos ovinos e caprinos, onde é observada uma concentração maior das manifestações de cio no período do outono (Saraiva et al., 2019). Esta alteração fisiológica acontece devido ao aumento dos níveis de melatonina no sangue, um hormônio produzido na ausência de luz e que estimula a produção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo conforme os dias se tornam mais curtos. Portanto, as variações na duração dos dias são identificadas e convertidas em sinais que afetam diretamente a atividade sexual (Junior, 2019).

O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário (Hafez; Hafez, 2004). Em estudo baseado no bem-estar de bubalinos, foi demonstrado que o estresse térmico é uma das causas que elevam os níveis do hormônio adrenocorticotrófico, ou ACTH que são produzidos pela hipófise, auxiliando na liberação de cortisol pelas glândulas adrenais. Essas mudanças nos sistemas endócrinos causam problemas com o ciclo estral, afetando dessa forma a atividade ovariana e folicular (Silva, 2010)

As interações entre o hipotálamo, a hipófise e os ovários controlam o sistema reprodutivo feminino (eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal). O hipotálamo é responsável pela produção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que impulsiona a produção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) pela hipófise anterior, favorecendo o desenvolvimento e a ovulação dos folículos. A produção de progesterona (P4) pelo corpo lúteo (CL) mantém o útero preparado para a gestação e impede a liberação de GnRH através de um feedback negativo. Em contrapartida, o estrógeno (E2), que é produzido nos ovários, exerce diversas funções, como a indução do estro e a regulação do pico pré-ovulatório de LH, além de estimular a expressão de receptores para FSH (Ferreira; Almeida; Freiras., 2018).

3.3.1 Atividade ovariana e folicular.

O ovário da búfala é ovóide e consideravelmente menor do que o da vaca, apresentando menor número de folículos primordiais e maior taxa de atresia folicular. Os folículos primordiais, medem cerca de 35 μm de diâmetro e encontram-se em estágio de quiescência. Apresentam um oócito (20 μm , na maioria das espécies) rodeado por uma camada única de quatro a oito células achatadas caracterizando a granulosa (Mondadori et al., 2007).

Os folículos primários medem cerca de 25 a 80 μm de diâmetro, representam o estágio inicial do crescimento folicular, e tem como principal característica a presença de um oócito centralizado, envolto por uma única camada de células da granulosa que aumentam em número e se tornam mais volumosas de células cuboides (Van et al., 2005). Os folículos secundários, também possuem oócito centralizado, porém este é envolto por duas ou mais camadas de células da granulosa e pela deposição inicial de material da zona pelúcida em torno do oócito, tornando-se responsivo ao FSH (Young e Mcneilly, 2010).

Os folículos terciários, medem cerca de 100 a 300 μm de diâmetro, são compostos por um oócito, uma zona pelúcida, corona radiata e células do cumulus. Além disso, possuem células foliculares, uma cavidade pequena que contém o líquido folicular (antro), uma membrana basal e duas camadas de células tecais (Gasparrini et al., 2006).

Os folículos apresentam taxa de crescimento semelhante até o momento do desvio folicular, quando apenas um dentre os em desenvolvimento será selecionado, tornando-se o futuro folículo dominante (FD). A partir do aumento da taxa de crescimento e de hormônios, o folículo dominante (FD) poderá alcançar o status pré-ovulatório e culminar com a ovulação. Isto ocorre como resultado da interação dinâmica entre o hormônio luteinizante (LH) e fatores foliculares locais, os quais promovem complexas mudanças estruturais e funcionais. A partir deste momento, o FD perde a dependência do hormônio folículo estimulante (FSH) e passa a ser dependente do LH (Acosta, 2007; Ayres Mingoti, 2012).

A atividade ovariana e a dinâmica folicular em búfalas variam ao longo das estações do ano, sendo influenciada por fatores sazonais, que afetam o desenvolvimento folicular e a ovulação (Barbosa; Silva; Souza., 2016). A monitorização da atividade ovariana pode auxiliar na melhoria da eficiência reprodutiva em fêmeas, contribuindo com a sincronização de ovulações e acompanhamento nas fases de crescimento dos folículos (Ferreira; Almeida; Freiras., 2018).

A alternância de fases de crescimento e de regressão é um sinal da atividade ovariana, envolvendo estruturas foliculares e luteínicas. Os folículos são classificados em folículos pré-antrais sendo estes, caracterizados por não possuírem antro: primordiais, primários e secundários. Os folículos antrais apresentam cavidade antral, sendo que no seu interior há líquido folicular: terciários e ovulatórios (Junqueira; Carneiro, 1995).

3.3.2 Dinâmica folicular ovariana.

No ciclo estral de bubalinos, o desenvolvimento dos folículos ovarianos segue um padrão conhecido como ondas de crescimento folicular. A dinâmica folicular em vacas e novilhas da raça Murrah podem exibir de uma a três ondas de crescimento folicular por ciclo estral, variando conforme a duração da fase lútea, com uma predominância de ciclos com duas ondas foliculares (Campanile et al., 2010).

O búfalo normalmente mostra duas ondas foliculares (63,3%) (Weiller, 2020) com um número menor de folículos recrutados por onda folicular durante um ciclo estral do que o bovino (Campanile et al., 2010).

Cada onda folicular recruta de cinco a 13 folículos, sendo que cada onda de desenvolvimento folicular se distingue pela presença de um conjunto de pequenos folículos que são recrutados e começam uma etapa de crescimento comum que dura aproximadamente três dias. Essas ondas foliculares são antecedidas ou seguidas por um pequeno acréscimo nas concentrações de FSH (Ginther; Danguubiyam, 2019).

Em estudo com fêmeas bubalinas cíclicas, os folículos dominantes atingiram um tamanho de 13 a 15 mm antes da ovulação, sugerindo que em condições normais seus folículos adquiriram a capacidade de ovular em torno de 5 a 8 mm de diâmetro, mas que estes deveriam sofrer um maior desenvolvimento, a fim de secretar estradiol suficiente para produzir um feedback positivo e induzir o pico pré-ovulatório de LH (Junior, 2019).

Esse desequilíbrio relacionado a onda folicular, faz com que aumente a busca por protocolos de padronização hormonal, a fim de se homogeneizar reprodutivamente os animais, onde todos ciclem na mesma época. A técnica mais utilizada para uma padronização da ciclicidade ovariana é a sincronização hormonal aplicada na inseminação artificial em tempo fixo (IATF), onde hoje em dia se tem bons resultados em búfalos (Nascimento et al., 2023).

3.4 Uso da ultrassonografia ovariana para avaliação da fertilidade bubalina

Em bubalinos, a realização de exames reprodutivos, como a avaliação dos ovários, é essencial para um manejo reprodutivo eficiente e bem sucedido. Dentro das diversas técnicas disponíveis para esta finalidade, a mais recomendada e eficaz é a abordagem por via transretal. Esta técnica envolve o uso de um transdutor linear, operando numa faixa de frequência de 5 a 8 MHz, que é introduzido via transretal, para obter imagens dos ovários (Vieira, 2019).

Ao estudarem a relevância da ultrassonografia ovariana para a avaliação da dinâmica

folicular e o manejo reprodutivo de búfalas, Brito et al, (2019), enfatizam que o exame ultrassonográfico, permite a visualização detalhada dos folículos ovarianos e a monitoração em tempo real do desenvolvimento folicular e da ovulação. Essa ferramenta é essencial para a detecção precisa do estro, a sincronização da ovulação e a implementação de estratégias de inseminação artificial, contribuindo significativamente para o sucesso das práticas de manejo reprodutivo, proporcionando informações valiosas que ajudam a otimizar os protocolos de IATF e a melhorar a eficiência reprodutiva.

A escolha da via transretal, juntamente com o transdutor linear de alta frequência, permite alcançar uma acurácia elevada nas avaliações, tornando possível determinar com precisão a presença de estruturas chave como o corpo lúteo (CL) e os folículos ovarianos com diâmetro igual ou superior a 4 mm (Ginther; Danguubiyam, 2019).

Notavelmente, folículos com diâmetro a partir de 2 mm já podem ser detectados na tela do ultrassom, o que demonstra a sensibilidade deste método diagnóstico. À medida que o ciclo reprodutivo avança, folículos dominantes pré-ovulatórios surgem e são facilmente identificados pela ultrassonografia. O reconhecimento desses folículos dominantes é crucial, pois indica a proximidade da ovulação, um fator vital para a sincronização da reprodução e para a maximização das taxas de sucesso na inseminação artificial (Ayres; Mingoti, 2012).

Júnior (2019) mostrou que búfalas em condições normais adquirem a capacidade de ovular em torno de 5 a 8 mm de diâmetro. Garcia et al, (2008) trabalharam com búfalas e mensuraram o diâmetro de cada estrutura ovariana duas vezes e a média das aferições foi usada como sendo sua medida. Os folículos ovarianos foram classificados de acordo com seu diâmetro em folículos pequenos (tamanho ≤ 5 mm), folículos médios (tamanho entre 5 mm e 8 mm) ou folículos grandes (tamanho ≥ 8 mm).

Além da ultrassonografia que detecta o momento ideal em que está ocorrendo o estro no animal e prediz a hora de se realizar a inseminação artificial, existe um hormônio que está sendo bastante estudado pela classe científica e que possui grande interesse na reprodução animal, devido ao seu potencial como biomarcador preditivo da reserva ovariana e da capacidade reprodutiva, hormônio esse conhecido com anti-mulleriano (AMH).

3.5 Hormônio anti-mulleriano – AMH

O hormônio anti-mulleriano (AMH), é um membro da superfamília do fator de crescimento transformante tipo β (TGF β). É produzido nas fêmeas pelas células da granulosa, e desempenha um papel na diferenciação sexual do feto em desenvolvimento e na inibição do

crescimento dos ductos de Muller, que são os precursores do sistema reprodutivo feminino. O seu papel é bloquear a formação inicial de folículos primários e a sensibilidade dos folículos antrais ao hormônio folículo-estimulante (FSH) (Gasparin et al., 2015).

Ele é expresso nos folículos em desenvolvimento até que eles atinjam o nível de diferenciação para que seja selecionado o folículo responsivo do FSH. Após a seleção do folículo dominante, a maioria dos demais folículos sofrem atresia, um processo de degeneração e involução dos folículos. Este ciclo se repete a cada ciclo estral em animais domésticos, ciclo menstrual em mulheres e também durante a utilização de métodos hormonais para a contracepção (Anderson; Nelson; Wallace., 2012; Penzias et al., 2020).

A reserva ovariana é a quantidade de folículos que restam após o processo de atresia. A influência do AMH na inibição da sensibilidade do FSH é crucial no processo de seleção. Os folículos com menor expressão de AMH são mais sensíveis ao FSH e têm uma maior probabilidade de serem selecionados. Isso indica que o AMH pode desempenhar um papel crucial tanto na regulação da quantidade de folículos em desenvolvimento quanto na sua escolha para a ovulação (Gasparin et al., 2015).

O AMH produzido pelos folículos ovarianos pré-antrais e antrais de pequeno diâmetro, desempenha um papel crucial na caracterização da funcionalidade ovariana e, conseqüentemente, no sucesso reprodutivo das fêmeas. Em suínas, o AMH também é produzido pelos corpos lúteos, o que é uma característica única da espécie. O AMH atua inibindo a sensibilidade do FSH e conseqüentemente inibindo o recrutamento precoce dos pequenos folículos antrais (Almeida et al., 2018). Isso porque em suínas, após a ovulação cessa-se o feedback negativo do estradiol sobre o FSH e os corpos lúteos, adquirem capacidade funcional adequada após o 8º dia do ciclo, de maneira que o feedback-negativo da progesterona sobre o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) demora a se estabelecer (Soede; Langendijk; Kemp., 2011).

A concentração circulante de AMH foi positivamente associadas ao número total de folículos ovarianos em caprinos (Monniaux et al., 2012), bubalinos (Liang et al., 2016) e em bovinos *Bos taurus* (Baldrighi et al., 2014) e *Bos indicus* (Batista et al., 2014).

Nos bovídeos, incluindo as búfalas, o AMH serve como um indicador para a avaliação da reserva folicular. Estudos indicam que os níveis de AMH no sangue estão diretamente relacionados ao número de folículos disponíveis nos ovários, permitindo aos especialistas em reprodução animal avaliar a capacidade reprodutiva de uma fêmea de forma não invasiva e com precisão. Essa característica torna o hormônio uma ferramenta valiosa na seleção de fêmeas para programas de reprodução, como a inseminação artificial (Rico et al., 2011).

Este hormônio também tem sido associado à resposta das búfalas aos protocolos de sincronização do ciclo reprodutivo. Fêmeas com níveis mais altos de AMH tendem a responder melhor a esses protocolos, contribuindo para uma melhor sincronização da ovulação e um aumento nas taxas de sucesso reprodutivo (Van Rooij et al., 2005). Este fato enfatiza a importância do hormônio anti-mulleriano como um fator preditivo não só da quantidade, mas também da qualidade da resposta ovariana, pois só irão responder ao protocolo de sincronização, animais que tiverem reserva ovariana, ou seja, a qualidade é um fator determinante (Umer et al., 2019).

Apesar dessa variação entre os animais, as concentrações plasmáticas de *AMH* apresentaram variações mínimas ao longo do ciclo estral. Estes estudos claramente demonstram que uma amostra de sangue coletada em dia aleatório do ciclo estral para mensuração plasmática de *AMH* é, possivelmente, um marcador fenotípico do número de folículos ovarianos (Ireland et al., 2008; Rico et al., 2011). Porém, a reserva ovariana diminui progressivamente conforme a idade do animal, dentro dos intervalos das concentrações plasmáticas de *AMH*. Baldrigh et al. (2014) demonstraram que a concentração plasmática de *AMH* tem alto grau de correlação com a contagem de folículos antrais ovarianos em bovinos e búfalos, fazendo um comparativo entre búfalos da raça Murrah, *bos taurus* e *bos indicus*.

3.5.1 Receptores do hormônio anti-mulleriano (AMH-R).

O hormônio anti-Mülleriano (AMH), também conhecido como fator inibidor mulleriano, pertence à superfamília do TGF- β (fator de crescimento transformador beta) e desempenha funções críticas no desenvolvimento reprodutivo e na regulação folicular em diversas espécies. Sua classificação em AMH tipo 1 e AMH tipo 2 está associada às diferentes variantes e isoformas de proteínas, com base na estrutura genética e nos contextos biológicos (Howard, Hart e Thompson, 2022).

O AMH tipo 1 está relacionado à atividade reguladora no desenvolvimento do sistema reprodutivo embrionário. Em mamíferos, é expresso durante o desenvolvimento fetal, principalmente pelos testículos, onde induz a regressão dos ductos de Muller nos machos. Sua expressão é predominantemente embrionária, sendo crucial para a diferenciação sexual masculina. Após o nascimento, a expressão do AMH tipo 1 diminui gradualmente. Sua função está associada à organogênese e ao desenvolvimento inicial dos órgãos reprodutivos (Broer et al., 2010).

O AMH tipo 2, são proteínas de membrana que desempenham um papel importante na mediação dos efeitos biológicos do AMH. Esse hormônio é importante para o desenvolvimento reprodutivo e a regulação da função ovariana em animais e em humanos e encontra-se presentes nas células da granulosa dos folículos ovarianos nas fêmeas (Di Clemente et al., 2021).

Tanto o receptor AMH tipo I (AMHR1) quanto o tipo II (AMHR2) dimerizam para iniciar a sinalização do AMH após a conexão do AMH ao complexo receptor. Estes receptores estão presentes nas células da granulosa e são mais abundantes em folículos pequenos (5–8 mm) em comparação com folículos grandes (13–24 mm). Isso sugere que os folículos mais novos produzam mais AMH em comparação com os folículos mais antigos (Poole; Ocon-Grove; Johnson, 2016).

Os receptores do tipo II do hormônio anti-mulleriano (AMHR2) tem como função a diferenciação sexual durante o desenvolvimento embrionário em fetos masculinos, sendo secretado pelas células de Sertoli nos testículos. Ao se ligar ao AMHR2 presente nos ductos de Muller, o hormônio induz a regressão desses ductos, impedindo a formação de estruturas femininas, como as tubas uterinas, o útero e a parte superior da vagina (Howard; Hart; Thompson., 2022). Já em fêmeas o AMHR2 é expresso nos folículos ovarianos, sendo um marcador confiável para avaliar a capacidade reprodutiva das fêmeas, devido sua associação direta com a população de folículos antrais presentes nos ovários (Esencan; Beroukhim; Seifer, 2022).

O AMH inibe a transição dos folículos primordiais para a fase de crescimento, ajudando a preservar a reserva de folículos, assim como, modula a sensibilidade dos folículos ao FSH, regulando o recrutamento dos folículos para o crescimento e ovulação (Thompson; Howard; Hart., 2022).

O gene AMHR2 é encarregado de sintetizar o receptor hormonal anti-mulleriano tipo 2, exercendo diversas funções relacionadas à reprodução. O hormônio anti-mulleriano (AMH), que atua como seu ligante, provoca a regressão do ducto mulleriano em machos, desempenha um papel na diferenciação e função das células de Leydig, além de regular a foliculogênese em fêmeas (Hart et al., 2021).

3.6 Polimorfismo do gene *AMH*.

O polimorfismo genético se refere à presença de duas ou mais variantes (alelos) de um gene em uma população, onde a frequência de cada variante é suficientemente alta para ser considerada como uma forma alternativa. Esses polimorfismos podem impactar características

fenotípicas, predisposição a enfermidades, resposta a tratamentos, entre outros fatores biológicos (Viana et al., 2024).

O estudo dos polimorfismos do *AMH* não apenas amplia o entendimento sobre a reserva folicular, mas também fornece ferramentas para a otimização dos programas de reprodução, melhorando a eficiência e os resultados reprodutivos em ruminantes e é fundamental para avanços na medicina reprodutiva e na gestão de rebanhos.

Em bubalinos, o gene do *AMH* está localizado no cromossomo 9 e em bovinos, no cromossomo 7. Pierucci et al. (2019) encontraram três mutações semelhantes no éxon 5 do *AMH*, no gado nelore (rs527023314, rs722016629 e rs134387246), podendo estar associado à ocorrência precoce de gestação e idade ao primeiro parto nessa raça. Porém, o gene do *AMH* ainda não foi caracterizado em muito animais domésticos, especificamente em grandes ruminantes.

O gene *AMH* está posicionado entre *SF3A2* (splicing factor 3A subunit 2) e *JSRP1* (juncional sarcoplasmic reticulum protein 1). A proteína AMH é codificada pelo gene *AMH* que se estende por mais de 2,75 Kbp e contém 5 éxons e 4 íntrons. As proteínas do AMH são mais conservadas no domínio C-terminal que no domínio N-terminal. É uma glicoproteína dimérica que consiste em duas subunidades idênticas ligadas por pontes de sulfeto e caracterizadas pelo dímero N-terminal (pró-região) e pelo dímero C-terminal (domínio TGF- β) (Gautam et al., 2021).

Ribeiro et al. (2014) descobriram que o AMH tem um impacto tanto na manutenção da prenhez quanto na fertilidade dos bovinos. E ao realizarem comparação de vacas com níveis hormonais de médios a altos com vacas de níveis baixos, foi demonstrado que a vacas com níveis baixos de AMH apresentaram menores taxas de prenhez e maior risco de perda gestacional entre 30 e 65 dias.

O polimorfismo do hormônio anti-mulleriano tem implicações significativas para a saúde reprodutiva, afetando tudo, desde o desenvolvimento sexual até a fertilidade. À medida que avançam na compreensão dessas variações genéticas, melhorar as abordagens diagnósticas e terapêuticas em medicina reprodutiva, conduzindo a resultados mais favoráveis em vacas afetadas por condições relacionadas ao *AMH* (Rigon et al., 2010).

Uma perspectiva adicional sobre como as variações genéticas no *AMH* afetam a saúde reprodutiva e como essas descobertas podem ser aplicadas para melhorar o manejo reprodutivo em búfalos e outros grandes ruminantes, em que os autores exploram as variações genéticas no gene *AMH* e suas implicações para o manejo reprodutivo em grandes ruminantes, discutindo como mutações e polimorfismos no gene *AMH* podem impactar a reserva ovariana e a resposta

a tratamentos reprodutivos, destacando, ainda, que essas variações genéticas podem influenciar não apenas a quantidade de folículos disponíveis, mas também a qualidade da resposta reprodutiva e a eficácia dos protocolos de sincronização e inseminação artificial. A identificação de tais polimorfismos pode levar a estratégias mais personalizadas para o manejo da fertilidade e a otimização dos resultados reprodutivos em grandes ruminantes (Vandermerwe et al., 2022).

A pesquisa contínua nesse campo promete não apenas expandir o entendimento sobre a medicina veterinária reprodutiva, mas também abrir novos caminhos para o tratamento personalizado de distúrbios da fertilidade, marcando um passo importante em direção ao avanço na pecuária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCB. Raças. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Disponível em: <<https://www.bufalo.com.br/racas/>> Acesso em: 15 de novembro 2021.
- ACOSTA, T. J. Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 1, p. 39-44, 2007.
- ALMEIDA, F. B. **Caracterização da perfusão sanguínea do folículo pré-ovulatório em protocolos de IATF**. 2019.
- ALMEIDA, F. R., COSTERMANS, N. G., SOEDE, N. M., BUNSCHOTEN, A., KEIJER, J., KEMP, B., & TEERDS, K. J. Presence of anti-Müllerian hormone (AMH) during follicular development in the porcine ovary. **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. e0197894, 2018.
- ALVES, M. T.; LIMA, J. R.; MARTINS, G. R. Estratégias de manejo reprodutivo e padronização da ciclicidade folicular em búfalos: Uso da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 49, n. 2, p. 145-157. 2020.
- ANDERSON RA, NELSON SM, WALLACE WH. Measuring anti-Müllerian hormone for the assessment of ovarian reserve: when and for whom is it indicated? **Maturitas**. 2012.
- AYRES, H.; MINGOTI, G. Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 36, n. 3, p. 174- 180, 2012.
- BALDRIGHI, J. D.; CASTRO, A. F.; MENDONÇA, R. F.; NASCIMENTO, J. M.; MORAES, S. R.; SANTOS, J. A. Polimorfismos do gene do hormônio anti-Mülleriano e suas implicações para a reserva ovariana e a fertilidade dos bovinos e búfalos. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, p. 76-85, 2014.
- BALDRIGHI, J. M., SÁ FILHO, M. F. D., BATISTA, E. D. O. S., LOPES, R. N. V. R., VISINTIN, J. A., BARUSELLI, P. S., e ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Anti-Mullerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. **Reproduction in domestic animals**, v. 49, n. 6, p. 1015-1020, 2014.
- BARBOSA, L. A. L. **Uma breve história sobre a IATF em bubalinos na Amazônia**. 2019.
- BARBOSA, R. S.; SILVA, A. R.; SOUZA, M. A. Características da atividade ovariana e folicular em búfalas durante diferentes estações do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 11, p. 1267-1276. 2016.
- BATISTA, E. O. S., MACEDO, G. G., SALA, R. V., ORTOLAN, M. D. D. V., SÁ FILHO, M. F. D., DEL VALLE, T. A., e BARUSELLI, P. S. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 3, p. 448-452, 2014.
- BORGHESE, A.; RASMUSSEN, M.; THOMAS, C. S. Milking management of dairy buffalo. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. sup2, p. 39-50, 2007.

BRITO, L. F.; SILVA, J. M.; ALMEIDA, M. M. Ultrassonografia ovariana como ferramenta para avaliação da dinâmica folicular e manejo reprodutivo em búfalas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 4, p. 201-212, 2019.

BROER, S. L., MOL, B., DOLLEMAN, M., FAUSER, B. C., & BROEKMANS, F. J. The role of anti-Müllerian hormone assessment in assisted reproductive technology outcome. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 22, n. 3, p. 193-201, 2010.

CAMPANILE, G., GASPARRINI, B., VECCHIO, D., NEGLIA, G., SENATORE, E. M., BELLA, A., e ZICARELLI, L. Pregnancy rates following AI with sexed semen in Mediterranean Italian buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 500-506, 2011.

CARVALHO, L. S.; ALMEIDA, M. F.; RODRIGUES, P. Q. Tecnologias emergentes na detecção do estro em búfalos: uma revisão. **Journal of Animal Reproduction**, v. 12, n. 2, p. 123-135, 2023.

CARVALHO, N. A. T.; BERNARDES, O.; BARUSELLI, P. S. Desestacionalização dos partos para a produção de leite de búfalas a pasto no centro sul do Brasil. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 8, p. 1-5, 2011.

DA COSTA, A. L.; MOREIRA, P.; VALENTIM, J. F. **Avaliação da adaptação, do comportamento produtivo e reprodutivo de bubalinos mestiços Murah x Mediterrâneo nas condições ambientais de terra firme de Rio Branco, Acre**. 1994.

DA SILVA, J. C. B., ALVES, M. B. R., BRIDI, A., BOHRER, R. C., ESCOBAR, G. S. L., DE CARVALHO, J. A. B. A., e PERECIN, F. Reproductive seasonality influences oocyte retrieval and embryonic competence but not uterine receptivity in buffaloes. **Theriogenology**, v. 170, p. 77-84, 2021.

DAS, P. K., ALI, S. Z., ISLAM, A. B. M. M., e ROY, B. K. A comparative study of productive and reproductive performance and estimates of heritability for economic traits in different genetic groups of cattle available at Baghabarighat milk pocket area of Bangladesh. **Online Journal of Biological Sciences**. 2023.

DI CLEMENTE, N., RACINE, C., PIERRE, A., & TAIEB, J. Anti-Müllerian hormone in female reproduction. **Endocrine reviews**, v. 42, n. 6, p. 753-782, 2021.

DIAS, M. M. **Polimorfismos em genes associados à puberdade e ocorrência de prenhez precoce em bovinos de corte**. 2016, 80 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2016.

ESENCAN, E., BEROUKHIM, G., & SEIFER, D. B. Age-related changes in Folliculogenesis and potential modifiers to improve fertility outcomes-A narrative review. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 20, n. 1, p. 156, 2022.

FERREIRA, J. M.; ALMEIDA, D. M.; FREITAS, S. R. Dinâmica folicular e atividade ovariana em búfalas: Implicações para o manejo reprodutivo. **Journal of Animal Reproduction**, v. 11, n.

3, p. 214-224. 2018.

GASPARIN, A. A., CHAKR RM, BRENOL CV, PALOMINOS PE, XAVIER RM, SOUZA L.. Hormônio anti-mülleriano como preditor de reserva ovariana em pacientes lúpicas: uma revisão. **Rev Bras Reumatol.** 55(4):363-7. 2015.

GASPARRINI, B., BOCCIA, L., MARCHANDISE, J., DI PALO, R., GEORGE, F., DONNAY, I., e ZICARELLI, L. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 275-287, 2006.

GAUTAM, D., VATS, A., PAL, P., HALDAR, A., e DE, S. Characterization of anti-Müllerian hormone (AMH) gene in buffaloes and goats. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 627094, 2021.

GINTHER, O. J.; DANGUDUBIYYAM, S. V. Effect of number of 6-mm predeviation follicles and intraovarian patterns on right-side ovulation in heifers. **Animal reproduction science**, v. 202, p. 73-79, 2019.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução animal.** 2004.

HART, K. N., STOCKER, W. A., NAGYKERY, N. G., WALTON, K. L., HARRISON, C. A., DONAHOE, P. K., & THOMPSON, T. B. Structure of AMH bound to AMHR2 provides insight into a unique signaling pair in the TGF- β family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 26, p. e2104809118, 2021.

HOWARD, JAMES A.; HART, KAITLIN N.; THOMPSON, THOMAS B. Molecular mechanisms of AMH signaling. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 927824, 2022.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Brasileiro de 2023.** Rio de Janeiro: IBGE, 2023.

IRELAND, J. L. H., SCHEETZ, D., JIMENEZ-KRASSEL, F., THEMME, A. P. N., WARD, F., LONERGAN, P., e IRELAND, J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1219-1225, 2008.

JANINI, L. C. Z., CIPRIANO, R. S., PRADO, L. L. A., DA SILVA RIBEIRO, Y. M., TOMTSKI, R., & DE OLIVEIRA BERNARDO, J. Effects of injectable progesterone in beef cows with different estrus scores before the start of the ftai protocol/efeitos da progesterona injetavel em vacas de corte com diferentes escores de cio antes do inicio do protocolo de iatf/efectos de la progesterona inyectable en vacas de carne con diferentes puntuaciones de estro antes del inicio del protocolo IATF. **Veterinaria e Zootecnia**, v. 29, p. S2-S2, 2022.

JUNIOR, L. D. P. M. **Dinâmica folicular, função luteal e momento da ovulação em protocolos de IATF em bubalinos (*bubalus bubalis*).** Orientador: Antonio de Lisboa Ribeiro Filho. 2019. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica 8º edição.** 1995.

LIANG, A., SALZANO, A., D'ESPOSITO, M., COMIN, A., MONTILLO, M., YANG, L., e GASPARRINI, B. Anti-Mullerian hormone (AMH) concentration in follicular fluid and mRNA expression of AMH receptor type II and LH receptor in granulosa cells as predictive markers of good buffalo (*Bubalus bubalis*) donors. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 963-970, 2016.

LIMA, A. C. Adaptation and management of buffalo herds in the Amazon region: Challenges and opportunities. *Journal of Tropical Agriculture*, Belém, v. 22, n. 1, p. 45-58, 2016.

LIMA, W. F. **Efeito do tamanho do folículo dominante e do uso de GnRH no momento da iatf na taxa de prenhez de búfalas criadas no Marajó**. Manuscrito não publicado. Orientador: Sebastião Tavares Rolim Filho. 2021. 34 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2021.

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.

MONDADORI, R. G., LUQUE, M. C. A., SANTIN, T. R., & BÁO, S. N. Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. **Animal reproduction science**, v. 97, n. 3-4, p. 323-333, 2007.

MONNIAUX, D., DROUILHET, L., RICO, C., ESTIENNE, A., JARRIER, P., TOUZÉ, J. L., e FABRE, S. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 1, p. 1-16, 2012.

NASCIMENTO, A. J. D. S. N., DE NARDI JUNIOR, G., DE OLIVEIRA, P. A., BARBOSA-FANTIN, B. R., e DANTAS, A. Bubalinocultura no Brasil: principais raças, características e importancia ao agronegócio. **Peer Review**, v. 5, n. 3, p. 19-30, 2023.

PENZIAS, A., AZZIZ, R., BENDIKSON, K., FALCONE, T., HANSEN, K., HILL, M., & YAUGER, B. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. **Fertility and sterility**, v. 114, n. 6, p. 1151-1157, 2020.

PIERUCCI, J. C., TONHATI, H., DE ALBUQUERQUE, L. G., CARDOSO, D. F., DOS SANTOS, D. J. D. A., FREITAS, A. C., e GIMENES, L. U. Amh Polymorphisms and their association with traits indicative of sexual precocity in Nelore heifers. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 4, p. 1489-1500, 2019.

PINTO, E. F., FONSECA, J. A. G., COELHO, A. S., MAIA, R. B. M., & VIANA, R. B. MANEJO NUTRICIONAL ADOTADO EM FAZENDAS DE CRIAÇÃO DE BÚFALOS NO BRASIL. **Revista Agroecossistemas**, v. 12, n. 2, p. 218-226, 2021.

POOLE, D. H., OCÓN-GROVE, O. M., & JOHNSON, A. L. Anti-Müllerian hormone (AMH) receptor type II expression and AMH activity in bovine granulosa cells. **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1353-1360, 2016.

RIBEIRO, E. S., BISINOTTO, R. S., LIMA, F. S., GRECO, L. F., MORRISON, A., KUMAR, A., e SANTOS, J. E. P. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p. 6888-6900, 2014.

- RICO, C., MÉDIGUE, C., FABRE, S., JARRIER, P., BONTOUX, M., CLÉMENT, F., e MONNIAUX, D. Regulation of anti-Müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. **Biology of reproduction**, v. 84, n. 3, p. 560-571, 2011.
- RIGON, C., ANDRISANI, A., FORZAN, M., D'ANTONA, D., BRUSON, A., COSMI, E., e CLEMENTI, M. Association study of AMH and AMHRII polymorphisms with unexplained infertility. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 4, p. 1244-1248, 2010.
- SAFARI, A., GHAVI HOSSEIN-ZADEH, N., SHADPARVAR, A. A., & ABDOLLAHI ARPANAHI, R. A review on breeding and genetic strategies in Iranian buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Tropical animal health and production**, v. 50, p. 707-714, 2018.
- SANTOS, P. L.; LIMA, M. S.; ALMEIDA, T. A. O ciclo estral em búfalas: características e manejo. **Animal Reproduction Science**, v. 215, p. 102-112. 2020.
- SILVA, G. C., e RIBEIRO, L. F. Os bubalinos no Brasil e a produção de leite. **Revista GeTeC**, v. 10, n. 27, 2021.
- SILVA, J. A. R. **Avaliação do estresse térmico em búfalas Murrah criadas em dois diferentes sistemas de manejo nas condições climáticas da Amazônia Oriental**. 2010.
- SOEDE, N. M.; LANGENDIJK, P.; KEMP, B. Reproductive cycles in pigs. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3-4, p. 251-258, 2011.
- TAVARES, M. F.; SILVA, R. S.; PEREIRA, J. A. Aplicação de tecnologias de monitoramento na detecção do estro de búfalos. **Journal of Veterinary Science and Technology**, v. 10, n. 6, p. 789-797. 2019.
- TEIXEIRA, M. V. V. M. **Búfalo (*Bubalus bubalis*): pontos que destacam a importância da espécie como animal de produção**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. Brasil.
- THOMPSON, THOMAS B.; HOWARD, JAMES A.; HART, KAITLIN N. Molecular mechanisms of AMH signaling. **Frontiers in Endocrinology**, Cincinnati, v. 13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.927824>. Acesso em: 22 nov. 2024.
- UMER, S., ZHAO, S. J., SAMMAD, A., WELDEGEBRIALL SAHLU, B., PANG, Y., & ZHU, H. AMH: could it be used as a biomarker for fertility and superovulation in domestic animals. **Genes**, v. 10, n. 12, p. 1009, 2019.
- VALE, W. G.; WEITZE, K. F.; GRUNERT, E. Estrous behaviour and ovarian function in water buffalo cows (*Bubalus bubalis* Lin.) under Amazon conditions. **In: International Congress on Animal Reproduction and AI, 10, 1984. Urbana, IL. Proceedings Urbana, IL: ICAR.** v.2, p.154-156. 1984.
- VALE, W.G.; RIBEIRO, H.F.L.; SILVA, A.O.A.; SOUSA, J.S.; OHASHI, O.M.; SOUZA, H.E.M. Buffalo a non-seasonal breeder in the Amazon Valley, Brazil. **Proc. 13th Int. Cong. Anim. Reprod.** V. 3, p. 19-33, 1996.
- VAN ROOIJ, I. A., BROEKMANS, F. J., SCHEFFER, G. J., LOOMAN, C. W., HABBEMA,

J. D. F., DE JONG, F. H., e TE VELDE, E. R. Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. **Fertility and sterility**, v. 83, n. 4, p. 979-987, 2005.

VIANA, C. A., MARIANO FILHO, F., DE OLIVEIRA, G. F., & GARCIA, G. M. ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO NA TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA E IMPACTO NAS DOENÇAS AUTOIMUNES: REVISÃO DE LITERATURA. **REVISTA FOCO**, v. 17, n. 7 Edição Especial, p. e5546-e5546, 2024.

VIEIRA, A. V. J. Ultrassonografia modo doppler na reprodução de vacas de corte. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2019.

WARMLING, L. M. **Biotécnicas Reprodutivas usadas em Bubalinos no Brasil**. (TCC) **Trabalho de Conclusão de Curso, Curso: Zootecnia** (UFSC), Florianópolis, SC. 2018, 53 p.

WEILLER, J. H. A. **Uso do cipionato de estradiol na indução da ovulação de búfalas criadas em várzea da região de Itacoatiara, Amazonas**. 2020.

YOUNG, J. M.; MCNEILLY, A. S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. **Reproduction**, v. 140, n. 4, p. 489, 2010.

ZICARELLI, F.; CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B.; DI, P.; ZICARELLI, L. Influenza Del periodo e dello spazio sulla produzione lattea e sul consumo di sostanza secca nella bufala mediterrânea italiana *In: Proc. 3rd Nat. Congr. Buffalo management, Paestum, Italy*. p. 75-76, 2005.

4. ARTIGO – De acordo com as normas da revista Iraqi Journal of Veterinary Sciences (IJVS)

4.1 Avaliação do gene do hormônio anti-mulleriano (*AMH*) em fêmeas bubalinas submetidas à sincronização de cio, na Amazônia.

RESUMO

O manejo reprodutivo em búfalos é essencial para a produtividade do setor agrícola brasileiro, principalmente na região amazônica. O hormônio anti-mulleriano (AMH) é uma glicoproteína que pertence à superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Sua estrutura é formada por duas subunidades idênticas ligadas por pontes de sulfeto, sendo caracterizada por uma pró-região N-terminal e a região C-terminal (domínio TGF- β). O gene *AMH*, responsável pela codificação dessa proteína, é composto por cinco éxons e quatro íntrons. Uma parte do éxon 5 compõe o AMH N-terminal e a parte do domínio TGF- β está localizada na parte final mesmo, sendo então, considerado a maior parte. Na espécie bubalina, esse gene está localizado no cromossomo 9, desempenhando um papel fundamental na regulação da foliculogênese. É considerado um marcador significativo da reserva ovariana, e compreender a relação entre genótipos e fertilidade é importante para a produção pecuária sustentável. O presente estudo visa analisar polimorfismos no gene *AMH* e sua correlação com a eficiência reprodutiva das fêmeas. Foram analisadas 54 búfalas da raça Murrah, múltiparas, submetidas a sincronização hormonal aplicada a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em uma propriedade no município de Bujaru – PA. Todas as fêmeas estavam inicialmente não gestantes, sendo a classificação entre gestantes e não gestantes realizada após a sincronização do cio e o diagnóstico de gestação. No dia 11 do protocolo de sincronização, foram realizadas as coletas de sangue e as avaliações ultrassonográficas. Foi realizada a extração do DNA e posteriormente a amplificação do gene *AMH* por reação de cadeia da polimerase (PCR). Os produtos da PCR foram purificados e encaminhados para sequenciamento. Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística utilizando o software SAS, considerando um nível de significância de 0,05. Métodos ANOVA foram empregados para comparar as médias das variáveis reprodutivas. Os resultados mostraram ausência de polimorfismos no éxon 5 do gene *AMH* em búfalas. observou-se uma diferença significativa na contagem de folículos antrais (AFP) entre as búfalas gestantes e não gestantes ($p = 0,02$). No entanto, as variáveis relacionadas ao volume ovariano (V) e ao folículo dominante (FD) não mostraram diferenças significativas, indicando que esses fatores podem ter um papel menos evidente no âmbito reprodutivo. Os achados presentes no estudo, sugerem conservação do gene *AMH* e a importância dos folículos antrais como preditores da eficiência reprodutiva em búfalas. Os resultados do presente estudo demonstram a importância da realização de estudos futuros de outras regiões do gene *AMH* que podem vir a influenciar a fertilidade, visando o aprimoramento das práticas de manejo e reprodução assistida no rebanho bubalino, na região Amazônica.

Palavras chave: *AMH*; Bubalinos; Fertilidade; Polimorfismo.

ABSTRACT

Reproductive management in buffaloes is essential for the productivity of the Brazilian agricultural sector, especially in the Amazon region. Anti-mullerian hormone (AMH) is a glycoprotein belonging to the transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily. Its structure consists of two identical subunits linked by disulfide bridges, characterized by an N-terminal pro-region and a C-terminal region (TGF- β domain). The *AMH* gene, responsible for

encoding this protein, is composed of five exons and four introns. Part of exon 5 constitutes the N-terminal AMH, while the TGF- β domain is located at the very end, making up the majority of the gene. In the buffalo species, this gene is located on chromosome 9, playing a fundamental role in the regulation of folliculogenesis. It is considered a significant marker of ovarian reserve, and understanding the relationship between genotypes and fertility is important for sustainable livestock production. The present study aims to analyze polymorphisms in the *AMH* gene and their correlation with female reproductive efficiency. A total of 54 multiparous Murrah buffaloes were analyzed, all of which underwent hormonal synchronization applied to fixed-time artificial insemination (FTAI) on a farm in the municipality of Bujaru, Pará (PA). All females were initially non-pregnant, and classification into pregnant and non-pregnant groups was carried out after estrus synchronization and pregnancy diagnosis. On day 11 of the synchronization protocol, blood samples were collected, and ultrasonographic evaluations were performed. DNA extraction was conducted, followed by the amplification of the *AMH* gene using polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were purified and sent for sequencing. The results were subjected to statistical analysis using SAS software, considering a significance level of 0.05. ANOVA methods were employed to compare the means of reproductive variables. The results showed an absence of polymorphisms in exon 5 of the *AMH* gene in buffaloes. A significant difference was observed in antral follicle count (AFC) between pregnant and non-pregnant buffaloes ($p = 0.02$). However, variables related to ovarian volume (V) and dominant follicle (DF) did not show significant differences, indicating that these factors may play a less evident role in reproduction. The findings of this study suggest conservation of the *AMH* gene and highlight the importance of antral follicles as predictors of reproductive efficiency in buffaloes. The results also demonstrate the importance of future studies on other regions of the *AMH* gene that may influence fertility, aiming to improve management practices and assisted reproduction in buffalo herds in the Amazon region.

Keywords: *AMH*; Buffaloes; Fertility; Polymorphism.

4.2 Introdução

A pecuária de búfalos desempenha um papel crucial na economia brasileira, especialmente no norte do país, onde as condições naturais da Amazônia favorecem essa atividade (1). No Pará, a criação de búfalos é uma atividade econômica significativa, e o entendimento dos fatores genéticos que influenciam a fertilidade desses animais é essencial para aprimorar a eficácia reprodutiva e produtiva. Esta eficácia pode ser alcançada através das técnicas empregadas no melhoramento genético animal, que possibilitam aos animais explorarem seu potencial genético e passarem essas características relevantes para as gerações futuras por meio de marcadores moleculares (2).

Os marcadores moleculares são ferramentas essenciais no melhoramento genético, permitindo identificar genes associados a características de interesse econômico e selecionar indivíduos com maior produtividade. Essa abordagem possibilita prever o desempenho dos animais em diferentes condições de manejo, otimizando a eficiência reprodutiva. Em sistemas de produção de leite e carne, essa melhoria impacta diretamente a viabilidade econômica, reduzindo intervalos entre partos, aumentando a taxa de natalidade e garantindo maior retorno financeiro ao produtor (3).

A fertilidade das fêmeas está diretamente relacionada às características foliculares, como tamanho, quantidade e capacidade de crescimento, que determinam a viabilidade dos oócitos. Nesse contexto, o hormônio anti-mulleriano (AMH) atua como um biomarcador da reserva ovariana, influenciando significativamente a dinâmica folicular e a fertilidade (4). O

AMH regula o crescimento folicular precoce e evita a perda excessiva da reserva folicular, equilibrando a inibição e o desenvolvimento dos folículos. Além disso, desempenha um papel fundamental na reprodução, sendo associado a diversas enfermidades reprodutivas e até mesmo à infertilidade em diferentes espécies de animais domésticos (5)

O hormônio anti-mulleriano (AMH) é uma glicoproteína, composta por 575 de aminoácidos e pertencente à superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Sua estrutura é formada por duas subunidades idênticas ligadas por pontes de sulfeto, sendo caracterizada por uma pró-região N-terminal e a região C-terminal (domínio TGF- β). O gene *AMH*, responsável pela codificação dessa proteína, é composto por cinco éxons e quatro íntrons de comprimento variável com 72% de conteúdo GC entre éxons e íntrons. O quinto éxon compreende 800–900 pb, tornando-o o maior. Uma parte do éxon 5 compõe o AMH N-terminal e a parte do domínio TGF- β está localizada na parte final mesmo, sendo então, considerado a maior parte, seguido pelos éxons 1, 4, 2 e 3 (5).

O éxon 5 do gene *AMH* é altamente conservado em bubalinos, localizado no cromossomo 9. O gene *AMH* está situado entre os genes *SF3A2* (subunidade 2 do fator de splicing 3A) e *JSRP1* (proteína 1 do retículo sarcoplasmático são as proteínas em questão junção). A sequência dos genes *SF3A2*, *AMH* e *JSRP1* é extremamente importante em bubalinos, desempenhando um papel fundamental na regulação da foliculogênese e na determinação da reserva ovariana (5). Estudos anteriores, como o de Pierucci et al. (2019) (4), demonstraram a relação entre essa região e características reprodutivas em novilhas Nelore, evidenciando sua potencial influência sobre a eficiência reprodutiva, porém mesmo sendo em uma região conservada em bovinos, não apresentou alteração na proteína do gene.

Polimorfismos do gene *AMH* podem justificar a ocorrência de variações na genética de um rebanho, podendo resultar em alterações nas ações biológicas do hormônio, afetando a fertilidade e manutenção de prenhez em animais. Portanto, a biologia molecular poderá auxiliar os programas de melhoramento genético, de forma a promover maior retorno econômico para a atividade pecuária (4). A identificação de polimorfismos no gene do *AMH* e sua associação com características ovarianas são cruciais para aprimorar a predição da fertilidade em búfalas (5). Gautam et al. (2021) (5) encontraram três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no éxon 5 do gene *AMH* (rs527023314, rs722016629 e rs134387246) em novilhas da raça nelore, todos caracterizados como mutações sinônimas. Apenas o SNP rs134387246 apresentou associação significativa ($P \leq 0,10$) com a ocorrência de prenhez precoce e a idade ao primeiro parto. O estudo revelou um efeito de sobredominância para este SNP ($P = 0,056$), sem efeito aditivo observado ($P = 0,67$), sendo este o primeiro estudo a descrever SNPs do gene *AMH* em novilhas Nelore e a associá-los com características de precocidade sexual. Porém em búfalos, ainda não foi realizado um estudo para detecção de SNP na mesma região.

O estudo tem o potencial de conectar a genética à prática de manejo da fertilidade em búfalas, proporcionando uma visão mais detalhada para identificar animais geneticamente que terão melhores reservas ovarianas para seleção animal mais eficiente. Com isso, objetivou-se investigar a presença de SNP do *AMH* na região do éxon 5, prospectando suas associações a expressão ovariana e folicular em búfalas.

4.3 Material e métodos

4.3.1 Ética, animais coletados e local da coleta

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 da Universidade Federal Rural da Amazônia (CEUA/UFRA) com parecer de permissão N° 3842280324 (ID 000676) (Anexo I).

No presente estudo foi utilizado um total de 54 búfalas multípara, não gestantes, da raça Murrah, de uma propriedade localizada no município de Bujaru - Pará (1°37'40''S, 48°13'21''W), sob as mesmas condições alimentares e hídricas. As fêmeas foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Após o protocolo, foi realizado o diagnóstico de gestação, e os animais foram divididos em dois grupos: gestantes e não gestantes.

4.3.2 Protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF), em búfalas

Todas foram submetidas ao mesmo protocolo de sincronização de estro por 12 dias (9). O protocolo consistiu na aplicação intramuscular (IM) de 2,0mg de benzoato de estradiol (BE) pela via intramuscular (IM), juntamente com um dispositivo intravaginal de 0,5g de P4 em um dia aleatório, sendo este dia, denominado de D0 do protocolo. Nove dias após o início do protocolo, denominando de D9 foi realizada a retirada do implante de P4 e aplicação IM de 300UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 0,5mg de prostaglandina F2 α (PGF2 α) também IM. No D11 foi aplicado via IM 25 μ g de GnRH. As aplicações dos dias 0, 9 e 11 foram realizados sempre às 15:00 horas enquanto a do D12, dia no qual foi realizada a inseminação artificial, às 7:00 horas (Figura 1).

4.3.3 Coleta de sangue

As búfalas foram submetidas à coleta de 5 ml de tecido sanguíneo em tubos contendo anticoagulante (EDTA), através da punção da veia caudal no dia onze (D11) do protocolo de sincronização da ovulação para IATF (Figura 1). Após a coleta, as amostras foram armazenadas a temperatura de 4° C até o processamento de extração de DNA que foi realizado no Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular na Universidade Federal Rural da Amazônia, campus Belém -Pará.

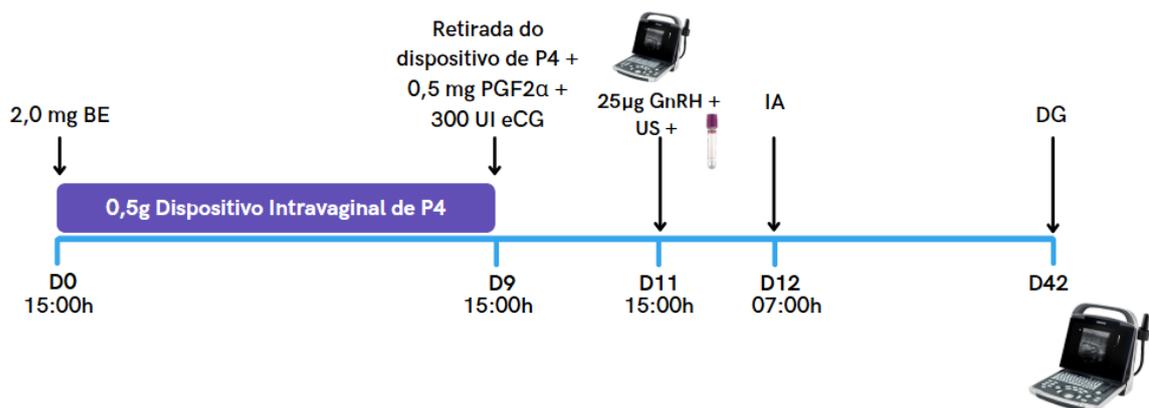


Figura 1- Protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF), do dia 0, início do protocolo (D0) com aplicação de 2,0 mg benzoato de estradiol (BE) e implantação do dispositivo intravaginal de progesterona (P4) às 15:00h; dia 9 (D9) retirada do dispositivo intravaginal + aplicação de 0,5mg de prostaglandina 2 α (PGF2) + 300UI de conadotrofina coriônica equina (eCG) às 15:00h; no dia 11 (D11) aplicação de 25 μ g de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) + passagem do ultrassom + coleta de sangue às 15:00h; dia 12 (D12) inseminação artificial (IA) às 07:00h e diagnóstico gestacional (DG) no (D42), com 30 dias após a IA.

4.3.4 Avaliação morfológica do ovário

Foram mensurados os ovários direito e esquerdo das 54 búfalas por ultrassonografia no modo-B (ultrassom veterinário DP-10 Vet Power, Mindray), no dia 11 do protocolo de sincronização de ovulação para IATF, sendo considerados como população de folículos ovulatórios (FPO) com diâmetros a partir de >8mm. Os dados como diâmetro, volume e número de folículos foram coletados e as imagens foram salvas para análises.

4.3.5 Avaliação de polimorfismo

4.3.5.1 Extração de DNA

A extração do DNA total foi realizada por meio do método do Fenolclorofórmio desenvolvido por Sambrook, Fritsch e Maniatis. (1989) (6).

A qualidade e pureza das amostras foram visualizados em eletroforese horizontal em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1X (TRIS 400 mM, Ácido Acético 1% e EDTA 20 mM), corado com *GelRed* (Biotium – Califórnia/USA), corrente 90V/90mA por 20 minutos. A visualização ocorreu por meio do transiluminador de luz ultravioleta M-20 (UVP).

4.3.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da amplificação do gene *AMH*

Para a investigação de polimorfismos pontuais em búfalas foi selecionada a região do éxon 5 do gene *AMH*. Para isso, foi utilizado um par de *primers*, desenhados através do *Primer3Plus* baseado na sequência de referência depositada no *Genbank* (ID: 102405218) que possui fragmento de 480 pares de bases (pb) (Tabela 1).

Tabela 1 - Gene do hormônio anti-mulleriano (*AMH*) e seu respectivo par de *primer* desenhado para investigação de SNPs em búfalas.

Gene	GenBank	Primer (5' - 3')	Tamanho (pb)
<i>AMH</i>	102405218	F: CGC TGC TGC TGC TCA AAG R: TTT ATT GGG GCA ATG ACG	480

pb: pares de bases

As reações seguiram as seguintes condições de temperatura e tempo: Desnaturação inicial 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60,0° C por 40 segundos, 72°C por 45 segundos e temperatura de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos finais dos PCRs foram visualizados em eletroforese horizontal em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1X (TRIS 400 mM, Ácido Acético 1% e EDTA 20 mM), corado com *GelRed* (Biotium – Califórnia/USA), corrente 90V/90mA por 60 minutos. Uma escala molecular de 100 pb (*Ladder*) foi utilizada como referência para o produto gerado no PCR. A visualização ocorreu por meio do transiluminador de luz ultravioleta M-20 (UVP).

4.3.5.3 Purificação e sequenciamento do produto da PCR

As purificações dos produtos das PCRs, foram realizadas com o kit de purificação de DNA em banda de gel de agarose (Ludwig Biotech LTDA, Alvora, RS, BR), seguindo as

recomendações do fabricante. Os produtos das purificações foram submetidos ao sequenciamento pelo método de Sanger utilizando o kit BigDye (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante e corridas no sequenciador de DNA ABI3500XL (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). As sequências foram editadas e alinhadas nos programas Finch Tv versão 1.4.0 e BioEdit 7.2, respectivamente.

4.4 Análises estatísticas

Para análise de população folicular, diâmetro dos folículos maiores (Folículo dominante) e associações à taxa de prenhez foram estabelecidas as médias e submetidas ao método ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o software *PROC MIXED* do pacote estatístico do SAS (OnDemand) com nível de significância de 0,05.

4.5 Resultados

A imagem do exame ultrassonográfico do ovário de búfala (Figura 2 e 3), exhibe medições de um folículos antral, identificado com medições entre as distâncias "Dist1", "Dist2" e "Dist3", com diâmetros de 16mm, 18,7 mm e 21,4 mm, respectivamente. O volume total ovariano foi calculado em 3,36 cm³. Essa informação é usada para caracterizar o volume ovariano, auxiliando na análise de parâmetros reprodutivos.



Figura 2 – Imagem do exame ultrassonográfico do ovário de búfala e medição do volume ovariano, realizado com aparelho Mindray DP-10Vet, durante a avaliação de parâmetros reprodutivos.



Figura 3 – Imagem do exame ultrassonográfico do ovário de búfala e contagem de população de folículos antrais (AFP), realizado com aparelho Mindray DP-10Vet, durante a avaliação de parâmetros reprodutivos.

Com base no sequenciamento realizado no presente estudo, não foi possível detectar presença de mutações de nucleotídeo único (SNPs) na região do éxon 5 do gene *AMH* nas búfalas.

As análises de estatística descritiva realizadas revelaram diferenças nos parâmetros reprodutivos entre os grupos de búfalas gestantes (G) e não gestantes (NG). A população de folículos antrais (AFP) apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,02$), com as búfalas não gestantes apresentando valores médios superiores ($9,14 \pm 4,01$) em comparação às gestantes ($7,60 \pm 2,72$).

O volume ovariano (V) foi maior no grupo de não gestantes ($3,60 \pm 1,46$) em relação às gestantes ($2,92 \pm 1,63$), não havendo diferença estatística entre os grupos ($p = 0,08$). Já o tamanho do folículo dominante (FD) apresentou valores médios similares entre os dois grupos, sendo no grupo G ($1,41 \pm 0,38$) e no grupo NG ($1,31 \pm 0,33$), sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,34$).

As estatísticas descritivas e estimativas dos parâmetros reprodutivos para população de folículos antrais (AFP), volume ovariano (V) e folículo dominante (FD), estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2- Avaliação da população de folículos antrais (AFP), volume ovariano (V) e folículo dominante (FD) em vacas búfalas gestantes (G) e não gestantes (NG), após o protocolo de sincronização de cio para inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

Gupo	AFP	V	FD
G	7.60 ± 2.72^a	2.92 ± 1.63	1.41 ± 0.38
NG	9.14 ± 4.01^b	3.60 ± 1.46	1.31 ± 0.33
P-valor	0.02*	0.08	0.34

*valor de significância <0.05

Letras diferentes indicam diferença estatística

4.6 Discussão.

Os resultados apresentados indicam diferenças significativas na população folicular antral (AFP), analisadas entre os grupos gestantes (G) e não gestante (NG). A AFP ($P=0,02$) apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, sugerindo que pode haver uma associação importante com o status reprodutivo ou fisiológico dos animais. Estudos em mamíferos, como bovinos, mostram que o hormônio AMH tem uma relação direta com o número de folículos antrais e a reserva ovariana, sendo um marcador biológico amplamente utilizado para prever a fertilidade (7).

Estudos encontraram relação inversa entre AFP e fertilidade, assim como o presente estudo em búfalas. Morotti et al. (2018) (8), coletaram dados de 834 vacas nelore e descobriram que os animais com uma AFP menor (<15 folículos) tiveram maior prenhez por inseminação artificial em tempo fixo (IATF), do que vacas com AFP intermediária (20–40 folículos) ou alta (>45 folículos) após a reprodução com um protocolo IATF (9). Outro estudo em vacas Nelore obteve resultados semelhantes quando as vacas foram classificadas como AFP baixa (<10 folículos), intermediária (11–29 folículos) ou alta (>30 folículos). Após a IATF, animais com baixo AFP tiveram a maior prenhez em comparação com vacas com AFP intermediário ou alto (10).

Os estudos mencionados anteriormente não levaram em conta um conjunto adicional de fatores que possuem uma conexão genética em relação a AFP. Uma pesquisa realizada em bovinos Nelores identificou diversos genes potenciais que influenciam a variação fenotípica do AFP, desempenhando funções no desenvolvimento folicular, esteroidogênese e ovulação associados aos níveis de hormônio AMH após sincronização de estro (11). Porém, no presente estudo, não foi possível relacionar a AFP com a concentração de AMH, fator este, que pode ser explorado em estudos futuros.

Em relação ao folículo dominante (FD), os resultados não mostraram diferenças significativas entre os grupos gestantes e não gestantes ($P = 0,34$). Estudos indicam que, embora o tamanho do folículo dominante possa variar dentro de um ciclo estral, a diferença em gestantes tende a ser menos expressiva devido à inibição das gonadotrofinas pela progesterona durante a gestação. Além disso, fatores genéticos e ambientais podem modular o tamanho do folículo dominante, sugerindo que sua relação com a fertilidade deve ser associada em conjunto com outros parâmetros, como a qualidade oocitária e os níveis de AMH (5).

Os achados reforçam a importância de considerar múltiplos fatores na avaliação da fertilidade de búfalas, especialmente a integração entre variáveis morfológicas (AFP, V, FD) e fatores endócrinos. A literatura recente também destaca que o AMH é um marcador biológico relevante para estimar a capacidade ovariana e prever respostas a protocolos reprodutivos, enquanto o FD e o V podem variar mais amplamente devido a fatores ambientais e fisiológicos (12). Dessa forma, estudos adicionais são necessários para investigar como essas variáveis interagem e como podem ser otimizadas para melhorar a eficiência reprodutiva em sistemas de produção bubalina.

A ausência de SNPs no éxon 5 do gene *AMH* em búfalos, no presente estudo, pode ser justificada pelo fato de que essa região codifica uma parte conservada da proteína, essencial para sua função biológica. Alterações nessa região poderiam comprometer a funcionalidade do AMH, provocando seleção que venha ser negativa no rebanho, sendo maior a conservação em torno da espécie bubalina. Além disso, regiões promotoras e regulatórias, que controlam a expressão gênica, são mais propensas a apresentar variações que influenciam a quantidade de proteína produzida, sem alterar sua estrutura primária (5).

No entanto, pesquisas em bovinos, têm identificado variações genéticas associadas a características reprodutivas. Por exemplo, em novilhas Nelore, foram investigados SNPs no gene *AMH* na região do éxon 5 e sua associação com características indicativas de precocidade

sexual. Os resultados sugerem que variações nesse gene podem influenciar a idade ao primeiro estro e ao primeiro parto, indicando uma possível relação com a eficiência reprodutiva. Um total de três SNPs sinônimos foram identificados, todos eles localizados no éxon 5 (rs527023314, rs722016629 e rs134387246), este último posicionado no códon de parada (4).

Em búfalos e cabras, a caracterização do gene *AMH* revelou que a sequência C-terminal é conservada, em comparação com a região N-terminal do éxon 5. A análise comparativa entre as espécies de mamíferos, sugere que variações nesse gene podem ter implicações na função reprodutiva, sendo encontrada um polimorfismo em ambas as espécies no éxon 4 (5). Ramesha et al. (2022) (13) observaram uma relação altamente significativa entre parto e concentração de AMH em gado bovino Amrit mahal *bos indicus*, os quais identificaram um SNP localizado no éxon 5 (rs21402788). As regiões promotoras do gene têm sido alvo de estudos recentes por apresentarem maior variabilidade e potencial para modular a expressão do AMH em resposta a fatores fisiológicos e ambientais. Com isso, investigar essas regiões pode fornecer dados sobre a regulação genética da reprodução.

A ausência de SNPs no gene do *AMH* em búfalas observada neste estudo vai contra os achados do trabalho de Santos et al. (2024) (14), que identificaram polimorfismo em outro gene ao avaliar a mesma população de animais. No estudo, foi encontrado um polimorfismo no gene do interferon-gama (**IFN- γ**) localizado em sua região 3' UTR na posição g 4467 G>A, este se mostrou associado à resposta imunológica, incluindo a expressão diferencial do miRNA 125b em búfalas assintomáticas infectadas por *Trypanosoma vivax*. A presença ou ausência de SNPs também está relacionada a região na qual foram realizadas as investigações, visto que, regiões promotoras e não traduzidas (UTRs) são mais propensas a variações no DNA quando comparadas a regiões de codificação como os éxons. Além disso, essa diferença pode refletir a função biológica distinta dos genes avaliados, uma vez que o gene **IFN- γ** desempenha um papel direto na modulação da imunidade, enquanto o gene do *AMH* está relacionado à função reprodutiva.

Além disso, a contagem de folículos antrais tem sido reconhecida como um marcador indireto da reserva ovariana e da funcionalidade ovariana em bovinos e bubalinos. Entretanto, deve-se considerar que fatores como manejo nutricional, ambiente e genética também podem influenciar significativamente a população de folículos antrais e sua relação com a fertilidade. A combinação de estudos reforça a importância de se investigar não apenas o número de folículos, mas também a qualidade dos mesmos e seu impacto na eficiência reprodutiva de ruminantes (12).

4.7 Conclusão

A presença da população folicular antral em gestantes e não gestantes foi significativo na população estudada, confirmando a associação entre eles e a eficiência reprodutiva. Enquanto as outras variáveis de volume ovariano e folículo dominante não demonstraram diferenças significativas, sugerindo menor impacto na reprodução dessa população. O estudo também destaca a importância de investigar outras regiões do gene *AMH*, como a região promotora e regiões não traduzidas em busca de novos polimorfismos que estejam associados a reprodução animal. Com isso, esses achados são fundamentais para a reprodução em búfalas na região Amazônica, podendo auxiliar no desenvolvimento de outros estudos voltados a reprodução.

Conflito de interesse.

Os autores declaram não haver conflitos de interesse relacionados a este manuscrito.

Referências.

- 1- Bastianello VC. Cadeia produtiva da carne de búfalo no Brasil. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Curso de Zootecnia, Porto Alegre, 46 p. 2024. Doi: hdl.handle.net/10183/277013.
- 2- Silva GC, Ribeiro LF. Os Bubalinos no Brasil e a Produção de Leite. *Revista GeTeC*. 2021;10(27). Doi: www.revistas.fucamp.edu.br/index.php/getec/article/view/2379.
- 3- Manzoor S, Nadeem A, Javed M. Polymorphism association and expression analysis of alpha-lactalbumin (LALBA) gene during lactation in Nili Ravi buffalo. *Trop Anim Health Prod*. 2019. Doi: [10.1007/s11250-019-02010-0](https://doi.org/10.1007/s11250-019-02010-0).
- 4- Pierucci JC, Tonhati H, de Albuquerque LG, Cardoso DF, dos Santos DJDA, Freitas AC, Gimenes LU. Amh Polymorphisms and their association with traits indicate sexual precocity in Nelore heifers. *Semina: Ciências Agrárias*. 2019;40(4):1489-1500. Doi: [10.5433/1679-0359.2019v40n4p1489](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n4p1489).
- 5- Gautam D, Vats A, Pal P, Haldar A, De S. Characterization of anti-mullerian hormone (AMH) gene in buffaloes and goats. *Front Vet Sci*. 2021;8:627094. Doi: [10.3389/fvets.2021.627094](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.627094).
- 6- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Doi: [10.5555/19901616061](https://doi.org/10.5555/19901616061).
- 7- Rico C, Fabre S, Médigue C, Clemente ND, Clément F, Bontoux M, Monniaux D. Anti-Mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol Reprod*. 2009;80(1):50-59. Doi: [10.1095/biolreprod.108.072157](https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072157).
- 8- Morotti F, Moretti R, dos Santos GMG, Silva-Santos KC, Cerqueira PHR, Seneda MM. Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. *Anim Reprod Sci*. 2018;188:170-177. Doi: [10.1016/j.anireprosci.2017.12.001](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.001).
- 9- Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Knight PG, Ireland JJ. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod*. 2005;73(1):54-62. Doi: [10.1095/biolreprod.104.036277](https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277).
- 10- De Moraes FLZ, Morotti F, Costa CB, Lunardelli PA, Seneda MM. Relationships between antral follicle count, body condition, and pregnancy rates after timed-AI in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2019;136:10-14. Doi: [10.1016/j.theriogenology.2019.06.024](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.024).
- 11- Grigoletto L, Santana MHA, Bressan FF, Eler JP, Nogueira MFG, Kadarmideen HN, Brito LF. Genetic parameters and genome-wide association studies for anti-mullerian hormone levels and antral follicle populations measured after estrus synchronization in Nelore cattle. *Animals*. 2020;10(7):1185. Doi: [10.3390/ani10071185](https://doi.org/10.3390/ani10071185).
- 12- Jazmín GAA, Gustavo MD, Dominguez AS, Alejandro PHR, Cedillo RS, Diana ZÁ, Uziel CV. Anti-Müllerian hormone and its utility in cattle reproduction. *Open J Vet Med*. 2023;13(1):1-11. Doi: [10.4236/ojvm.2023.131001](https://doi.org/10.4236/ojvm.2023.131001).
- 13- Ramesha KP, Jeyakumar S, Mall S, Vedamurthy GV, Kumaresan A, Devadashan MJ, Manimaran A. Anti-mullerian hormone as an endocrine biomarker of reproductive longevity and assessment of single nucleotide polymorphisms in AMH gene of *Bos indicus* breeds of cattle. *Reprod Domest Anim*. 2022;57(11):1450-1464. Doi: [10.1111/rda.14222](https://doi.org/10.1111/rda.14222).

- 14- Santos CLP, Barra ECM, Paredes LJA, Barbosa EM, Casseb AR, Silva CS, Silva Filho E. Hemoparasites effect on interferon-gamma and miRNA 125b expression in *Bubalus bubalis*. *Iraqi J Vet Sci*. 2024;38(1):71-76. Doi: 10.33899/IJVS.2023.140402.3045.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste estudo indicaram a ausência de polimorfismos no éxon 5 do gene do hormônio anti-mulleriano (*AMH*) em búfalas, sugerindo que essa região é altamente conservada devido à sua relevância para a funcionalidade biológica da proteína. Pelo fato dos éxons mostrarem-se conservados entre as espécies, pode-se sugerir a partir dos achados no presente artigo que futuras pesquisas sejam realizadas, destacando outras regiões do gene *AMH* como, a promotora e não traduzidas (5' e 3' UTR), para identificar possíveis polimorfismos associados às características reprodutivas.

Além disso, a diferença significativa na população de folículos antrais (AFP) entre búfalas gestantes e não gestantes ($p = 0,02$), corrobora com estudos anteriores que indicam uma associação entre contagens extremas de folículos antrais e menor eficiência reprodutiva. Por outro lado, as variáveis volume ovariano (V) e folículo dominante (FD) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, sugerindo um papel menos evidente dessas características no status reprodutivo imediato.

A ausência de correlação entre AFP e concentração de AMH aponta para a necessidade de investigações futuras que considerem fatores genéticos, endócrinos e ambientais, além de explorar como essas variáveis interagem e impactam a fertilidade. Esses achados fornecem uma base importante para a compreensão da biologia reprodutiva em búfalas e podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de manejo e reprodução assistida em sistemas de produção.

ANEXO I



Comissão de Ética no
Uso de Animais CEUA/UFRA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE DO HORMÔNIO ANTI-MULLERIANO (AMH) EM ASSOCIAÇÃO AS CARACTERÍSTICAS FOLICULARES E SUA ASSOCIAÇÃO NA FERTILIDADE EM BÚFALAS.", protocolada sob o CEUA nº 3842280324 (ID 000676), sob a responsabilidade de **Ednaldo da Silva Filho e equipe; JULIANA VASCONCELOS FIGUEIREDO** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural da Amazônia (CEUA/UFRA) na reunião de 03/05/2024.

We certify that the proposal "MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE ANTI-MULLERIAN HORMONE (AMH) GENE IN ASSOCIATION WITH FOLLICULAR CHARACTERISTICS AND ITS ASSOCIATION WITH FERTILITY IN BUFFALOES.", utilizing 60 Buffalos (60 females), protocol number CEUA 3842280324 (ID 000676), under the responsibility of **Ednaldo da Silva Filho and team; JULIANA VASCONCELOS FIGUEIREDO** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal Rural University of Amazonia (CEUA/UFRA) in the meeting of 05/03/2024.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 04/2024 a 12/2024 Área: [Genética E Biologia Molecular](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Bubalinos](#) sexo: [Fêmeas](#) idade: [2 a 9 anos](#) N: [60](#)

Linhagem: [Murrah](#) Peso: [250 a 900 kg](#)

Local do experimento: LATICÍNIO CONQUISTA LTDA, estabelecida à km 24 da alça viária, Perna Leste, Zona rural, cidade BUJARÚ, UF PA

Belém, 25 de junho de 2024


PORTARIA Nº 643/2023 - REITORIA
CEUA/UFRA

Profa. Dra. Ágatha Rossanni Alves Damasceno
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural da Amazônia


PORTARIA Nº 643/2023 - REITORIA
CEUA/UFRA

Profa. Dra. Alanna do Socorro Lima da Silva
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural da Amazônia

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

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.* 1st 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.