



**Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

ELIZABETH MACHADO BARBOSA

**POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA, ÉXON I e ÉXON II DO GENE
DO RECEPTOR DA MELATONINA ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS
REPRODUTIVAS EM BÚFALAS NA AMAZÔNIA.**

Belém

2015

ELIZABETH MACHADO BARBOSA

**POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA, ÉXON I e ÉXON II DO GENE DO
RECEPTOR DA MELATONINA ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS
REPRODUTIVAS EM BÚFALAS NA AMAZÔNIA.**

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal. Núcleo de
Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural.
Universidade Federal do Pará. Empresa
Brasileira de Pesquisa Agropecuária –
Amazônia Oriental. Universidade Federal
Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal
Orientador Prof.Dr. Haroldo Francisco Lobato
Ribeiro

Belém

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Barbosa, Elizabeth Machado, 1983 -

Polimorfismos na região promotora, éxon I e éxon II do gene do receptor da melatonina associados às características reprodutivas em búfalas na Amazônia / Elizabeth Machado Barbosa- 2015.

Orientador: Haroldo Francisco Lobato Ribeiro

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2015.

1. Búfalo – Reprodução. 2. Melatonina. 3. Polimorfismo (Genética). 4. Reprodução animal. I. Título.

CDD 23. ed. 636.293

ELIZABETH MACHADO BARBOSA

**POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA, ÉXON I e ÉXON II DO GENE DO
RECEPTOR DA MELATONINA E SUAS POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES COM ÀS
CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS EM BÚFALAS NA AMAZÔNIA.**

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal. Núcleo de
Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural.
Universidade Federal do Pará. Empresa
Brasileira de Pesquisa Agropecuária –
Amazônia Oriental. Universidade Federal
Rural da Amazônia.
Área de Concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: 18/06/2015.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA
Presidente

Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho
Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA
Membro Titular

Prof. Dr. Humberto Tonhati
Universidade Estadual Paulista/UNESP-Jaboticabal
Membro Titular

Prof. Dr. José Ribamar Felipe Marques
Pesquisador Embrapa/CPATU
Membro Titular

Prof^a. Dra. Juliana Simão Nina de Azevedo.
Universidade Federal Rural da Amazônia – Capanema –
PA.
Membro Titular

Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves.
Universidade Federal do Pará. UFPA
Membro Suplente.

Dedico ao homem mais parceiro e amoroso da minha vida, que acreditou e me incentivou, te amo Pai (Antonio da Silveira Barbosa), conseguimos! A minha mãe (Maria Domingas Barbosa) por todo amor, ensinamentos e incentivo que me impulsionaram na busca desta conquista. Ao meu irmão Jorge Antonio Machado Barbosa pelos momentos de carinho, alegria, amor e incentivo. A minha tia Maria Vitoria Machado, minha amiga, minha serenidade. E aos meus amigos que estiveram ao meu lado me apoiando e proporcionando momentos de muita alegria.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, agradeço por tudo que eu vivi e que me possibilitou chegar até aqui, que me fez ser quem eu sou. Agradeço pelos bons momentos que me fizeram celebrar a vida, e agradeço pelos momentos difíceis que me fizeram crescer.

Aos meus pais (Antonio Barbosa e Maria Domingas Barbosa), irmão (Jorge Antonio Machado Barbosa) e minha tia (Maria Vitória Machado): meus parceiros, meus esteios, minha família, é com muito amor, carinho, repeito e cumplicidade que chegamos até aqui. Meus Eternos Amores!

Ao meu orientador Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro, obrigada por mais essa oportunidade, pela credibilidade e pelo respeito.

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho, amigo, parceiro, irmão, não vão existir palavras para lhe agradecer! Tens a alma de um grande mestre! Não tenho como expressar minha gratidão! Cresci como pessoa, como profissional e principalmente como pesquisadora. Obrigada por acreditar, por se doar e principalmente pelo respeito e pela parceria.

À Amiga e parceira Beijiane Souza, todas às vezes que eu chorei, sorri, me preocupei, que eu fraquejei, você estava ali, segurando minha mão! Não tenho palavras te agradecer! Ensinou-me a ter paciência e a persistir mais e mais. Obrigada amiga!

As minhas amigas, parceiras Rafaelle Caseb e Arely Martins, obrigada pela paciência pelo carinho, pelo companheirismo.

Ao Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves, por sua valiosa contribuição, sedento a estrutura laboratorial de sua responsabilidade (Laboratório de Tecnologia Biomolecular da UFPA), e por sua paciência, parceria, dedicação e carinho.

À amiga e parceira Prof. Dra. Juliana Nina de Azevedo, por acreditar e contribuir para a elaboração e conclusão deste projeto.

Ao amigo e Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho, pela contribuição na elaboração e conclusão deste projeto.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Biomolecular da UFPA, obrigada por tudo, aprendi tanto! Cada um ensinou e ajudou, acredito na grande parceria formada e nos laços de carinho criados. Obrigada!

A todos os proprietários, que cederam seus animais e instalações, incentivando esta pesquisa.

Aos amigos e que conviveram com paciência, carinho, respeito e compreensão nestes anos e a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desta Tese.

Muito obrigada!

RESUMO

A produção de bubalinos no Estado do Pará é uma atividade de alta representatividade para a economia regional e produção de carne, leite e derivados. Portanto, é necessário desenvolver novas tecnologias que aumente o desfrute da produção e reprodução de bubalinos na região Amazônica. Sendo assim, os objetivos desta tese de pesquisa foram caracterizar a região promotora do gene do receptor da melatonina 1 A (MTRN1A) e identificar polimorfismos nos éxons I e II do referido gene e associá-los a características reprodutivas de relevância econômica em búfalas na região Amazônica. Foram coletados amostras de pelos de 400 búfalas e foram usados 60 animais para caracterização da região promotora, 140 para detectar o polimorfismo (SNPs) no éxon II e 77 para detectar o polimorfismo no éxon I. Foi realizada a extração de DNA pelo método fenólico. Em seguida selecionaram-se os diferentes iniciadores para realizar as reações em cadeia da polimerase (PCR). A região promotora do MTRN1A foi sequenciada em um total de 1621 pares de base pelo método de Sanger, o polimorfismo no éxon II foi detectado através da técnica de PCR-RFLP (Polimorfismo de restrição de comprimento de fragmentos) com a enzima *HpaI* e o polimorfismo no éxon I foi detectado através do sequenciamento de DNA pelo método Sanger. Foram avaliadas as frequências alélicas e genotípicas de todos os SNPs, os coeficientes de endocruzamento (Fis) e as probabilidades de Hardy-Weinberg. Os SNPs da região promotora e do éxon I foram associados com características reprodutivas das búfalas pelo ANOVA, ou teste *t* de Student e/ou teste qui-quadrado. O nível de significância foi de 0,05. Foram detectados 26 SNPs na região promotora nas posições -1511 (C→T), -1465 (G→T), -1422 (A→G), -1411 (G→A), -1395 (G→T), -1298 (A→G), -1295(G→A), -1242 (A→C), -1150 (C→T), -1147 (G→C), -1136(A→G), -911 (G→A), -909 (A→G), -724 (C→G), -656 (A→C), -649 (T→C), -644 (G→A), -511 (A→C), -481 (G→A), -425 (C→T), -395 (G→A), -383 (G→T), -254 (C→T), -206 (T→C), -133 (T→G) e -94 (C→T) e um bloco de deleção (ACAA) na posição -1483. Do total de SNPs detectados, 75% dos alelos selvagens tiveram frequências maiores que 0,5. Para a característica Intervalo entre Parto (IEP), somente cinco SNPs (-1298, -1136, -911, -724 e -656) foram significativamente associados ($P < 0,05$) e outros três SNPs (-1395, -724 e -94) foram associados significativamente ($P < 0,05$) com a característica Idade ao Primeiro Parto (IPP) e nenhum para a característica concentração de partos ($P > 0,05$). Um total de 11 SNPs foi fortemente associado a fatores de ligação para a regulação gênica. O SNP no éxon II por PCR-RFLP (*HpaI*) na posição 306 de (T→C), sendo o alelo T mais frequente nos animais de Terra Firme (0,529) e o C em animais de Várzea, as duas populações apresentaram

coeficientes de endocruzamento Fis (0,040 e 0,091, respectivamente) e fortes desvios de Hardy-Weinberg ($P>0,05$). A mutação ocorre no 106º codon e é do tipo sinónimo sem alteração da estrutura de alças do RNA mensageiro. O SNP no éxon I foi detectado na posição 62 (T→C) e do tipo não sinónimo, trocando de Leucina para Prolina. O alelo mutante C foi o mais frequente (0,623), coeficiente de endocruzamento Fis=0,397 e desvios de Hardy-Weinberg ($P<0,05$). Nenhum dos genótipos foram associados ao interval entre partos e a idade do primeiro parto ($P>0,05$). Portanto, os SNPs são fortes candidatos para seleção, mas seria interessante avaliá-los em outros rebanhos na região Amazônica e/ou em outras regiões do Brasil e/ou em outros países para efetivá-los como excelentes marcadores moleculares para características reprodutivas de bubalinas.

Palavras-chave: Melatonina, região promotora, exon I, exon II, RFLP, PCR, Búfalas.

ABSTRACT

The buffaloes production in the Pará state have is a high representative activity to the regional economy and production of meat, milk and dairy products. Therefore, it is necessary to develop new technologies that increase the enjoyment of the production and reproduction of buffaloes in the Amazon region. Thus, the objectives of this research thesis was to characterize the promoter region of the melatonin receptor gene 1 (MTRN1A) and identify polymorphisms in exons I and II of that gene and link them to reproductive traits that have economic importance in buffaloes in the region Amazon.

Were collected 400 buffaloes samples and 60 animals were used to characterize the promoter region, 140 to detect the polymorphism (SNPs) in exon II and 77 to detect the polymorphism in exon I. DNA extraction was performed by phenol method. Then were selected different primers to make Polymerase Chain Reaction (PCR). The promoter region was sequenced MTRN1A a total of 1621 base pairs by the Sanger method, polymorphism in exon II was detected by PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) with HpaI enzyme and the polymorphism exon I was found by sequencing DNA by Sanger method. Allele and genotype frequencies of all SNPs were evaluated, the inbreeding coefficient (Fis) and the likelihood of Hardy-Weinberg equilibrium. SNPs in the promoter region and exon I have been associated with reproductive traits of buffaloes by ANOVA or Student's t test and / or chi-square test. The significance level was 0,05. 26 SNPs were detected in the promoter region at positions -1511 (C → T), -1465 (G → T), -1422 (A → G), -1411 (G → A), -1395 (G → T), -1298 (A → G) -1295 (G → A) -1242 (C → A) -1150 (C → T), -1147 (G → C) -1136 (A → G) -911 (G → A), -909 (A → G) -724 (C → G) -656 (A → C) -649 (C → T), -644 (G → A), -511 (A → C) -481 (G → A), -425 (C → T) -395 (G → A), -383 (G → T), -254 (C → T) -206 (T → C), -133 (T → G) and -94 (C → T) and a deletion unit (ACAA) at position -1483. Of the total detected SNPs, 75% of the wild alleles tivial frequencies greater than 0,5. For the characteristic interval between calving (IEP), only five SNPs (-1298, -1136, -911, -724 and -656) were significantly associated ($P < 0.05$) and three SNPs (-1395, -724 and -94) were significantly associated ($P < 0.05$) with the characteristic age at first calving (IPP) and none for the characteristic concentration of deliveries ($P > 0.05$). A total of 11 SNPs was strongly associated with binding factors in gene regulation. The SNP in exon II by PCR-RFLP (HpaI) at position 306 (T → C), the most frequent allele T in Upland animals (0,529) and C in lowland animals, the two populations showed coefficients Fis inbreeding (0,040 and 0,091, respectively) and strong deviations from Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). The

mutation occurs at codon 106 and is the sinónimo type without changing the messenger RNA handles structure. The SNP in exon I was detected at position 62 (T → C) and of the non sinónimo, exchanging of Leucine to Proline. The mutant allele was the most frequent C (0,623) inbreeding coefficient $F_{is} = 0.397$ and Hardy-Weinberg deviations ($P < 0.05$). None of the genotypes were associated with calving interval and age at first birth ($P > 0.05$). Therefore, SNPs are strong candidates for selection, but it would be interesting to evaluate them in other herds in the Amazon region and / or in other regions of Brazil and / or other countries to effect them as excellent molecular markers for reproductive traits of buffalo.

Keywords: Melatonin, promoter region, exon I, exon II, RFLP, PCR, buffaloes.

“Tente a sua sorte! A vida é feita de oportunidades. O homem que vai mais longe é quase sempre aquele que tem coragem de arriscar.”

(Dale Carnegie)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Organização do gene.....	22
Figura 2. Esquema da região promotora do gene do receptor da melatonina 1 em búfalos e as respectivas regiões amplificadas para sequenciamento.....	32
Figura 3. Estruturas dos RNAm do receptor da melatonina 1 em búfalos. Na esquerda esta a estrutura selvagem (T na posição 318) e na direita a estrutura mutante (C na posição 318) demonstrando nenhuma alteração estrutural entre as mesmas.....	46
Figura 4. Representação do esferograma do sequenciamento que demonstra o polimorfismo (T, C e Y=TC) na posição 62 no éxon 1 do gene MTRN1A.....	53

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> dos dois amplicons da região promotora do gene do receptor da melatonina 1 em bubalinos e suas respectivas posições e tamanhos.....	32
Tabela 2. Condições de temperatura e tempo das reações par ambos os <i>primers</i> do promotor do receptor da melatonina 1 em búfalos.....	33
Tabela 3. Posições dos SNPs e as respectivas descrições estatísticas na região promotora do gene do receptor da melatonina em búfalos.....	34
Tabela 4. Associações dos polimorfismos com as características reprodutivas nas búfalas.....	35
Tabela 5. SNPs que apresentaram associações a fatores de ligações que regulam a transcrição do gene em comparação com outros promotores de diferentes espécies de eucariontes.....	37
Tabela 6. Resultados das análises de genética populacional nas duas populações.....	47
Tabela 7. Resultados das análises estatísticas populacional.....	53
Tabela 8. Associação dos novos SNP no éxon I do gene MTRN1A com características reprodutivas em búfalas.....	54

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. BÚFALOS NA REGIÃO AMAZÔNICA.....	17
2.2. CONCENTRAÇÃO DE PARIÇÃO, INTERVALO ENTRE PARTOS, IDADE AO PRIMEIRO PARTO.....	17
2.3. GENE DAA MELATONINA.....	20
2.4. PROMOTORES: REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
3. Artigo 1 - Caracterização Molecular da Região Promotora do Gene do Receptor da Melatonina (MTRN1A) e Associações de Polimorfismos com Características de Fertilidade em Búfalas na Amazônia.....	30
RESUMO.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO.....	38
CONCLUSÃO.....	39
AGRADECIMENTO.....	40
CONFLITO DE INTERESSES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
4. Artigo 2 - Polimorfismo no Gene do Receptor da Melatonina em Populações de Búfalos na Amazônia Brasileira.....	44
RESUMO.....	44
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
RESULTADOS.....	46
DISCUSSÃO.....	47
AGRADECIMENTO.....	48

	CONFLITO DE INTERESSES.....	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
5.	Artigo 3. Novo polimorfismo no Éxon I do Gene do Receptor da Melatonina não associado a características reprodutivas em búfalos amazônicos.....	50
	RESUMO.....	50
	INTRODUÇÃO.....	50
	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
	RESULTADOS.....	52
	DISCUSSÃO.....	54
	AGRADECIMENTO.....	55
	CONFLITO DE INTERESSES.....	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
6.	CONCLUSÃO GERAL.....	57

1. INTRODUÇÃO

Os búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*) são animais rústicos, que apresentam excelentes índices zootécnicos e possuem capacidade de adaptação em lugares desfavoráveis para a bovinocultura, tornando, portanto, a bubalinocultura viável economicamente para várias regiões do Brasil (COSTA et al., 2002; FRANZOLIN, 2002; GOFERT, 2006 ; GARCIA et al., 2006).

Estes animais possuem um bom desempenho produtivo e reprodutivo, quando criados em condições extensivas de várzea ou solos de inferior qualidade, predominantes na Região Amazônica (RIBEIRO, 2010), muito embora, Tonhati (1997) afirme que nestas condições supracitadas, os búfalos são caracterizados pela falta de controle sanitário e nutricional, desconhecendo-se seus desempenhos quanto ao ganho de peso, produção e qualidade do leite e características reprodutivas.

Os programas de melhoramento genético de animais de produção, entre eles os bubalinos, estão obtendo excelentes resultados em várias características desejáveis que possibilitassem melhores performances de produção e reprodução. Portanto, os métodos de seleção de animais de alto desempenho produtivo permitirá a transferência de atributos favoráveis às gerações seguintes, possibilitando melhoras qualitativas e quantitativas, por exemplo, a produção de carne e leite em bubalinos (GARCIA et al., 2006). Sendo assim, os métodos de melhoramento se tornam responsáveis pelo encurtamento dos ciclos de produção gerando aumento de ganho genético nos rebanhos (BONILHA, 2003).

Na última década, graças ao acelerado desenvolvimento tecnológico, a seleção genética entrou em uma nova fase na qual a avaliação fenotípica passou a contar com o auxílio da avaliação genômica dos animais, pelo uso da genética molecular. A sexagem de embriões, os estudos de expressão gênica diferencial, a identificação de QTL (*Quantitative Trait Loci*) e de marcadores genéticos específicos, são partes integrantes da atual tecnologia que está à disposição da seleção animal (GARCIA, 1995; GARCIA, 2001; ISAG, 2006).

Uma das vantagens dos marcadores moleculares em programa de seleção é apresentar o potencial complementar à seleção clássica, relacionando a precocidade de avaliação dos animais para características específicas, desde os momentos imediatamente após o nascimento, ou até mesmo durante a fase embrionária de pré-implantação (GARCIA, 2001; GARCIA; PORTO-NETO, 2006).

Garcia (2006) afirma que além da objetividade envolvida na análise de DNA, outro importante benefício, se refere à possibilidade de seleção de características não observadas tradicionalmente, tais como, aquelas que envolvem dificuldades técnicas de mensuração (precocidade sexual e de terminação de carcaça), elevado custo das análises (maciez/marmoreio da carne e resistência a ectoparasitas) ou por ser uma característica avaliada tardiamente (longevidade).

Cassiano et al. (2004) citam a importância das características reprodutivas em programas de melhoramento genético, e está relacionada, principalmente, com as taxas de ganho genético anual, e segundo os autores supracitados, índices de menores idades ao primeiro parto permitem a redução do intervalo de gerações, já menores intervalos entre partos disponibilizam maior número de novilhas de alto potencial genético que possam substituir as fêmeas descartadas.

A sazonalidade de parição é uma das peculiaridades na espécie bubalina, visto que são animais poliéstricos sazonais de dias curtos, apresentando interrupção da ciclicidade durante o verão, embora Vale e Ribeiro (2005) afirmem que em regiões próximas a linha do Equador, estes são de comportamento poliéstricos contínuos.

O efeito da melatonina na reprodução ocorre a nível hipotalâmico, regulando a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (LURIDIANA et al., 2012), e sua atuação é bem documentada por Tamura et al. (2008), como antioxidante, podendo estar associada ao desenvolvimento folicular, na qualidade oocitária, interferindo em processos como maturação oocitária e ovulação.

O receptor da melatonina (MTRN1A) parece exercer um efeito estimulatório no eixo reprodutivo das espécies de dias curtos. Estudos com diversas raças de caprinos, ovinos e bubalinos têm demonstrado que um polimorfismo nesse gene resulta em animais com menos sazonalidade (ROCHA et al., 2011; ZETOUNI et al., 2014).

O objetivo deste estudo foi caracterizar a região promotora do gene receptor da melatonina 1A (MTRN1A) e detectar possíveis polimorfismos nos éxons I e II do referido gene e verificar a ocorrência de associação dos polimorfismos detectados com a idade ao primeiro parto, intervalo entre parto e concentrações de parto de búfalas criadas em sistemas semi-intensivos no estado do Pará.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BÚFALOS NA REGIÃO AMAZÔNICA

O Brasil apresenta um efetivo de 1,3 milhões de bubalinos, sendo a Região Norte possuidora do maior efetivo de bubalinos, com 64,1% do rebanho Nacional e o Estado do Pará tem um efetivo de 36% do rebanho Nacional e 56,1% do rebanho regional, sendo o Estado com maior produção de Bubalinos no Brasil (IBGE, 2012).

Na Amazônia, a principal finalidade da criação de búfalos é a produção de carne, e secundária é a utilização do leite para a fabricação de queijo, que normalmente ocorre nas épocas mais favoráveis do ano, coincidindo com o período da lactação. Estes são também usados como animal de trabalho (NASCIMENTO; LOURENÇO JUNIOR, 1979).

O regime de criação é feito de forma semi-extensiva a extensiva, em ecossistemas de pastagens nativas e cultivadas, demonstrando sua adaptação aos mais variados ambientes, satisfatoriamente em áreas inundáveis (desfavoráveis aos bovinos), com desempenhos produtivo e reprodutivo bem superior a dos bovinos (elevados índices de natalidade e de longevidade) (NASCIMENTO; LOURENÇO JUNIOR, 1979; ABUFAIAD, 1997).

2.2. CONCENTRAÇÃO DE PARIÇÃO, INTERVALO ENTRE PARTOS, IDADE AO PRIMEIRO PARTO

A reprodução é a atividade biológica mais importante para qualquer espécie animal, pois a partir dela são originados os indivíduos da próxima geração, o que garante a sobrevivência da espécie no meio. Nas criações comerciais, a reprodução é atividade multiplicadora dos rebanhos e, na pesquisa, gera uma interface com trabalhos de seleção e melhoramento genético (GARCIA et al., 2006; SNEL-OLIVEIRA et al., 2013).

Nas regiões mais distantes da linha do Equador, no sentido Norte ou Sul, o búfalo do rio (*Bubalus bubalis*) se comporta como um animal poliestrual sazonal de dias curtos, apresentando interrupção da ciclicidade durante o verão, quando a luminosidade diária é maior. Estes efeitos sazonais são comandados pela melatonina, hormônio

sintetizado pela glândula pineal, que inibe a produção dos hormônios GnRH, FSH e LH (BITTMAN; KARSCH, 1984; ZICARELLI, 1994).

Por outro lado, nas regiões próximas ao Equador (Região Amazônica), as vacas bubalinas são animais de comportamento poliestrual contínuo, de acordo com Vale e Ribeiro (2005), estas ciclam durante todo o ano. No entanto, Ohashi et al. (2012) citam que é frequente a observação da concentração de parto em determinadas épocas do ano.

No Brasil, os bubalinos criados na região do Vale do Ribeira, no município de Registro - SP (24° 30' 07" de Latitude Sul e 47° 50' 54" de Longitude Oeste), apresentam concentração de partições entre os meses de fevereiro a abril (BARUSELLI, 1993), sendo 57,93% dos animais nascidos neste período (REICHERT et al., 2001). Esses dados indicam que a maioria das concepções ocorre entre abril e junho, época em que a luminosidade diária no Estado de São Paulo vai se tornando cada vez mais restrita, com períodos escuros mais longos.

De modo similar, dados sobre o período de nascimentos de bubalinos no município de Pirassununga-SP (21° 56' 13" de Latitude Sul e 47° 28' 24" de Longitude Oeste) indicam que pouco mais de 79% dos partos ocorrem entre os meses de janeiro a março (MATTOS et al., 2000), conseqüentemente ao período mais propício para a fecundação das búfalas, terá sido de março a maio.

Já no nordeste brasileiro, no município de Paracuru, Estado do Ceará, (3° 45' 59" de Latitude Sul e 39° 14' 36" de Longitude Oeste), a maior concentração de partos ocorre no primeiro semestre do ano, com 79,3% dos nascimentos estão concentrados entre janeiro e junho, época de maior pluviosidade local (SAMPAIO NETO et al., 2001). As concepções se dão, portanto, sob condições locais, nos meses de março a agosto.

Na Amazônia brasileira, de acordo com a localização geográfica da criação, o padrão de partições se altera. No Estado do Pará, em criações na terra firme, as partições concentram-se no primeiro semestre do ano, com maiores índices nos meses de abril a agosto, enquanto nas áreas de várzeas os partos se concentram de setembro a dezembro (RIBEIRO, 2002).

Dados oriundos do rebanho experimental da Embrapa, criado na região do baixo Amazonas, no município de Monte Alegre-PA (2° 0' 30" de Latitude Sul e 54° 4' 13" de Longitude Oeste), demonstram que aproximadamente 78% dos nascimentos ocorrem entre os meses de julho a dezembro (CASSIANO et al., 2003). Nesse local, o rebanho é mantido em sistema de integração entre várzea e terra-firme.

Para Cassiano et al. (2003), durante os meses de setembro a fevereiro, os animais ocupam as áreas de várzea, e de março a agosto são mantidos em áreas de pastagens mais altas, em virtude do ciclo de cheias do rio Amazonas. A sazonalidade dos partos revela que o maior número de concepções ocorre entre os meses setembro e fevereiro, exatamente quando os animais ocupam as áreas de várzea, que começam a ser descobertas pelas águas em virtude da vazante do rio Amazonas. Nesta época, os campos nativos de várzea apresentam excelentes condições para a exploração pecuária, onde é evidenciada a abundância de forrageiras de bom valor nutritivo, às quais os animais passam a ter acesso.

Segundo Marques (1991) em 5.515 observações de partos em búfalas criadas em rebanhos localizados nos Estados do Pará, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, houve maior concentração de partições entre março e maio (49,54%), valor que superou os registros dos períodos de dezembro a fevereiro (34,84%), junho a agosto (12,63%) e setembro a novembro (2,99%). Em uma averiguação mais atualizada, Rolim Filho et al. (2009) observaram maior concentração de partos entre os meses de março a agosto.

O intervalo entre partos é um dos parâmetros mais importantes para se medir a eficiência reprodutiva, pois este reflete diretamente nos custos de produção, sendo aceitável que a búfala produza dois bezerros a cada três anos (PEREIRA, 2008). Marques (1991) verificou o intervalo de partos médios de $13,29 \pm 2,77$ meses corroborando com Carmargo Junior et al., (2012) com $13,14 \pm 0,78$ meses e Bezerra Junior et al., (2014) com média de $13,89 \pm 2,99$ meses. Já Rolim Filho et al. (2009) analisando 2.115 registros de 1974 a 2005, observaram um intervalo de parto médio de $16,54 \pm 3,74$ meses superior aos autores anteriores. Para Oliveira Neta et al. (2012) em seus estudos com 70 búfalas em lactação no município de Moju-PA, obteve-se um intervalo entre partos superior aos autores supracitados com média de 18,6 meses.

A idade ao primeiro parto é outro parâmetro de importante destaque nas relações entre características produtivas e reprodutivas em um rebanho. Búfalas precoces na puberdade produzirão mais crias e leite em sua vida produtiva que aquelas que entraram tardiamente na reprodução (produtividade do rebanho). Neste contexto, Camargo Junior et al. (2012) observaram em seus estudos com 6 diferentes raças de bubalinos um valor de $34,58 \pm 3,96$ meses inferior a Marques (1991) com $37,94 \pm 5,53$ meses e Rolim Filho et al. (2009) com média de $39,52 \pm 7,54$ meses.

2.3. GENE DA MELATONINA

A melatonina (*N-acetyl-5-methoxytryptamine*) foi isolada da glândula pineal de bovinos há 55 anos (LENER et al., 1958; 1959). A produção rítmica de melatonina pela glândula pineal foi inicialmente ligada à regulação sazonal da reprodução em espécies com fotoperíodo (HOFFMAN; REITER, 1965; REITER; FRASCHINI, 1969). Subsequentemente, estudos mostraram que as funções da melatonina excedem a regulação sazonal reprodutiva (TAN et al., 1993; MAURIZ et al., 2013).

Além das atividades sistêmicas da melatonina, Ronnberg et al. (1990) em seus estudos, sugeriu uma atuação deste hormônio sobre a fisiologia ovariana, regulando-a, uma vez que foram encontradas altas concentrações de melatonina no fluído folicular. Adicionalmente, a presença de receptores de melatonina nas células foliculares de ratas e camundongas (SOARES et al., 2003; LEE et al., 2001) sugerem uma possível produção de melatonina no ovário (ITOH et al., 1999).

Hardeland et al. (2011), afirmam que sua ação é bem documentada como antioxidante e anti-apoptótica e pode estar associada ao desenvolvimento folicular e a qualidade oocitária, interferindo em processos como a maturação oocitária e ovulação (TAMURA et al., 2008).

Em mamíferos, são descritos dois tipos de receptores acoplados a membrana celular: MT1 e MT2, com características diferentes entre si. Estes se encontram localizados em diversos compartimentos no organismo. No sistema reprodutor feminino, foram identificados RNAm para receptores MT1 e MT2 em células da granulosa ovariana e no folículo (SOARES et al., 2003; LEE et al., 2001; YIE et al., 1995; NILES et al., 1999), sugerindo que este hormônio pode ter uma ação sobre a esteriodogênese dessas células e sobre a função folicular. Desta forma, a melatonina desempenha um importante papel no controle neuroendócrino da fisiologia reprodutiva, principalmente na conservação de sinais ambientais e organização do ritmo circadiano em animais sazonais (ROCHA et al., 2011; CRUZ et al., 2014).

No gene envolvido na síntese da melatonina, alguns estudos associaram determinados polimorfismos com características de eficiência reprodutiva em algumas espécies. Pelletier et al. (2000) verificaram associação entre inatividade ovariana e sazonalidade reprodutiva no gene *MNTR1A* em ovelhas. Resultados semelhantes também foram observados por Wright (2000) e Notter et al. (2003). Mateescu et al. (2009) associaram polimorfismos no gene *MNTR1A* de ovelhas da raça Dorset e

mestiças com menor idade ao primeiro parto e menor intervalo entre o primeiro e segundo parto, além da habilidade de cópulas fora de sua estação reprodutiva ideal, confirmando a importância desse gene como potencial marcador molecular para essa característica.

Descoberto por Pelletier et al. (2000), o polimorfismo no gene *MTNR1A* através de RFLP, possibilitou avaliar sua influência no desempenho reprodutivo. Foi registrado o efeito de seis genótipos encontrados em diferentes RFLPs (MM, Mm, mm, RR, Rr, rr) e verificou-se que as ovelhas adultas que apresentavam pelo menos uma cópia do alelo M, possuem uma tendência a serem mais férteis do que aquelas que não apresentam seu genótipo ($p=0,09$).

Em ovelhas, a atividade reprodutiva é influenciada por parâmetros sazonais diante do comprimento do dia em regiões de estações bem definidas, desta forma Carcangiu et al. (2009), utilizando 345 raças diferentes de ovelhas em dois períodos do ano analisaram a existência da relação entre a atividade reprodutiva e o gene receptor da melatonina (*MTR1A*), e observaram que nos genótipos R/r (nove ovelhas Sarda) existe uma correlação com a reprodução indicada pelo fotoperíodo. O sequenciamento mostrou a mudança de 6 nucleotídeos porém sem alteração na mudança do aminoácido. Desta forma foi concluído que este polimorfismo influencia na atividade reprodutiva somente em ovelhas Sarda.

Já em búfalas mediterrâneas na Itália, Paludo et al. (2011), observaram nesta espécie, que o *MTR1A* não influencia na atividade reprodutiva pré-púbere em vacas búfalas. Mura et al. (2010), utilizaram 423 amostras de cordeiras Sarda de três diferentes fazendas para avaliar o efeito de um ou dois implantes de melatonina no ato da primeira concepção e observaram efeito positivo do tratamento com os implantes na primeira concepção nos genótipos dominantes podendo-se constatar assim uma influência na resposta no tratamento com a melatonina.

Mateescu et al. (2009), utilizando 116 ovelhas de duas raças avaliando a correlação do gene *MTR1A* e a performance reprodutiva, verificaram uma associação com a frequência de nascimento de cordeiros confirmando que o *MTR1A* é um potencial gene como marcador molecular para sazonalidade.

Carcangiu et al. (2011), examinaram o polimorfismo do *MTRN1A* em relação a sazonalidade reprodutiva de búfalas mediterrâneas na Itália, estudando o período de acasalamento e parto de 100 vacas múltíparas dentro de 3 anos, demonstrou a presença

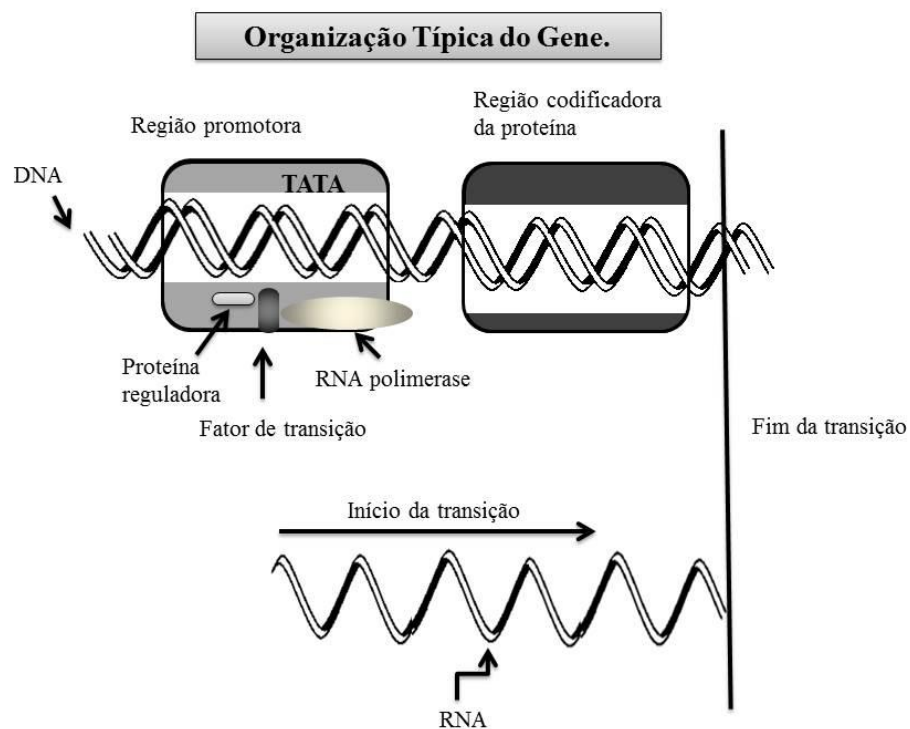
do polimorfismo e que nestes animais há uma influência direta na atividade reprodutiva sazonal.

Luridiana et al. (2012), observaram que o gene *MTNR1A* não tem efeito sobre idade ao primeiro parto (32 meses) em búfalas mediterrâneas na Itália, embora a associação do genótipo T/T e a atividade reprodutiva em dias de fotoperíodo longo indicam que o polimorfismo pode ser considerado um marcador genético que identifica búfalos aptos a reproduzir fora da estação.

2.4. PROMOTORES: REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Torik e Van De Ven (1996) definem os promotores como estruturas moduladoras de DNA que contêm um conjunto complexo de elementos reguladores de “*cis-acting*” necessários para a iniciação exata e eficiente da transcrição para controlar a expressão de um gene. Estas moléculas “*cis-acting*” agem modulando a expressão de sequências de codificação física de um polipeptídeo adjacente, ligada de forma operacional (Figura 1).

Figura 1. Organização do gene.



Fonte: Adaptado de Rodriguez, 2007

Os promotores se ligam à enzima RNA polimerase II, que é responsável pela geração de RNA. A região promotora é geralmente assumida como a chave da região reguladora *cis-acting* que controla a transcrição da região de codificação adjacente em ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) (LEVINE; TJIAN, 2003; KIM et al., 2005; RODRIGUEZ, 2007).

Estes núcleos promotores são muito mais do que simples andaimes de DNA para a maquinaria de transcrição basal, em vez disso, estes são participantes nas dinâmicas e vitais na regulação da atividade de transcrição (LEVINE; TJIAN, 2003; KIM et al., 2005; RODRIGUEZ, 2007).

A transcrição de um gene que codifica a proteína eucariótica é precedida de múltiplos eventos; estes incluem: a descondensação do locus, remodelação nucleossomal, histonas modificadoras, ligação de ativadores de transcrição, coativadores e promotores, e o recrutamento da máquina de transcrição basal para o núcleo promotor (BUTLER; KANONGA, 2002; SMALE; KADONAGO, 2003; GAGNIUC; TIRGOVISTE, 2012).

O promotor nuclear inclui elementos de DNA que podem se estender 35 pb a montante e / ou a jusante do local de iniciação da transcrição. A maior parte do núcleo de elementos promotores parece interagir diretamente com componentes da máquina basal de transcrição. A máquina basal pode ser definida por fatores, incluindo a RNA polimerase II, que são minimamente essenciais para a transcrição *in vitro*, a partir de um promotor isolado do núcleo (BUTLER; KANONGA, 2002; SMALE; KADONAGO, 2003; GAGNIUC; TIRGOVISTE, 2012).

A grande maioria dos estudos sobre máquinas basais tem sido realizada com promotores contendo um TATA Box como um elemento núcleo essencial. Um complexo de pré-iniciação estável pode se formar sobre os promotores do núcleo TATA-dependentes por associação a fatores basais na seguinte ordem: TFIID / TFIIA, TFIIB, RNA polimerase II / TFIIF, TFIIE, e então TFIIH (BUTLER; KANONGA, 2002; SMALE; KADONAGO, 2003; GAGNIUC; TIRGOVISTE, 2012).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUFAIAD, E.M.D. **Búfalos, raça e manejo**. Belém: FCAP. Serviço de Documentação e Informação, 1997. 22 p.

BARUSELLI, P.S. **Reprodução em búfalos**. 1993. Disponível em: <http://www.fmvz.usp.br/menu/sitebra11.html>. Acesso em 08/02/2014.

BEZERRA JUNIOR, J. S.; FRANGA, A.B.; COUTO, A.G.; BARROS, C.C.; SILVA, R.M.O. Produção de leite, duração da lactação e intervalo entre partos em búfalas mestiças Murrah. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 2, p. 184 – 191, 2014.

BITTMAN, E.L.; KARSCH, F.J. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. **Biology Reproduction**, v. 30, p. 585–93, 1984.

BONILHA, S.F.M. **Efeitos da seleção para peso pós-desmama sobre características de carcaça, rendimentos de corte e composição corporal de bovinos Nelore e Carcau**. 2003. 55 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2003.

BUTLER, J.E.F.; KADONAGA, J.T. **Genes Development**, v. 16, p. 2583–92, 2002.

CAMARGO JUNIOR, R.N.C; MARQUES, MARCONDES, C.R.; ARAUJO, C.V.; AGUIAR, J.F.; MARQUES, L.C.; RODRIGUES, A.E. Índices de eficiência reprodutiva de búfalos da Amazônia Oriental do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 796 – 803, 2012.

CARCANGIU, V.; MURA, M.C.; PAZZOLA, M.; VACCA, G.M.; PALUDO, M.; MARCHI, B.; DAGA, C.; BUA, S.; LURIDIANA, S. Characterization of the Mediterranean Italian buffaloes melatonin receptor 1^a (MTNR1A) gene and its association with reproductive seasonality. **Theriogenology**, v. 76, p. 419–426, 2011.

CARCANGIU, V.; MURA, M.C.; VACCA, G.M.; PAZZOLA, M.; DETTORI, M.L.; LURIDIANA, S.; BINI, P.P. Polymorphism of the melatonin receptor MTNR1A gene and its relationship with seasonal reproductive activity in the Sarda sheep breed. **Animal Reproduction Science**, v. 116, p. 65–72, 2009.

CASSIANO, L.A.P.; MARIANTE, A.S.; McMANUS, C. MARQUES, J.R.F.; COSTA, N.A. Parâmetros genéticos das características produtivas e reprodutivas de búfalos na Amazônia brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 451 – 457, 2004.

CASSIANO, L.A.P.; MARIANTE, A.S.; McMANUS, C.; MARQUES, J.R.F.; COSTA, N.A. Caracterização fenotípica de raças bubalinas nacionais e do tipo Baio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1337- 1342, 2003.

COSTA, N. A.; LOURENÇO JÚNIOR, J.B.; TEIXEIRA NETO, J.F.; BAENA, A.R.C.; MOURA CARVALHO, L.O.D. Intensive production of buffalo meat in cultivated pasture of the Amazon region. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1., 2002, Belém. **Proceedings...** Belém: [s.n.]. 2002, p.43-46.

CRUZ, A.M.H.C.; LEAL, B.C.L.V.; CRUZ, C.J.F.; TAN, A.D-T.; REITER, A.R.J Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: A brief review. **Animal Reproduction Science**, v. 145, p. 150–160, 2014.

FRANZOLIN, R. Technologies to improve the nutritional efficiency in buffaloes. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1., 2002, Belém. **Proceedings...** Belém: [s.n.], 56-67 p. 2002.

GAGNIUC, P.; TIRGOVISTE, C. I. Eukaryotic genomes may exhibit up to 10 generic classes of gene promoters. **BMC Genomics**, v. 13, p. 512, 2012. Disponível em: www.biomedcentral.com/1471-2164/13/512. Acessado em: 18/11/2014.

GARCIA, A.R. Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*). In: Encontro Internacional de Atualização em Nutrição, Melhoramento e Reprodução Em Bubalinos, 2007, Belém. **Revista de Ciências Agrárias**, nº 45, 2006. Suplemento.

GARCIA, A.R.; GONÇALVES, K.S.; NAHÚM, B.S.; MATOS, L.B.; BARBOSA, D.L.M.; SIMÕES, A.R.; MONTEIRO, P.J.C. Eficiência da detecção de estros em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) criadas na Amazônia. In: 17º Congresso Estadual de Medicina Veterinária, Gramado: SOVERGS, 2006, p. 3051-3056.

GARCIA, J. F. **Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) de embriões bovinos**. 1995, p. 76. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

GARCIA, J. F. Practical considerations of embryo manipulation: Preimplantation genetic typing. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1393-1399, 2001.

GARCIA, J. F.; PORTO-NETO, L. P. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, Supl. 1, p. 197-203, 2006.

GOFERT, L.F. 2006. **Novas técnicas para inseminação artificial em búfalas**. Piracicaba: AgriPoint Consultoria Ltda, Disponível em: www.milkpoint.com.br. Acesso em: 14 julho 2014.

HARDELAND, R.; CARDINALI, D.P.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D.W.; BROWN, G.M.; PANDI-PERUMAL, S.R. Melatonina pleiotropic, orchestratingregulator molecule. **Program Neurobiology**, v. 93, p. 350–384, 2011.

HOFFMAN, R.A.; REITER, R.J. Pineal gland: influence on gonads of malehamsters. **Science**, v. 148, p. 1609–1611, 1965.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2012. **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 40, p. 1-71.

ISAG. In: International Conference on Animal Genetics, 30, 2006, Porto Seguro- Ba. **Proceedings...** Porto Seguro: Royal Society of London, 2005, v.272, n.9, p.2211-2217.

ITOH, M.T.; ISHIZAKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; AMEMIYA, A.; SUMI, Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the humanovary. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, p. 402–408, 1999.

KIM, T.; KIM, K.; CHOI, B.; YOON, D.; JANG, G.; LEE, K.; CHUNG, H.; LEE, H.; PARK, H.; LEE, J. Genetic structure of pig breeds from Korea and China using microsatellite loci analysis. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2255-63, 2005.

LEE, C.; DO, B.R.; LEE, Y.; PARK, J.; KIM, S.; KIM, J.; ROH, S.; YOON, Y.; YOON H. Ovarian expression of melatonin Mel1a receptor mRNA during mouse development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59 (2), p. 126–132, 2001.

LERNER, A.B., CASE, J.D., HEINZELMANN, R.V. Structure of melatonin. **Journal American Chemical Society**, v. 81, p. 6084–6085, 1959.

LERNER, A.B., CASE, J.D., TAKAHASHI, Y., LEE, Y., MORI, W., Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. **Journal American Chemical Society**, v. 80, p. 2587, 1958.

LEVINE, M.; TJIAN, R. Transcription regulation and animal diversity. **Nature**, v. 424, 2003. Disponível em: www.nature.com/nature. Acessado em: 10/10/2014.

LURIDIANA, S.; MURA, M.C.; PAZZOLA, M.; PALUDO, M.; COSSO, G.; DETTORI, M.L.; BUA, S.; VACCA, G.M.; CARCANGIU, V. Association between melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene polymorphism and the reproductive performance of Mediterranean Italian buffaloes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, p. 983–987, 2012.

MARQUES, J.R.F. **Avaliação genético-quantitativa de algumas características do desempenho produtivo de grupos genéticos de búfalos (*Bubalus bubalis*)**. 1991. 134 p. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista – Botucatu, 1991.

MATEESCU R. G.; LUNSFORD, A. K.; THONNEY, M. L. Association between melatonin receptor 1A gene polymorphism and reproductive performance in Dorset ewes. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 2485-2488, 2009.

MATTOS, P.S.R; FRANZOLIN, R.; NONAKA, K.O. Concentração plasmática de melatonina em novilhas bubalinas (*Bubalus bubalis*) ao longo do ano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 475-478, 2000.

MAURIZ, J.L.; COLLADO, P.S.; VENEROSO, C.; REITER, R.J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **Journal Pineal Research**, v. 54, p. 1–14, 2013.

MURA, M. C.; LURIDIANA, S.; VACCA, G. M.; BINI, P. P.; CARCANGIU, V. Effect of genotype at the MTNR1A locus and melatonin treatment on first conception in Sarda ewe lambs. **Theriogenology**, v. 74, p. 1579-1586, 2010.

NASCIMENTO, C.N.B.; LOURENÇO JUNIOR, J.B. **Criação em Búfalos**. Brasília: Embrapa - SPI; Belém: EMBRAPA – CPATU, 1979, p. 19.

NILES, L.P.; WANG, J.; SHEN, L.; LOBB, D.K.; YOUNGLAI, E.V. Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 156 (1), p. 107–110, 1999.

OHASHI, O.; MIRANDA, M.S.; SANTOS, S.D.; CORDEIRO, M.S.; COSTA, N. N.; SILVA, T. V. Distúrbios Reprodutivos do Rebanho Bubalino Nacional. **Ciência Animal**, v. 22 (1), p. 171-187, 2012.

OLIVEIRA NETA, A.C.; RIBEIRO, H.F.L.; ROLIM FILHO, S.T.; CHAVES, L.C.; DAHER JUNIOR, E.; NUNES, K.B. Intervalo entre partos e produção leiteira de búfalos criados no Estado do Pará. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 212 – 215, 2012.

PALUDO, M.; MURA, M.C.; LURIDIANA, S.; PAZZOLA, M.; DAGA, C.; VACCA, G.M.; BUA, S.; BODANO, S.; SANNA, G.A.; CARCANGIU, V. Genotype of melatonin receptor MT1 (MTNR1A) and puberty in Mediterranean Italian buffalo. **Agricultura e Conspectus Scientificus**, v. 76, p. 157–160, 2011.

PELLETIER, J.; BODIN, L.; HANOCQ, E.; MALPAUX, B.; TEYSSIER, J.; THIMONIER, J.; CHEMINEAU, P. Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene Mel1a receptor in the ewe. **Biololy of Reproduction**, v. 62, p. 1096 –101, 2000.

PEREIRA, R.G.A.; BARBOSA, S.B.P.; LOPES, C.R.A. et al. **Intervalo entre partos em rebanho bubalino no Estado de Rondônia**. Rondônia: EMBRAPA/RONDÔNIA, 2008, v. 53, p. 12 (Boletim de pesquisa e desenvolvimento).

REICHERT, R.H.; PIRES, R.M.L.; MARTINEZ, A.C.; BARUSELLI, P.S. Desempenho reprodutivo de búfalos da raça Murrah. In: 4º Congresso Brasileiro de Buiatria, **Anais...** Campo Grande: [s.n.], p. 104, 2001.

REITER, R.J.; FRASCHINI, F. Endocrine aspects of the mammalian pinealgland: a review. **Neuroendocrinology**, v. 5, p. 219–255, 1969.

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

RIBEIRO, H.F.L. Característica do manejo reprodutivo em búfalos na Amazônia. In: 1º Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária, **Anais...** Curitiba: [s.n.], 2002, p. 101-104.

ROCHA, R.M.P.; MATOS, M.H.T.M.; LIMA, L.F.; SARAIVA, M.V.A.; ALVES, A.M.C.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Melatonina e Reprodução Animal: Implicações na Fisiologia Ovariana. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.2, p. 147-157, 2011.

RODRÍGUEZ, C.R. **Promoters Used to Regulate Gene Expression**. 2007. Disponível em: www.patentlens.net/daisy/promoters/ext/navaggregator/navaggr. Acessado em: 10/10/2014.

ROLIM FILHO, S.T.; RIBEIRO, H.F.L.; VALE, W.G.; PICANÇO, N.S.; BARBOSA, E.M.; FERREIRA, R.N. Desempenho reprodutivo de fêmeas bubalinas criadas em sistema misto (várzea e pastagem artificial) no Estado do Pará. I. Idade a primeira cria, intervalo entre partos, época de parição, eficiência reprodutiva e taxa de prenhez. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n.3, p. 754-763, 2009.

RONNBERG, L.; KAUPPILA, A.; LEPPÄLOUTO, J. MARTIKAINEN, H.; VAKKURI, O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. **Journal of Clinical and Endocrinology & Metabolism**, v. 71 (2), p. 492 -496, 1990.

SAMPAIO NETO, J.C.; MARTINS FILHO, R.; LOBO, R.N.B.; TONHATI, H. Avaliação dos desempenhos produtivo e reprodutivo de um rebanho bubalino no Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 368-373, 2001.

SMALE, S. T; KADONAGA, J.T. The RNA Polymerase II Core Promoter. **Annual Review of Biochemistry**, v. 72, p. 449–79, 2003.

SNEL-OLIVEIRA, M. V.; WETZEL-GASTAL, D.; SARTORI, R.; NEVES, J.P. Procedimentos ginecológicos frequentes no desempenho produtivo e reprodutivo de fêmeas bubalinas murrá. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n.4, p. 468-472, 2013.

SOARES, J. M. JR; MASANA, M. I.; ERSAHIN, C.; DUBOCOVICH, M. L.; Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306 (2), p. 694–702, 2003.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; TERRON, M.P.; FLORES, L.J.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X.; SUGINO, N.; REITER, R.J. Melatonin and pregnancy in the human. **Reproductive Toxicology**, v. 25, p. 291–303, 2008.

TAN, D.X.; CHEN, L.D.; POEGGELER, B.; MANCHESTER, L.C. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrine**, v. 1, p. 57-60, 1993.

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

TORIK. A.Y.A; VAN DE VEM, W.J.M. Regulation of gene expression by alternative promoters. **The FASEB Journal**, v. 10, p. 453 – 460, 1996.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H.F.L. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 63-73, 2005.

YIE, S.M.; NILES, L.P.; YOUNGLAI, E.V. Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 80 (5), p. 1747–1749, 1995.

ZETOUNI, L.; CAMARGO, G. M. F.; FONSECA, P. D. S.; CARDOSO, D. F.; GIL, F. M. M.; HURTADO-LUGO, N. A.; ASPILCUETA-BORQUIS, R. R.; CERVINI, M.; TONHATI, H. Polymorphisms in the MTRN1A gene and their effects on the productive and reproductive traits in buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, p. 337–340, 2014.

ZICARELLI, L. Management in different environmental condition. **Buffalo Journal**, v. 44 (suplemento 2), p. 17-38, 1994.

3. Artigo 1 - Caracterização Molecular da Região Promotora do Gene do Receptor da Melatonina (MTRN1A) e Associações de Polimorfismos com Características de Fertilidade em Búfalas na Amazônia

(de acordo com as normas da revista *Fertility and Sterility*)

E.M. Barbosa^{a*}, B.B. Souza^b, R.C. Guimarães^b, J.S.N. Azevedo^c, E.C. Gonçalves^d, H.F.L. Ribeiro^b, S.T. Rolim Filho^b and E. Silva Filho^b

^aUniversidade Federal do Pará, Núcleo de Ciência Animal, Belém-PA, Brasil

^bUniversidade Federal Rural da Amazônia, Instituto de Saúde e Produção Animal, Belém-PA, Brasil

^cUniversidade Federal Rural da Amazônia, Campus de Capanema-PA, Brasil

^dUniversidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém-PA, Brasil

*Autor para Correspondência: Elizabeth Machado Barbosa

Email para correspondência: liza_barbosa@hotmail.com

RESUMO

A criação de búfalos vem se difundindo mundialmente devido a sua vantagem econômica, desta forma se faz necessário melhorar a eficiência reprodutiva e produtiva desses animais, além de buscar fatores genéticos que aumentem tal eficiência. Os objetivos deste estudo foram caracterizar a região promotora do gene receptor da melatonina 1A (MTRN1A) em bubalinos, detectar possíveis SNPs e associá-los às características de fertilidade e identificar sítios de ligação de fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão gênica. Foi realizado o método de PCR convencional utilizando-se dois *primers* desenhados a partir da sequência referência depositada no *Genebank* AY52466.1. Os produtos dos PCRs foram purificados e sequenciados e posteriormente, as sequências foram editadas e alinhadas no programa *Bioedit*. Foram encontrados 26 SNPs, onde 73% apresentaram frequência alélica dos nucleotídeos selvagens superiores a 0,5 e 73% dos SNPs apresentaram desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$) e Fis variando de 0,06 a 1,00, caracterizando altos graus de endocruzamento na população. Um bloco de deleção ACAA (posição -1483) foi observado em 25% das amostras. As associações desses SNPs com as características reprodutivas foram observadas para intervalo entre partos (IEP) cinco SNPs: -1289, -1139, -911, -724, -656 ($p < 0,05$) e outros três SNPs: -1395, -724, -94 ($p < 0,05$) foram associados significativamente com idade ao primeiro parto (IPP), e não associados com concentração de parto (CP). Foi caracterizada a região promotora quanto aos diferentes tipos de fatores de ligação, onde somente 11 são sítios fortes de ligação de fatores de transcrição. O bloco de deleção ACAA também se apresenta fortemente associado a fatores de transcrição. Portanto, seria necessário testar os referentes SNPs com outras características reprodutivas em búfalas de relevância econômica para validar o gene como forte candidato para a seleção.

Palavras – chave: MTRN1A, Região Promotora, SNP, Búfalas.

INTRODUÇÃO

A criação de búfalos vem se difundindo mundialmente devido à vantagem econômica que tal criação pode oferecer em relação à de outros ruminantes domésticos, principalmente pelo fato de os búfalos apresentarem características como rusticidade e adaptação às variadas condições climáticas e de manejo (15). O Brasil apresenta um efetivo de 1.3 milhões de bubalinos, sendo a região norte o maior criador de bubalinos, com um efetivo 64,1% do rebanho nacional e o Estado do Pará tem um efetivo de 36% do rebanho Nacional e 56,1% do rebanho regional. Portanto, sendo o Estado com maior produção de bubalinos no Brasil (27).

Para a consolidação dessa atividade no Brasil, é necessário melhorar a eficiência dos animais. Para isto é indispensável o conhecimento do potencial produtivo e reprodutivo, além dos fatores genéticos e ambientais que influenciam as características que o representam (54). A importância das características reprodutivas, em programas de melhoramento genético, está relacionada principalmente com as taxas de ganho genético anual. Menores idades ao primeiro parto permitem a redução do intervalo de gerações, enquanto que menores intervalos entre parto disponibilizam maiores números de novilhas de alto potencial genético que possam substituir as fêmeas a serem descartadas (7).

O fotoperíodo apresenta forte influência no padrão reprodutivo das espécies, através da secreção da glândula pineal, que controla a mudança entre os períodos claro e escuro (4,44,63). No entanto em regiões próximas a linha do Equador, as fêmeas bubalinas são animais de comportamento poliestrual contínuos (57). Na Amazônia brasileira, de acordo com a localização geográfica da criação, o padrão de parições se altera. No estado do Pará, em criações de terra firme as concentrações de parições concentram-se no primeiro semestre do ano com índices maiores entre os meses de abril e agosto (47).

Busca-se, então, uma resposta para aumentar a produção de bubalinos na região Amazônica, através da aplicabilidade dos marcadores moleculares em programa de seleção (17,18). Sabe-se que o receptor da melatonina (MTRN1A) parece exercer um efeito estimulatório no eixo reprodutivo das espécies de dias curtos. Estudos com diversas raças de caprinos, ovinos e bubalinos têm demonstrado que um polimorfismo nesse gene resulta em animais com menor sazonalidade (48,62). Além disso, é importante analisar a região promotora do MTRN1A, visto que este regula a síntese do RNAm através de ligações com proteínas reguladoras e fatores de transcrição. Existem poucas pesquisas abordando a importância da região promotora dos mais variados genes (24,32,53,55).

A região promotora do MTRN1A em ovinos foi primeiramente descrita por Johnston et al. (31), caracterizando-a com um tamanho de aproximadamente 1.5 kb. Foram detectados dois fatores de transcrições envolvidos no desenvolvimento da hipófise (Pitx-1 e Egr-1) e múltiplos supostos boxes de ligações que estão envolvidos ambos na regulação de genes de desenvolvimento e no ciclo circadiano. Em bubalinos, os estudos com o gene MTRN1A são mais direcionados a um polimorfismo no éxon II na posição 318 o qual é uma mutação sinonímia e não altera a sequência de aminoácidos do receptor (6,37,62).

O objetivo deste estudo foi caracterizar a região promotora do gene MTRN1A em bubalinos e localizar possíveis SNPs, associá-los as características de fertilidade em búfalas na Amazônia e identificar sítios de ligações de fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão gênica.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal sob o protocolo número 033/2015 na Universidade Federal Rural da Amazônia com o número de processo 23084.006321 / 2015-25.

Foram coletados aproximadamente 60 pelos com bulbos capilares de 60 búfalos da região de Terra Firme no Estado Pará, e conservados a 4°C até o processamento laboratorial. Em seguida, foi realizada a seleção de aproximadamente 40 melhores bulbos capilares de cada animal e realizada a extração de DNA pelo método fenol: clorofórmio: álcool isoamil (25:24:1) de acordo com o protocolo de Sambrook et al. (50).

A região promotora do gene do receptor da melatonina 1A em búfalos foi baseada na sequência do mesmo gene em ovinos, estando a mesma depositada no *Genebank* sob número de referência AY52466.1. Foram desenhados dois pares de *primers* através do programa Primer3 (<http://simgene.com/Primer3>) como representado pela figura 2 e as sequências dos mesmos estão descritos na tabela 1. Em seguida, foram realizadas as reações em cadeia da polimerase (PCR) de ambos pares de *primers* para um volume final de reação de 15 µL sob as seguintes condições de reagentes: 1X de tampão de reação 10X, 1 mmol de MgCl₂, 10 mmol de cada dNTPs, 5 pmol de ambos *primers* (jusante e montante), 2 U de Taq DNA polimerase (Life Technology, Brasil) e 20% de Solução-Q (Quiagen, Brasil) diluídos em água ultrapura. As reações foram realizadas no Termociclador 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems) sob as condições de temperaturas descritas na tabela 2. Os produtos dos PCRs foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% corados com Gelred (Biotium – California/USA) a 90 V em 30 min, seguido de visualização em transluminador de luz UV com fotodocumentador (Biosystem).

Figura 2. Esquema da região promotora do gene do receptor da melatonina 1 em búfalos e as respectivas regiões amplificadas para sequenciamento.

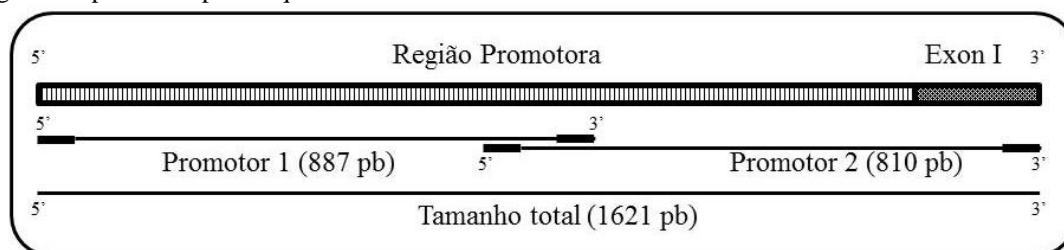


Tabela 1. Sequências dos *primers* dos dois amplicons da região promotora do gene do receptor da melatonina 1 em bubalinos e suas respectivas posições e tamanhos.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Posições	Tamanho (PB)
Promotor 1			
Melat1For	GCACAAAAAGAAGCCAAGG	-1545: -1527	887
Melat1Rev	CCAGGTTCTCATCTGTAAAATG	-681: -659	
Promotor 2			
Melat2For	TTTTTCATCTCTTACCATCTAG	-734: -714	810
Melat2Rev	GCGAGACGTTGAGCAGC	60: 76	

Tabela 2. Condições de temperatura e tempo das reações par ambos os *primers* do promotor do receptor da melatonina 1 em búfalos.

Fases	Temperaturas (°C)	Tempo (min)	Ciclos
Desnaturação inicial	95,0	5	
Desnaturação	94,0	1	
Ciclo	Promotor 1 (P1): 58,0 Promotor 2 (P2): 54,0	1	30
	Extensão	1	
Extensão final	72,0	10	

Os 60 produtos dos PCRs referentes aos *primers* correspondentes foram purificados com a enzima *Illustra ExoProStar 1-Step* (GE Healthcare – UK), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados utilizando kit *BIG DYE* (Life Technology) em sequenciador automático de DNA ABI 3500 XL (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa computacional Finch TV Versão 1.4.0 (Geospiza Research Team, USA), sendo sempre comparadas com as sequências contidas no *Genebank* através do sistema *BLAST* e em seguida foram alinhadas no programa Bioedit (22) para comparação das mesmas entre os animais para detectar os possíveis polimorfismos.

Os SNPs e deleção detectados na região promotora do gene receptor da Melatonina 1A (MTRN1A) em búfalos foram tabulados e submetidos ao programa GENEPOP v.5 (46), o qual determinou as frequências alélicas, genotípicas, os coeficientes de endocruzamento (Fis) e as probabilidades para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (P= 0,001). Os SNPs detectados foram associados com as características de Intervalo entre parto, Idade ao Primeiro Parto e Concentrações de Partos através do teste ANOVA com o aplicativo *PROC MIXED* do pacote estatístico do SAS 9.2 (51) obedecendo ao modelo matemático abaixo.

$$\gamma_{ijk} = \mu + G_i + L_j + (G \times L)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Onde:

γ_{ijk} = Características fenotípicas

μ = média das características fenotípicas

G_i = efeito fixo dos genótipos na $i^{\text{ésima}}$ genótipo

L_j = efeito fixo do ambiente na $j^{\text{ésima}}$ ambiente

$(G \times L)_{ij}$ = efeito da interação entre os genótipos e o ambiente

ε_{ijk} = erro aleatório com $ijk^{\text{ésima}}$ observações.

O bloco de deleção foi analisado pelo teste *t* de Student e a característica concentração de parto foi analisada pelo teste qui-quadrado através do programa computacional *BioEstat 5.0*. O nível de significância adotado foi de 0,05.

Os domínios de ligação dos fatores de transcrição na região promotora foram identificados por comparação com diferentes espécies com auxílio do programa *TRANSFAC 4.0* (60) e caracterizados os possíveis domínios de ligação dos fatores de transcrição quanto aos possíveis polimorfismos detectados e o bloco de deleção.

RESULTADOS

Todas as sequências obtidas foram editadas e alinhadas. Foram encontrados 26 SNPs de substituições pontuais do tipo transição e transversão. Todas as frequências alélicas e genótípicas, o coeficiente de endocruzamento (Fis) e a probabilidade de Hardy-Weiberg foram estimados e estão descritas na tabela 3. Detectou-se que 73% dos 26 SNPs apresentam frequências alélicas dos nucleotídeos selvagens superiores a 0,5 e 73% dos SNPs apresentaram desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg o qual está diretamente associado aos altos graus de endocruzamento na população. Um bloco de deleção com a sequência ACAA foi observado entre as posições -1483 e -1480 em 25% das amostras.

Tabela 3. Posições dos SNPs e as respectivas descrições estatísticas na região promotora do gene do receptor da melatonina em búfalos.

Posições (SNP)	Alelos (frequência)		Genótipos (frequência)			Fis	PHW
-1511 (C→T)	C(0,350)	T(0,650)	CC(0,350)	CT(0,000)	TT(0,650)	1,00	0,000
-1465 (G→T)	G(0,933)	T(0,077)	GG(0,900)	GT(0,067)	TT(0,033)	0,47	0,015
-1422 (A→G)	A(0,792)	G(0,208)	AA(0,683)	AG(0,217)	GG(0,100)	0,35	0,014
-1411 (G→A)	G(0,292)	A(0,708)	GG(0,183)	GA(0,217)	AA(0,600)	0,48	0,000
-1395 (G→T)	G(0,842)	T(0,158)	GG(0,783)	GT(0,117)	TT(0,100)	0,57	0,000
-1298 (A→G)	A(0,867)	G(0,133)	AA(0,767)	AG(0,200)	GG(0,033)	0,14	0,267
-1295(G→A)	G(0,892)	A(0,108)	GG(0,800)	GA(0,183)	AA(0,017)	0,06	0,516
-1242 (A→C)	A(0,883)	C(0,117)	AA(0,800)	AC(0,167)	CC(0,033)	0,20	0,165
-1150 (C→T)	C(0,775)	T(0,225)	CC(0,617)	CT(0,317)	TT(0,067)	0,10	0,464
-1147 (G→C)	G(0,908)	C(0,092)	GG(0,833)	GC(0,150)	CC(0,017)	0,11	0,398
-1136(A→G)	A(0,450)	G(0,550)	AA(0,267)	AG(0,367)	GG(0,367)	0,27	0,069
-911 (G→A)	G(0,842)	A(0,158)	GG(0,750)	GA(0,183)	AA(0,067)	0,32	0,029
-909 (A→G)	A(0,767)	G(0,233)	AA(0,617)	AG(0,300)	GG(0,083)	0,17	0,265
-724 (C→G)	C(0,908)	G(0,092)	CC(0,867)	CG(0,083)	GG(0,050)	0,50	0,004
-656 (A→C)	A(0,650)	C(0,350)	AA(0,587)	AC(0,167)	CC(0,267)	0,64	0,000
-649 (T→C)	T(0,725)	C(0,275)	TT(0,583)	TC(0,283)	CC(0,133)	0,30	0,046
-644 (G→A)	G(0,442)	A(0,558)	GG(0,333)	GA(0,217)	AA(0,450)	0,57	0,000
-511 (A→C)	A(0,150)	C(0,850)	AA(0,083)	AC(0,133)	CC(0,783)	0,48	0,002
-481 (G→A)	G(0,925)	A(0,075)	GG(0,900)	GA(0,050)	AA(0,050)	0,65	0,001
-425 (C→T)	C(0,975)	T(0,025)	CC(0,967)	CT(0,017)	TT(0,017)	0,66	0,026
-395 (G→A)	G(0,975)	A(0,025)	GG(0,967)	GA(0,017)	AA(0,017)	0,66	0,027
-383 (G→T)	G(0,550)	T(0,450)	GG(0,433)	GT(0,233)	TT(0,333)	0,54	0,000
-254 (C→T)	C(0,942)	T(0,058)	CC(0,917)	CT(0,050)	TT(0,033)	0,55	0,007
-206 (T→C)	T(0,383)	C(0,617)	TT(0,250)	TC(0,267)	CC(0,483)	0,44	0,001
-133 (T→G)	T(0,358)	G(0,642)	TT(0,283)	TG(0,150)	GG(0,567)	0,68	0,000
-94 (C→T)	C(0,525)	T(0,475)	CC(0,383)	CT(0,283)	TT(0,333)	0,44	0,001

SNPs= Polimorfismos de Único Nucleotídeo, Fis= Coeficiente de endocruzamento, PHW= Probabilidade de Hardy-Weinberg,

As associações dos SNPs com as características reprodutivas nas búfalas avaliadas estão descritas na tabela 4. As Concentrações de Partos (CP) foram caracterizadas em alta concentração entre os meses de abril a agosto e a baixa concentração de partos entre os

meses setembro e março ($P < 0,05$). As comparações genóticas quanto aos dois períodos de concentrações de partos foram submetidas ao teste qui-quadrado e não houve SNP associado a um dos dois intervalos de concentrações de partos ($P > 0,05$). Para a característica Intervalo entre Parto (IEP), somente cinco SNPs (-1298, -1136, -911, -724 e -656) foram significativamente associados ($P < 0,05$) e outros três SNPs (-1395, -724 e -94) foram associados significativamente ($P < 0,05$) com a característica Idade ao Primeiro Parto (IPP).

Para a característica de IEP, nos SNPs: - 1298 (G→A), observou-se que o homocigoto AA, possui o menor valor ($15,66 \pm 3,78$); para - 1136 (A → G) o heterocigoto AG possui o menor IEP ($14,84 \pm 2,51$); - 911 (G → A), os genótipos AG ($17,35 \pm 3,40$) e GG ($15,88 \pm 3,85$) apresentam o menor valor; já para -724 (C→G), o homocigoto GG é o valor intermediário entre os genótipos e para - 656 (A → C), o homocigoto CC se comporta com valor intermediário para tal característica entre os demais genótipos.

Em relação a IPP, nos SNPs: -1395 (G→T), o heterocigoto GT ($31,93 \pm 2,53$) comporta-se com valor intermediário entre os genótipos apresentados; para - 724 (C → G) o homocigoto CC ($34,04 \pm 3,34$) e o heterocigoto CG ($32,33 \pm 3,40$) possuem a menor IPP e para -94 (C→T), o homocigoto TT ($34,43 \pm 3,72$) possui um comportamento intermediário entre os demais genótipos.

Observa-se também que o gene mutante, estando o alelo em homocigose ou estando presente no genótipo heterocigoto, proporcionam um melhor efeito nas características apresentadas, deixando-os em valores menores ou intermediários, demonstrando um efeito positivo sobre as características de IEP e IPP.

Tabela 4. Associações dos polimorfismos com as características reprodutivas nas búfalas.

SNPs	Genótipos	IEP (meses) Médias (\pm DP)	IPP (meses) Médias (\pm DP)	CP (abr. a ago. e set. a mar.)
- 1511	CC	17,48 \pm 4,74	33,94 \pm 3,77	$\chi^2 = 0,140$ GL= 2
	CT	0	0	
	TT	16,31 \pm 4,79	34,39 \pm 3,68	0,708
	Probabilidades	0,268	0,661	
-1465	GG	16,36 \pm 4,60	34,04 \pm 3,68	$\chi^2 = 0,186$ GL= 2
	GT	18,17 \pm 3,73	36,92 \pm 3,86	
	TT	22,21 \pm 10,00	34,72 \pm 2,74	0,911
	Probabilidades	0,091	0,312	
- 1422	AA	17,41 \pm 5,32	34,69 \pm 3,55	$\chi^2 = 0,195$ GL= 2
	AG	14,40 \pm 1,68	32,66 \pm 2,64	
	GG	16,30 \pm 3,87	34,43 \pm 5,53	0,907
	Probabilidades	0,062	0,236	
- 1411	AA	16,86 \pm 4,13	33,56 \pm 3,85	$\chi^2 = 0,522$ GL= 2
	AG	15,26 \pm 4,49	34,95 \pm 3,15	
	GG	17,69 \pm 6,58	35,50 \pm 3,55	0,770
	Probabilidades	0,268	0,203	
- 1395	GG	17,15 \pm 5,13	34,97^a \pm 3,65	$\chi^2 = 0,339$ GL= 2
	GT	14,22 \pm 1,32	31,93^{ab} \pm 2,53	
	TT	15,82 \pm 3,51	31,35^b \pm 2,72	0,844
	Probabilidades	0,155	0,009	
- 1298	AA	15,66^b \pm 3,78	33,96 \pm 3,53	$\chi^2 = 2,075$ GL= 2
	AG	19,09^a \pm 4,30	35,63 \pm 4,00	
	GG	25,57^a \pm 14,75	32,68 \pm 5,62	0,354
	Probabilidades	0,0002	0,301	
- 1295	AA	13,34 \pm 0,00	34,22 \pm 0,00	$\chi^2 = 0,224$ GL= 2
	AG	14,79 \pm 2,63	33,82 \pm 4,88	
	GG	17,13 \pm 5,04	34,34 \pm 3,49	0,894
	Probabilidades	0,158	0,918	
- 1242	AA	16,97 \pm 5,00	34,39 \pm 3,45	$\chi^2 = 1,011$ GL= 2
	AG	15,90 \pm 3,59	32,95 \pm 4,86	

	GG	12,95 ± 0,55	36,75 ± 3,57	
	Probabilidades	0,293	0,345	0,603
- 1150	CC	17,27 ± 5,16	33,46 ± 3,83	$\chi^2= 0,392$
	CT	15,83 ± 4,27	35,13 ± 2,62	GL= 2
	TT	15,30 ± 2,54	37,39 ± 4,97	
	Probabilidades	0,305	0,053	0,822
- 1147	CC	13,34 ± 0,00	34,22 ± 0,00	$\chi^2= 1,499$
	CG	14,24 ± 1,74	32,46 ± 3,45	GL= 2
	GG	17,18 ± 5,03	34,57 ± 3,70	
	Probabilidades	0,081	0,276	0,473
- 1136	AA	17,90^a ± 5,00	34,08 ± 3,98	$\chi^2= 2,122$
	AG	14,84^b ± 2,51	33,87 ± 3,60	GL= 2
	GG	17,63^a ± 5,83	34,76 ± 3,67	
	Probabilidades	0,018	0,712	0,346
- 911	AA	23,83^a ± 10,53	32,45 ± 3,28	$\chi^2= 4,128$
	AG	17,35^b ± 3,40	35,70 ± 3,22	GL= 2
	GG	15,88^b ± 3,85	34,06 ± 3,78	
	Probabilidades	0,0007	0,242	0,127
- 909	AA	17,30 ± 5,13	33,65 ± 4,06	$\chi^2= 0,226$
	AG	15,68 ± 4,35	35,09 ± 2,69	GL= 2
	GG	15,66 ± 2,87	35,65 ± 3,52	
	Probabilidades	0,268	0,262	0,893
- 724	CC	16,24^b ± 4,20	34,04^b ± 3,34	$\chi^2= 2,168$
	CG	20,95^a ± 8,74	32,33^b ± 3,40	GL= 2
	GG	17,11^{ab} ± 3,97	41,14^a ± 3,52	
	Probabilidades	0,039	0,002	0,338
- 656	AA	17,86^a ± 5,63	34,59 ± 4,13	$\chi^2= 2,350$
	AC	13,61^b ± 1,11	33,53 ± 3,44	GL= 2
	CC	16,08^{ab} ± 3,01	33,99 ± 2,87	
	Probabilidades	0,007	0,690	0,309
- 649	CC	16,65 ± 3,21	34,32 ± 1,88	$\chi^2= 2,861$
	CT	15,20 ± 4,03	34,78 ± 3,57	GL= 2
	TT	17,38 ± 5,24	33,99 ± 4,03	
	Probabilidades	0,145	0,763	0,239
- 644	AA	17,09 ± 4,54	33,59 ± 3,70	$\chi^2= 0,575$
	AG	15,68 ± 4,47	33,17 ± 2,41	GL= 2
	GG	16,77 ± 5,36	35,84 ± 3,96	
	Probabilidades	0,553	0,051	0,750
- 511	AA	15,71 ± 3,38	34,05 ± 5,93	$\chi^2= 0,756$
	AC	15,49 ± 3,26	33,66 ± 3,77	GL= 2
	CC	16,98 ± 5,10	34,37 ± 3,48	
	Probabilidades	0,517	0,872	0,685
- 481	AA	15,97 ± 4,00	37,29 ± 5,54	$\chi^2= 0,711$
	AG	17,69 ± 4,48	31,39 ± 4,27	GL= 2
	GG	16,66 ± 4,88	34,24 ± 3,51	
	Probabilidades	0,857	0,148	0,701
- 425	CC	16,78 ± 4,81	34,21 ± 3,74	$\chi^2= 0,284$
	CT	12,63 ± 0,00	34,02 ± 0,00	GL= 2
	TT	15,14 ± 0,00	36,66 ± 0,00	
	Probabilidades	0,529	0,805	0,868
- 395	AA	15,14 ± 0,00	36,66 ± 0,00	$\chi^2= 0,284$
	AG	12,63 ± 0,00	34,02 ± 0,00	GL= 2
	GG	16,78 ± 4,81	34,21 ± 3,74	
	Probabilidades	0,529	0,805	0,868
- 383	GG	16,54 ± 3,84	34,61 ± 3,39	$\chi^2= 0,680$
	GT	15,28 ± 6,00	33,52 ± 4,26	GL= 2
	TT	17,91 ± 4,89	34,29 ± 3,76	
	Probabilidades	0,150	0,669	0,712
- 254	CC	16,74 ± 4,88	34,46 ± 3,69	$\chi^2= 0,434$
	CT	16,65 ± 4,78	29,78 ± 1,45	GL= 2

	TT	15,02 ± 0,75	35,14 ± 0,007	
	Probabilidades	0,828	0,087	0,805
- 206	CC	16,91 ± 4,40	33,92 ± 3,98	$\chi^2 = 0,204$ GL= 2
	CT	16,36 ± 5,86	34,02 ± 3,53	
	TT	16,57 ± 4,45	35,14 ± 3,32	
	Probabilidades	0,890	0,555	0,903
- 133	GG	16,78 ± 4,25	33,63 ± 3,89	$\chi^2 = 0,985$ GL= 2
	GT	16,79 ± 7,50	34,44 ± 3,03	
	TT	16,42 ± 4,27	35,40 ± 3,47	
	Probabilidades	0,947	0,256	0,611
- 94	CC	16,39 ± 4,22	35,39^a ± 3,56	$\chi^2 = 1,273$ GL= 2
	CT	15,93 ± 5,37	32,51^b ± 3,33	
	TT	17,65 ± 4,90	34,43^{ab} ± 3,72	
	Probabilidades	0,362	0,045	0,529
Bloco ACAA	Presença	18,07 ± 5,04	33,71 ± 3,69	T= - 1,305 GL= 58
	Ausência	16,22 ± 4,64	34,44 ± 3,71	(IEP)
	Probabilidades	0,100	0,260	T= - 0,662 GL= 58 (IPP)

SNPs= Polimorfismos de Único Nucleotídeo; IEP= Intervalo entre Partos; IPP= Idade ao Primeiro Parto; CP= Concentração de Partos; Abr.= Abril; Ago= Agosto; Set.= Setembro; Mar.= Março; Em negrito estão representados as significâncias ($P < 0,05$).

Um bloco de deleção de sequência ACAA na posição -1483 foi detectado em 25% do rebanho e associado pelo teste *t* de Student para a IEP e IPP. Os resultados do teste não foram significativos ($P > 0,05$) e o teste qui-quadrado para a CP também não foi significativo ($P > 0,05$), ou seja, o bloco de deleção não apresenta nenhuma influência nas características reprodutivas nas búfalas analisadas.

Uma análise de caracterização da região promotora do MTRN1A em búfalos, quanto aos diferentes sítios de ligação de fatores de transcrição, foram testados pelo programa TRANSFAC 4.0 (60), e dos 26 SNPs detectados, somente 11 são sítios fortes de ligações de fatores de transcrições, quando comparadas com outras regiões promotoras de outros genes de outras espécies. Da mesma maneira o bloco de deleção ACAA também se apresenta fortemente associado a vários fatores de ligação, os quais influenciam na transcrição do gene (Tabela 5).

Tabela 5. SNPs que apresentaram associações a fatores de ligações que regulam a transcrição do gene em comparação com outros promotores de diferentes espécies de eucariontes.

Posição	Fator de Ligação
-1465	NF-1, NF-ATp
-1422	TGIF
-1298	TGIF, PBF-1, BPF2
-1295	AREB6
-1150	T-Ag, GCBP-1, SP1
-1147	Cad
-1136	HNF-3alpha, HNF-3beta
-909	ADR1
-383	LIP15, GBF1
-254	GT-1, GT-1a, SBF-1, GT-2
-133	OSBZ8, TRAB1, GBF-1, GT-2
Bloco de Deleção (ACAA)	GR, AR, RAR-alpha1, RAR-beta2, RAR-gamma1, RXR-alpha, T3R-alpha, CAR

DISCUSSÃO

As substituições pontuais podem ser encontradas ao longo de todo genoma, porém, quando detectada no gene (éxon), a mesma pode influenciar na modificação da sequência de aminoácidos (26). No entanto, quando as substituições ocorrem na região promotora dos genes, neste caso, poderão ocorrer alterações na expressão dos genes (33). O que poderia resultar em diferentes desempenhos produtivos ou reprodutivos das búfalas quanto ao tempo de intervalos de partos.

As frequências alélicas e genotípicas foram altas para os alelos e genótipos selvagens na maioria dos SNPs, o que explica o alto grau de consanguinidade, sendo assim, as frequências genotípicas observadas e esperadas apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$), resultando nos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, como observado também para marcadores microssatélites (52).

Em relação aos parâmetros reprodutivos, a concentração de parição associada com os polimorfismos não foi observada nenhum tipo de associação desta característica com os SNPs encontrados na região promotora do MTRNIA, muito embora, podemos observar que a maior concentração de partições encontra-se entre os meses de abril a agosto corroborando com Ribeiro (57) e Rolim Filho et al. (49).

Desta forma, podemos justificar essa concentração de parição mediante a presença de outros fatores como a precipitação pluviométrica, umidade do ar e temperatura que têm efeitos pronunciados sobre o comportamento reprodutivo desta espécie (49). Estas variações, também se justificam pelo tipo de manejo e do nível tecnológico empregadas neste tipo de criação, podendo estar associadas também ao tipo de nutrição e a doenças (47).

Exemplo desta interação do manejo a condição ambiental, Cassiano et al. (8) em seu experimento na Embrapa (Monte Alegre-PA), demonstram que aproximadamente 78% dos nascimentos ocorrem entre os meses de julho a dezembro. Nesse local, o rebanho é mantido em sistema de integração entre várzea e terra-firme. A sazonalidade dos partos revela que o maior número de concepções ocorre entre os meses setembro e fevereiro, exatamente quando os animais ocupam as áreas de várzea, que começam a ser descobertas pelas águas em virtude da vazante do rio Amazonas. Nesta época, os campos nativos de várzea apresentam excelentes condições para a exploração pecuária, onde é evidenciada a abundância de forrageiras de bom valor nutritivo, às quais os animais passam a ter acesso.

O intervalo entre partos é um dos parâmetros mais importantes para se medir a eficiência reprodutiva, pois este reflete diretamente nos custos de produção, sendo aceitável que a búfala produza 2 bezerros a cada 3 anos (45). Em geral, os IEPs, apresentados e associados aos SNPs com $P < 0,05$ mostram-se com resultados superiores aos encontrados por Marques (38) observou intervalo de partos médios de $13,29 \pm 2,77$ meses, Carmargo Junior et al. (5) com $13,14 \pm 0,78$ meses e Bezerra Junior et al. (5) com média de $13,89 \pm 2,99$ meses.

Os resultados apresentados por Rolim Filho et al. (49) analisando 2.115 registros de 1974 a 2005, observaram um intervalo de parto médio de $16,54 \pm 3,74$ meses estão em média geral corroborando com os encontrados dentro dos SNPs com $P < 0,05$, e os resultados encontrados no estudo de Oliveira Neta et al. (43) com 70 búfalas em lactação no município de Moju-PA, obteve-se um intervalo entre partos superior aos autores supracitados com média de 18,6 meses.

A idade ao primeiro parto é outro parâmetro de importante destaque nas relações entre características produtivas e reprodutivas em um rebanho. Búfalas precoces na

puberdade produzirão mais crias e leite em sua vida produtiva que aquelas que entraram tardiamente na reprodução (produtividade do rebanho) (45).

Os resultados apresentados dentro dos SNPs com $P < 0,05$, dois destes resultados apresentados, são inferiores e dois semelhantes aos encontrados por Camargo Junior et al. (5) que observaram em seus estudos com 6 diferentes raças de bubalinos um valor de $34,58 \pm 3,96$ meses. Porém, Marques (38) observou uma média de $37,94 \pm 5,53$ meses e Rolim Filho et al., (49) observaram média de $39,52 \pm 7,54$ meses, ou seja, apresentam resultados superiores aos encontrados em nosso estudo.

Foi caracterizada a região promotora e associado a fatores de ligação de acordo com os autores na Tabela 4. Os fatores na posição -1465 foram determinados por Cockrill et al. (10), Niller (40) e Ghazal et al. (19). Na posição -1422 por Bertolino et al. (2). Na posição -1298 por Bertolino et al. (2) e Desveaux et al. (13). Na posição -1295 por Ikeda e Kawakami (28). Na posição -1150 por Cowie e Kamen (11); Dilworth et al. (14); Olive et al. (42) Walker et al. (59). Na posição -1147 por Topol et al. (56). Na posição -1136 por McLane et al. (39). Na posição -909 por Eisen et al. (16). Na posição -383 por Kusano et al. (35) e De Vetten et al. (12). Na posição -254 por Gilmartin et al. (20); Kuhn et al. (34) e na posição -133 por Hobo et al. (25); De Vetten et al. (12). O bloco de deleção (ACAA) na posição -1483 foi associado aos diferentes tipos de fatores de ligação como determinados por Jaiswal et al. (30); Haendler et al. (21); Vivanco et al. (58); Leroy et al. (36); Baes et al. (1); Harding; Duester (23); Duester et al. (15).

Observamos dentro dos SNPs que apresentaram tal representatividade estatística, dois sítios de ligações: o SNP -1298 com os fatores de ligação TGIF, PBF-1, BPF2 e o -1136 com HNF-3alpha, HNF-3beta.

O TGIF uma proteína de homeodomínio de ligação que desempenham um papel na transformação do fator de crescimento B, atua na transcrição multifuncional repressora e também no recrutamento da atividade do HDAC (desacetilases de histona) (61). O PBF-1 foi identificado em extratos de tubérculos de batata, e se ligar a um fragmento do PR-7^o, e está envolvida na indução eliciador de acumulação de transcrição PR-7^o (9).

A regulação dos fatores de transcrição HNF-3Alpha e HNF-3beta foi estudada durante a diferenciação mediada pelo ácido retinóico de células de rato P19. Tratamento com ácido retinóico converte células-tronco P19 em neurônios e astrócitos; a expressão do gene de ambos HNF-3Alpha e HNF-3beta são ativadas durante este processo. Por analogia com o HNF-3Alpha, ativação HNF-3beta também ocorre em nível da iniciação da transcrição. Estudos recentes implicam HNF-3Alpha e HNF-3beta agem no início da neurogênese mamíferos (29).

CONCLUSÃO

A região promotora do gene receptor da melatonina 1A (MTRN1A) foi caracterizada pela primeira vez na espécie bubalina, e observou-se 26 SNPs e o bloco de deleção (ACAA). Alguns SNPs foram associados às características reprodutivas como intervalo entre parto e idade ao primeiro parto e não foram associados a concentração de partos. No total de SNPs detectados, 11 destes apresentam-se fortemente associado a vários fatores de ligação, os quais influenciam na transcrição da regulação gênica.

Portanto, seria necessário testar os referentes SNPs com outras características reprodutivas em búfalas de relevância econômica para validar o gene como forte candidato para a seleção.

AGRADECIMENTOS

Estamos muito gratos pelas amostras fornecidas pelos produtores das fazendas de Terra Firme, no Estado do Pará . Nós também gostaríamos de estender a nossa gratidão ao Laboratório de Tecnologia Biomolecular da Universidade Federal do Pará, que cedeu suas instalações laboratoriais.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse .

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baes M, Gulick T, Choi HS, Martinoli MG, Simha D, Moore DD. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoid acid response elements. *Mol Cell Biol* 1994; 14:1544-1551.
2. Bertolino E, Reimund B, Wildt-Perinic D, Clerc RG. A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *J Biol Chem* 1995; 270:31178-31188.
3. Bezerra Junior JS, Fraga AB, Couto AG, Barros CC, Silva RMO. Produção de leite, duração da lactação e intervalo entre partos em búfalas mestiças Murrah. *Rev Caatinga* 2014; 27 (2):184–191.
4. Borghese A, Barile VL, Terzano GM, Pilla AM, Parmeggiani A. Melatonin trend during season in heifers and buffalo cows. *Bubalus bubalis* 1995; 1:61–64.
5. Camargo Junior RNC, Marques JRF, Marcondes CR, Araujo CV, Aguiar JF, Marques LC, Rodrigues AE. Índices de eficiência reprodutiva de búfalos da Amazônia Oriental do Brasil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2012; 64(4): 796 – 803.
6. Carcangiu V, Mura MC, Pazzola M, Vacca GM, Paludo M, Marchi B, Daga C, Bua S, Luridiana S. Characterization of the Mediterranean Italian buffaloes melatonin receptor 1^a (MTNR1A) gene and its association with reproductive seasonality. *Theriogenology* 2011; 76: 419–426.
7. Cassiano LAP, Mariante AS, McManus C, Marques JRF, Costa NA. Parâmetros genéticos das características produtivas e reprodutivas de búfalos na Amazônia brasileira. *Pesq Agropec Bras* 2004; 39(5):451 – 457.
8. Cassiano LAP, Mariante AS, McManus C, Marques JRF, Costa NA. Caracterização fenotípica de raças bubalinas nacionais e do tipo Baio. *Pesq. Agropec. Bras.* 2003; 38:1337- 1342.
9. Chasan R. Eliciting Phosphorylation. *The Plant Cell* 1995; 7: 495.
10. Cockerill PN, Bert AG, Jenkins F, Ryan GR, Shannon MF, Vadas MA. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancer function is associated with cooperative interactions between AP-1 and NFATp/c. *Mol Cel Biol* 1995; 15:2071-2079.
11. Cowie A, Kamen R. Multiple Binding Sites for Polyomavirus Large T Antigen Within Regulatory Sequences of Polyomavirus DNA. *J. Virol* 1984; 52:750-760.
12. De Vetten NC, Ferl RJ. Characterization of a maize G-box binding factor that is induced by hypoxia. *Plant J* 1995; 7:589-601.
13. Desveaux D, Despres C, Joyeux A, Subramaniam R, Brisson N. PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in PR-10a gene activation in potato. *Plant Cell* 2000; 12:1477-1489.

14. Dilworth SM, Cowie A, Kamen RI, Griffin BE. DNA binding activity of polyoma virus large tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81:1941-1945.
15. Duester G, Shean ML, McBride MS, Stewart MJ. Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene ADH3: implications for regulation of retinoic acid synthesis. *Mol Cell Biol* 1991; 11:1638-1646.
16. Eisen A, Taylor WE, Blumberg H, Young ET. The Yeast Regulatory Protein ADR1 Binds in a Zinc-Dependent Manner to the Upstream Activating Sequence of ADH2. *Mol Cell Biol* 1988; 8:4552-4556.
17. Garcia JF. Practical considerations of embryo manipulation: Preimplantation genetic typing. *Theriogenology* 2001; 56 (9):1393-1399.
18. Garcia JF, Porto-Neto LP. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. *Act Sci Vet* 2006; 34 (Suppl. 1): 197-203.
19. Ghazal P, Lubon H, Fleckenstein B, Hennighausen L. Binding of transcription factors and creation of a large nucleoprotein complex on the human cytomegalovirus enhancer. *Proc Nat Acad Sci USA* 1987; 84:3658-3662.
20. Gilmartin PM, Memelink J, Hiratsuka K, Kay AS, Chua NH. Characterization of a gene encoding a DNA binding protein with specificity for a light-responsive element. *Plant Cell* 1992; 4:839-849.
21. Haendler B, Schuttke I, Schleuning WD. Androgen receptor signalling: comparative analysis of androgen response elements and implication of heat-shock protein 90 and 14-3-3eta. *Mol Cell Endocri* 2001; 173:63-73.
22. Hall TA. Bioedit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999; 41:95-98.
23. Harding PP, Duester G. Retinoic acid activation and thyroid hormone repression of the human alcohol dehydrogenase gene ADH3. *J Biol Chem* 1992; 267:14145-14150.
24. Heintzman ND, Ren B. The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 386–400.
25. Hobo T, Kowiyama Y, Hattori T. A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 15348-15353.
26. Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty, C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol* 2009; 578: 23-39.
27. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *Produção da Pecuária Municipal*, Rio de Janeiro 2012; 40:1-71.
28. Ikeda K, Kawakami K. DNA binding through distinct domains of zinc-finger-homeodomain protein AREB6 has different effects on gene transcription. *Eur J Biochem* 1995; 233:73-82.
29. Jacob A, Budhiraja S, Reichel RR. Differential induction of HNF-3 transcription factors during neuronal differentiation. *Exp Cell Res* 1997; 234(2): 277-284.
30. Jaiswal AK, Haaparanta T, Luc PV, Schembri J, Adesnik M. Glucocorticoid regulation of a phenobarbital-inducible cytochrome P-450 gene: the presence of a functional glucocorticoid response element in the 5'-flanking region of the CYP2B2 gene. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 423 -7.
31. Johnston JD, Schuster C, Barrett P, Hazlerigg DG. Regulation of the ovine MT1 melatonin receptor promoter: Interaction between multiple pituitary transcription factors at different phases of development *Mol Cel Endocri* 2007; 268: 59–66.
32. Juven-Gershon T, Hsu JY; Theisen JW, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20:253–259.

33. Kininis M, Kraus WL. A global view of transcriptional regulatory by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis. *Nucl Rec Sig* 2008; 6:1-11.
34. Kuhn RM, Caspar T, Dehesh K, Quail PH. DNA binding factor GT-2 from *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 1993; 23:337-348.
35. Kusano T, Berberich T, Harada M, Suzuki N, Sugawara K. A maize DNA-binding factor with a bZIP motif is induced by low temperature. *Mol Gen Genet* 1995; 248: 507-517.
36. Leroy P, Nakshatri H, Chambon P. Mouse retinoic acid receptor alpha2 isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10138-10142.
37. Luridiana S, Mura MC, Pazzola M, Paludo M, Cosso G, Dettori ML, Bua S, Vacca GM, Carcangiu V. Association between melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene polymorphism and the reproductive performance of Mediterranean Italian buffaloes. *Reprod Fertil Develop* 2012; 24: 983–987.
38. Marques JRF. Avaliação genético-quantitativa de algumas características do desempenho produtivo de grupos genéticos de búfalos (*Bubalus bubalis*). 1991. 134 p. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista – Botucatu, 1991.
39. McLane KE, Burton DR, Ghazal P. Transplantation of a 17-amino acid alpha-helical DNA-binding domain into an antibody molecule confers sequence-dependent DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5214-5218.
40. Niller HH, Hennighausen L. Formation of several specific nucleoprotein complexes on the human cytomegalovirus immediate early enhancer. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 3715-3721.
41. Nowak R, Rodway RG. Effect of intravaginal implants of melatonin on the onset of ovarian activity in adult and prepubertal ewes. *J Reprod Fert* 1985; 74:287-293.
42. Olive MR, Peacock WJ, Dennis ES. The anaerobic responsive element contains two GC-rich sequences essential for binding a nuclear protein and hypoxic activation of the maize *Adh1* promoter. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:7053-7060.
43. Oliveira Neta AC, Ribeiro HFL, Rolim Filho ST, Chaves LC, Daher Junior E, Nunes KB. Intervalo entre partos e produção leiteira de búfalos criados no Estado do Pará. *Ciênc Anim* 2012; 22 (Suppl 1):212 – 215.
44. Parmeggiani A, Di Palo R, Zicarelli L, Campanile G, Esposito L, Seren E, Accorsi PAE, Soflai SM. Melatonin and reproductive seasonality in the buffalo cow. *Agric Ric* 1994; 153: 41–48.
45. Pereira RGA, Barbosa SBP, Lopes CRA, et al.. Intervalo entre partos em rebanho bubalino no Estado de Rondônia. Rondônia: EMBRAPA/RONDÔNIA. *Bol Pesq Desenv* 2008; 53:12.
46. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 1995; 86:248-249.
47. Ribeiro HFL. Característica do manejo reprodutivo em búfalos na Amazônia. In: 1º Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária, Anais... Curitiba: [s.n.], 2002; 101-104.
48. Rocha RMP, Matos MHTM, Lima LF, Saraiva MVA, Alves AMCV, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Melatonina e Reprodução Animal: Implicações na Fisiologia Ovariana. *Act Ve. Bras* 2011; 5 (2): 147-157.
49. Rolim Filho ST, Ribeiro HFL, Vale WG, Picanço NS, Barbosa EM, Ferreira RN. Desempenho reprodutivo de fêmeas bubalinas criadas em sistema misto (várzea e pastagem artificial) no Estado do Pará. I. Idade a primeira cria, intervalo entre partos,

- época de parição, eficiência reprodutiva e taxa de prenhez. *Ciênc Anim Bras* 2009; 10 (3) 754-763.
50. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. In: A Laboratory Manual*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
51. SAS INSTITUTE INC. 8.0. *User's guide*. SAS Institute Inc., Cary, 2000.
52. Silva Filho E, Silva, MH, Campelo JEG, Derosia MR, Pinheiro LML, Almeida MJO. Genetic characterization of Curraleiro Pé-Duro bovine breed from a conservation herd of Brazilian semiarid. *Gen Mol Res* 2014 13:2149-2154.
53. Smale ST, Kadonaga JT. The RNA Polymerase II Core Promoter. *Annu Rev Biochem* 2003; 72:449-79.
54. Snel-Oliveira MV, Wetzel-Gastal D, Sartori R, Neves JP. Procedimentos ginecológicos frequentes no desempenho produtivo e reprodutivo de fêmeas bubalinas murrá. *Cienc Anim Bras* 2013; 14(4): 468-472.
55. Thomas MC, Chiang CM. The general transcription machinery and general cofactors. *Ver Biochem Mol Biol* 2006; 41:105-178.
56. Topol J, Dearolf CR, Prakash K, Parker CS. Synthetic oligonucleotides recreate *Drosophila fushi tarazu* zebra-stripe expression. *Genes Dev* 1991; 5: 855-867.
57. Vale WG, Ribeiro HFL. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. *Rev Bras Reprod Anim* 2005; 29: 63 -73.
58. Vivanco Ruiz, MDM, Bugge TH, Hirschmann P, Stunnenberg HG. Functional characterization of a natural retinoic acid responsive elemento. *EMBO J* 1991; 10: 3829-3838.
59. Walker JC, Howard EA, Dennis ES, Peacock WJ. DNA sequences required for anaerobic expression of the maize alcohol dehydrogenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 84: 6624-6628.
60. Wingender E, Chen X, Fricke E, et al. The TRANSFAC system on gene expression regulation. *Nucleic Acids Research* 2001; 29:281-3.
61. Wotton D, Roger LO, Swaby CL, Massague J. Multiple Modes of Repression by the Smad Transcriptional Corepressor TGIF. *J. Biol Chem* 1999; 274: 37105-37110.
62. Zetouni L, Camargo GMF, Fonseca PDS, Cardoso DF, Gil FMM, Hurtado-Lugo N A, Aspilcueta-Borquis RR, Cervini M, Tonhati H. Polymorphisms in the MTRN1A gene and their effects on the productive and reproductive traits in buffaloes. *Trop Anim Health Prod* 2014; 46:337-340.
63. Zicarelli L. Management in different environmental condition. *Buffalo J* 1994; 44 (suppl 2): 17-38.

4. Artigo 2 - Polimorfismo no Gene do Receptor da Melatonina em Populações de Búfalos na Amazônia Brasileira

(de acordo com as normas da revista *Genetics and Molecular Research – GMR*)

E.M. Barbosa^{1*}, B.B. Souza², R.C. Guimarães², J.S.N. Azevedo³, E.C. Gonçalves⁴, H.F.L. Ribeiro², S.T. Rolim Filho² and E. Silva Filho²

¹Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciência Animal, Belém-PA, Brasil

²Universidade Federal Rural da Amazônia, Instituto de Saúde e Produção Animal, Belém-PA, Brasil

³Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus de Capanema-PA, Brasil

⁴Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém-PA, Brasil

*Autor para Correspondência: Elizabeth Machado Barbosa

Email para correspondência: liza_barbosa@hotmail.com

RESUMO

A produção de búfalos no Brasil tem crescido ao longo dos anos e, em paralelo, os desafios de associar os marcadores moleculares em búfalos para melhorar os índices produtivos e reprodutivos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar polimorfismos (SNP) no gene do receptor do hormônio melatonina em rebanhos de Terra Firme (TF) e de Várzea (VA) na Região Norte do Brasil. Foi realizado o método do PCR seguido por enzima de restrição (PCR-RFLP). Os produtos dos PCR apresentaram ponto de corte para *HpaI* na posição 318 do gene reconhecendo a substituições de transição (T↔C). A substituição é sinonímica e não altera a estabilidade da estrutura do RNAm. As frequências alélicas e genotípicas foram diferentes entre as populações estudadas, os quais apresentaram identidades alélicas e todas as populações demonstraram endogamia e equilíbrio de Hardy-Weinberg. Sendo assim, o marcador para restrição pela *HpaI* no gene do receptor da melatonina não se aplica à seleção para melhoramento genético, porém, é um excelente marcador para estudos de genética de população.

Palavras chave: SNP, PCR-RFLP, Melatonina, Reprodução, Seleção.

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta um efetivo de 1.260 milhões de bubalinos, sendo a Região Norte o maior criador de bubalinos, com um efetivo 64,1% do rebanho Nacional e o Estado do Pará tem um efetivo de 36% do rebanho Nacional e 56,1% do rebanho Regional. Portanto, sendo o Estado com maior produção de Bubalinos no Brasil (IBGE, 2012). Os búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*) são animais rústicos, que apresentam excelentes índices zootécnicos e possuem capacidade de adaptação em lugares desfavoráveis para a bovinocultura, tornando, portanto, a bubalinocultura viável economicamente para varias regiões do Brasil (Silva; Nadir Jr., 2014).

O búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) se comporta como um animal poliestral sazonal de dias curtos nas regiões mais distantes da linha do Equador e interrupção da ciclicidade durante o verão. Contudo, nas regiões próximas à linha do Equador, em especial na

Amazônia, as búfalas apresentam comportamento poliestrual contínuo (Vale; Ribeiro, 2005). Portanto os efeitos sazonais podem estar associados à ação do hormônio chamado Melatonina, o qual é produzido pela glândula pineal e age inibindo a produção dos hormônios GnRH, FSH e LH (Zicarelli, 1994). Porém, na Amazônia é frequente observar a concentração de partos em determinadas épocas do ano (Ohashi et al., 2012). O efeito da melatonina na reprodução ocorre em nível hipotalâmico, regulando a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Luridiana et al., 2012). Sua atuação é bem documentada como antioxidante, e pode estar associada ao desenvolvimento folicular, na qualidade oocitária, interferindo em processos como maturação oocitária e ovulação (Tamura et al., 2008). O receptor da melatonina (MTRN1A) parece exercer um efeito estimulatório no eixo reprodutivo das espécies de dias curtos. Estudos com diversas raças de caprinos e ovinos tem demonstrado que um polimorfismo nesse gene resulta em animais com menos sazonalidade (Rocha et al., 2011; Zetouni et al., 2014).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar dois rebanhos bubalinos segundo o local de produção, em Várzea e em Terra Firme na Região Amazônica, baseado em polimorfismo de base única no gene do receptor da Melatonina 1A (MTRN1A) na posição 70.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal sob o protocolo número 033/2015 na Universidade Federal Rural da Amazônia com o número de processo 23084.006321 / 2015-25.

Um total de 140 búfalas foi coletado, sendo 35 de Terra Firme e 105 de Várzea no Estado Pará, Brasil. Foram coletados aproximadamente 60 pelos com bulbos capilares e conservados a 4°C até o processamento laboratorial. Em seguida, foi realizada a seleção dos 40 melhores bulbos capilares de cada animal e realizada a extração de DNA pelo método fenol: clorofórmio: álcool isoamil (25:24:1) de acordo com o protocolo de Sambrook et al., (1989).

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas utilizando as sequências do *primer Forward* (TGTGTTTGTGTTGAGCCTGG) e *Reserve* (ATGGAGAGGGTTTGCCTTA), descritas por Messer et al., (1997), para um volume de reação final de 25µL sendo: 2,5 µL 10X Buffer; 2 mM de MgCl₂; 1,2 mM de cada dNTP; 10% de betaína, 5 pMol de primer; 2 U Taq DNA Polimerase (kit *Life Technology*, Brasil); 50-100 ng de DNA genômico. A temperatura de desnaturação inicial foi de 95°C por 10 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto. Finalizando com temperatura de extensão de 72°C por 10 minutos. O termociclador usado para as reações foi o 2720 *Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) e visualizados em gel de agarose 1.5% contendo gelred (*Biotium – California/USA*).

Um total de 10 amostras foram selecionadas randomicamente e os produtos dos PCRs foram purificados com a enzima *Illustra ExoProStar 1-Step* (*GE Healthcare – UK*), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados utilizando kit *BIG DYE* (*Life Technology*) em sequenciador automático de DNA ABI 3500 XL (*Applied Biosystems*). Após edição e análise das sequências observou-se um sítio de restrição na posição 79 para a enzima *HpaI* da mesma maneira como observado por (Carcangiu et al., 2011; Zetouni et al., 2014). Em seguida, os produtos de PCR restantes foram submetidos à digestão pela ação da *HpaI* (*New England Biolabs, Inc.*) de acordo

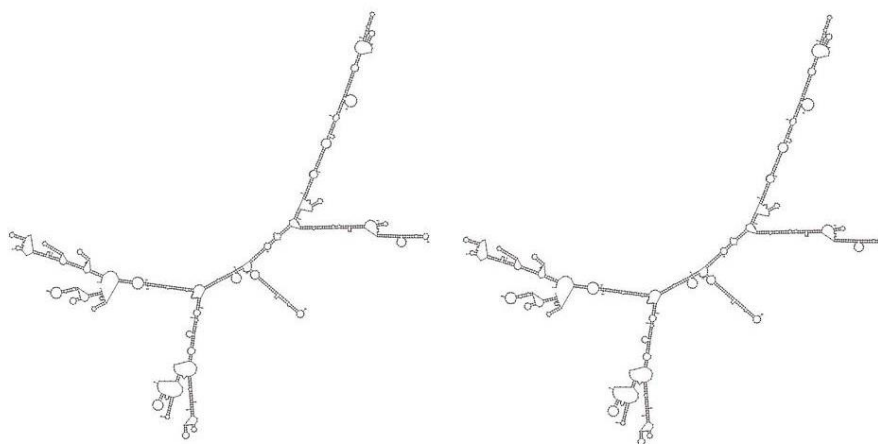
com as recomendações do fabricante e visualizadas em gel de agarose a 2% contendo gelred (*Biotium – California/USA*).

Todos os genótipos foram tabulados e o programa GENEPOP v.5 (Raymond; Rousset, 1995) foi usado para determinar as frequências genotípicas e alélicas, as homozigotes e heterozigotes observadas, à heterozigose esperada, os coeficientes de endocruzamento (Fis) e as probabilidades para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Também foi determinada a diferenciação gênica e as estatísticas F do marcador nas populações. Considerou-se 0,05 como nível de significância. O programa Mfold (Zuker, 2003) foi usado para desenvolver as estruturas de cada RNAm para os alelos T (selvagem) e C (mutante).

RESULTADOS

O polimorfismo encontrado é uma substituição do tipo transição (T↔C) que ocorre na posição 318, compreendendo o 106º códon (AAT ou AAC). Os referidos códons codificam o aminoácido asparagina, ou seja, a substituição é do tipo silenciosa, sendo assim, é um marcador que não influencia na atividade funcional do receptor. Observou-se que as estruturas dos RNAm gerados pela substituição de T para C não gerou desestabilidade molecular e diferenciação energética em ambos os RNAm (Figura 3).

Figura 3. Estruturas dos RNAm do receptor da melatonina 1A em búfalos. Na esquerda esta a estrutura selvagem (T na posição 318) e na direita a estrutura mutante (C na posição 318) demonstrando nenhuma alteração estrutural entre as mesmas.



Todos os 140 animais foram genotipados e todos os possíveis genótipos foram observados (TT, TC e CC). Portanto, na população de Terra Firme (TF), os heterozigotos CT foram mais frequentes, enquanto que nos animais de Várzea (VA), os homozigotos CC foram mais frequentes. O alelo C foi o mais frequente na população de TF, enquanto que o alelo T foi o mais frequente nos animais de VA (Tabela 1). As homozigotes observadas foram acima de 0,5 enquanto que, logicamente, as heterozigosidades observadas foram abaixo de 0,5 nas duas populações. Contudo, as heterozigosidades esperadas não diferiram significativamente das observadas, portanto, as duas populações não demonstraram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$) (Tabela 6).

A diferenciação gênica entre as duas populações foi significativa ($P < 0,05$), demonstrando uma identidade alélica em cada população. As análises da estatística F

resultaram em endocruzamento intrapopulacional ($F_{is}=0,077$), diferenciação genética moderada entre as populações ($F_{st}=0,075$) e endocruzamento no geral ($F_{it}=0,147$).

Tabela 6. Resultados das análises de genética nas duas populações.

Populações	Genótipos (Frequência)	Alelos (Frequência)	H _{OBS}	H _{eOBS}	H _{eESP}	F	P-HW
TF	TT (0,285)	T (0,529)	0,514	0,486	0,506	0,040	1,00
	TC (0,486)	C (0,471)					
	CC (0,229)						
VA	TT (0,124)	T (0,324)	0,600	0,400	0,440	0,091	0,38
	TC (0,400)	C (0,676)					
	CC (0,476)						

TF= Terra Firme, VA=Várzea, H_{OBS}= Homozigose observado, H_{eOBS}=Heterozigose observada, H_{eESP}= Heterozigose esperado, F= Endocruzamento e P-HW= Probabilidade de Hardy-Weinberg.

DISCUSSÃO

As mutações do tipo substituição podem ser classificadas em transição ($A \leftrightarrow G$ ou $C \leftrightarrow T$) e transversão (A ou $G \leftrightarrow C$ ou T). Essas substituições podem ocorrer em qualquer parte do genoma, portanto, quando ocorrem na região promotora do gene, podem alterar a expressão gênica (Kininis; Kraus, 2008), e quando ocorre em níveis de éxon ou íntron, podem alterar a funcionalidade da proteína (Pan et al., 2008) e podem desestabilizar a estrutura do RNAm (Sadec et al., 2011). Quando as substituições ocorrem nos éxons, o resultado pode ser sinonímico (sem alterar o aminoácido) ou não sinonímico (quando altera o aminoácido) (Hunt et al., 2009). Deste modo, o SNP na posição 318 do gene do receptor da melatonina 1A em búfalos é do tipo sinonímico onde não muda o aminoácido (Asparagina). O referente SNP não desestabilizou a estrutura do RNAm, mantendo a estrutura selvagem similar à mutante. Sendo assim, o processo de tradução não fica comprometido e o fenótipo é o mesmo entre o Selvagem e o Mutante. Apesar de alguns trabalhos, com o SNP da *HpaI* no gene do receptor da melatonina em búfalas leiteiras, terem encontrados algumas associações significativas de genótipos com características reprodutivas (Carcangiu et al., 2011; Luridiana et al., 2012). Ao contrário de Zetouni et al. (2014), que não observaram associação do SNP com características reprodutivas, o qual é o mais coerente para o marcador sinonímico.

As frequências alélicas e genotípicas de TF são próximas às observadas por Carcangiu et al. (2011) estudando búfalas mediterrâneas italianas e com os observados por Zetouni et al. (2014) com um rebanho de búfalas leiteiras comercial no Estado de São Paulo - Brasil os quais diferiram da população de VA. Contudo, as frequências alélicas e genotípicas nas duas populações foram diferentes aos observados por Luridiana et al., (2012) em rebanho de búfalas mediterrânea italiana. As diferenças gênicas entre as populações estudadas são resultados dos processos seletivos dos animais para reprodução e produção nas duas populações analisadas e a endogamia, que possivelmente, esteja relacionado ao baixo tamanho efetivo populacional (Malhado et al., 2007).

Sendo assim, o SNP para *HpaI* no gene do receptor da melatonina não apresenta valor de marcador para seleção com objetivo de diferenciar e associar caracteres de reprodução em rebanhos de búfalos em regiões com diferenças sazonais, embora seja um excelente marcador para estudos de genética de população. Portanto, seria interessante associar possíveis marcadores envolvidos no controle da expressão do receptor em nível de região promotora do gene.

AGRADECIMENTOS

Estamos muito gratos pelas amostras fornecidas pelos produtores das fazendas de Terra Firme e Várzea, no Estado do Pará . Nós também gostaríamos de estender a nossa gratidão ao Laboratório de Tecnologia Biomolecular da Universidade Federal do Pará, que cedeu suas instalações laboratórias.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse .

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carcangiu V, Mura MC, Pazzola M, Vacca GM, et al. (2011). Characterization of the Mediterranean Italian buffaloes melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene and its association with reproductive seasonality. *Theriogenology* 76: 419-426.
- Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, et al. (2009). Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol. Biol.* 578: 23-39.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2012). Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro 40: 1-71.
- Kininis M and Kraus WL (2008). A global view of transcriptional regulatory by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis. *Nucl. Recept. Signal.* 6: 1-11.
- Luridiana S, Mura MC, Pazzola M, Paludo M, et al. (2012). Association between melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene polymorphism and the reproductive performance of Mediterranean Italian buffaloes. *Reprod. Fertil. Dev.* 24: 983-987.
- Malhado CHM, Ramos AA, Carneiro PLS, Souza JC, et al. (2007). Parâmetros e tendências da produção de leite em bubalinos da raça Murrah no Brasil. *R. Bras. Zootec.* 36: 376-379.
- Messer LA, Wang L, Tuggle CK, Yerle M, et al. (1997). Mapping of the melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene in pigs, sheep and cattle. *Mamm. Genome* 8: 368-370.
- Ohashi O, Miranda MS, Santos SD, Cordeiro MDS, et al. (2012). Distúrbios reprodutivos do rebanho bubalino nacional. *Ciênc. Anim.* 22: 171-187.
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, et al. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* 40: 1413-1415.
- Raymond M and Rousset F (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- Rocha RMP, Matos MHTM, Lima LF, Saraiva MVA, et al. (2011). Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. *Acta Vet. Bras.* 5: 147-157.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Silva SL and Nadir JR G (2014). Buffaloes by-product production and consumer market. *Tekhne e Logos.* 5: 15-30.
- Tamura H, Nakamura Y, Terron MP, Flores LJ, et al. (2008). Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod. Toxicol.* 25: 291-303.
- Vale WG and Ribeiro HFL (2005). Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. *Vet. Bras. Reprod. Anim.* 29: 63-73.

- Zetouni L, de Camargo GM, da Silva Fonseca PD, Cardoso DF, et al. (2014). Polymorphisms in the MTRN1A gene and their effects on the productive and reproductive traits in buffaloes. *Trop. Anim. Health Prod.* 46: 337-340.
- Zicarelli L (1994). Management in different environmental condition. *Buffalo J.* 44: 17-38.
- Zuker M (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31: 3406-3415.

5. ARTIGO 3. NOVO POLIMORFISMO NO ÉXON I DO GENE DO RECEPTOR DA MELATONINA NÃO ASSOCIADO A CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS EM BÚFALOS AMAZÔNICOS

(de acordo com as normas da revista *Genetics and Molecular Research – GMR*)

E.M. Barbosa^{1*}, B.B. Souza², R.C. Guimarães², J.S.N. Azevedo³, E.C. Gonçalves⁴, H.F.L. Ribeiro², S.T. Rolim Filho² and E. Silva Filho²

¹Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciência Animal, Belém-PA, Brasil

²Universidade Federal Rural da Amazônia, Instituto de Saúde e Produção Animal, Belém-PA, Brasil

³Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus de Capanema-PA, Brasil

⁴Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém-PA, Brasil

Autor para Correspondência: Elizabeth Machado Barbosa

Email para correspondência: liza_barbosa@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste estudo foi sequenciar parte do éxon I do gene do receptor da melatonina 1A (MTRN1A) em búfalas para detectar novo polimorfismo e associa-lo a diferentes características reprodutivas como idade ao primeiro parto e intervalo entre partos em búfalas localizadas no Nordeste do Estado do Pará (Brasil). Foram coletadas 77 amostras de pelo de búfalas da região de Terra Firme do Estado do Pará. Extraíu-se o DNA e realizou-se as reações em cadeia da polimerase (PCR) com *primer* desenhado a partir da sequência referência do *GENEBANK* AY524665.1. Os produtos de PCRs foram purificados e sequenciados. Após edição e análise das sequências observou-se uma mutação na posição 62 no éxon I do MTRN1A (T→C) correspondente ao 21º aminoácido alterando de leucina para prolina. Foram observados todos os possíveis genótipos (TT, TC e CC), sendo genótipos CC (37/77) o mais frequente. As frequências alélicas foram T= 0,377 e C= 0,623. A análise da estatística Fis resultou em endocruzamento na população (Fis=0,397), e observou-se desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P<0,05). As associações dos genótipos com as características reprodutivas (Intervalo entre Parto e Idade ao Primeiro Parto) foram não significativas, (P>0,05). Embora, o referente SNP seja não sinónimo não houve influencia nas características reprodutivas avaliadas, portanto seria ideal detectar outros SNPs no éxon I do gene MTRN1A que possam influenciar nas características reprodutivas em búfalas.

Palavras chave: Exon I, SNP, Melatonina, búfalas.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui a pecuária mais diversificada de todo o planeta e isto se deve ao número significativo de raças ou grupos genéticos que, ao longo dos anos, vem fixando genes de produção e adaptabilidade nos rebanhos distribuídos nas diversas regiões do País e que devem para o uso sustentado das características produtivas, ser inseridas em seus respectivos sistemas de produção (Marques, 2008). Há um efetivo nacional de 1.3

milhões de bubalinos, sendo a Região Norte o maior criador de bubalinos, com um efetivo 64,1% do rebanho Nacional e o Estado do Pará tem um efetivo de 36% do rebanho Nacional e 56,1% do rebanho Regional. Portanto, sendo o Estado com maior produção de Bubalinos no Brasil (IBGE, 2012).

A produção de búfalos vem se difundindo devido à vantagem econômica que tal criação pode oferecer em relação à de outros ruminantes domésticos, principalmente pelo fato de os búfalos apresentarem características como rusticidade, vantagens proporcionadas quanto à fertilidade, longevidade, eficiência de conversão alimentar, aptidão para a produção de leite, carne e para o trabalho e adaptação às variadas condições climáticas e de manejo, no entanto, é necessário melhorar a eficiência dos animais, e, para isto é indispensável o conhecimento do potencial produtivo e reprodutivo, além dos fatores genéticos e ambientais que influenciam as características que o representam (Carmargo Junior et al., 2012).

O principal fator ambiental que afeta a regulação da sazonalidade reprodutiva é o fotoperíodo, através da secreção de melatonina (Nowak; Rodway, 1985). O fotoperíodo apresenta forte influência no padrão reprodutivo das espécies, através da secreção da glândula pineal, que controla a mudança entre os períodos claro e escuro (Borghese et al., 1995; Zicarelli, 1994; Parmeggiani et al., 1994).

O padrão de secreção da melatonina fornece informações sobre o fotoperíodo para as células do cérebro, que possuem os receptores necessários para o controle das funções reprodutivas (Migaud et al., 2005). Os receptores de melatonina são classificados em *MTRN1A* e *MTRN1B*, porém somente o primeiro parece estar envolvido na regulação da sazonalidade reprodutiva (Weaver et al., 1996; Dubocovich et al., 2003). O receptor da melatonina (*MTRN1A*) parece exercer um efeito estimulatório no eixo reprodutivo das espécies de dias curtos. Estudos com diversas raças de caprinos e ovinos tem demonstrado que um polimorfismo nesse gene resulta em animais com menos sazonalidade (Rocha et al., 2011; Zetouni et al., 2014).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi sequenciar parte do éxon I do gene do receptor da melatonina 1A (*MTRN1A*) em búfalas para detectar novos polimorfismos e associar os diferentes genótipos com características reprodutivas como idade ao primeiro parto e intervalo entre partos em búfalas localizadas no Nordeste do Estado do Pará (Brasil).

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal sob o protocolo número 033/2015 na Universidade Federal Rural da Amazônia com o número de processo 23084.006321 / 2015-25.

Foram coletados aproximadamente 60 pêlos com bulbos capilares de 77 búfalas da região de Terra Firme no Estado Pará, e conservados a 4°C até o processamento laboratorial. Em seguida, foi realizada a seleção dos 40 melhores bulbos capilares de cada animal e realizada a extração de DNA pelo método fenol: clorofórmio: álcool isoamil (25:24:1) de acordo com o protocolo de Sambrook et al., (1989).

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas utilizando o *primer* com 810pb, desenhado com base na sequência da região promotora e parte do éxon I do gene do Receptor da Melatonina em ovinos, a mesma está depositada no *Genebank* com referência AY524665 (*Forward*: TTTTTCATCTCTTACCATCTAG e *Reverse*: GCGAGACGTTGAGCAGC).

Para um volume de reação final de 15µL, foram adicionados 1 X de Tampão 10 X, 1 mmol de MgCl₂, 10 mmol de cada dNTP e 1 U de Taq DNA Polimerase (Life Technology, Brasil), 20% de Solução-Q (Quiagen, Brasil) e água ultrapura. A

temperatura de desnaturação inicial foi de 95°C por 10 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 1 min, e 72°C por 1 min. Finalizando com temperatura de extensão de 72°C por 10 min. O termociclador usado para as reações foi o 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems) e visualizados em gel de agarose 1.5% contendo gelred (Biotium – California/USA).

Os 77 produtos dos PCRs foram purificados com a enzima *Illustra ExoProStar 1-Step* (GE Healthcare – UK), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados utilizando kit *BIG DYE* (Life Technology, Brasil) em sequenciador automático de DNA ABI 3500 XL (Applied Biosystems). Após edição e análise das sequências observou-se uma mutação na posição 62 no éxon I do gene receptor da Melatonina. Todos os genótipos foram tabulados e o programa GENEPOP v.5 (Raymond; Rousset, 1995) foi usado para determinar as frequências genotípicas e alélicas, os coeficientes de endocruzamento (Fis) e as probabilidades para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (P= 0,001).

Para as características, Intervalo entre Parto, Idade ao Primeiro Parto e Período de Serviço, as análises foram realizadas utilizando o teste *ANOVA* para análise de variância através do aplicativo *PROC MIXED* do pacote estatístico do SAS 8.0 (SAS Institute, Inc. 2000), assumindo distribuição normal dos dados. A associação dos genótipos com as características de fertilidades das búfalas obedeceu ao seguinte modelo estatístico (P<0,05):

$$\gamma_{ijk} = X + G_i + F_j + (GxF)_k + \varepsilon_{ijk}$$

Onde: γ_{ijk} = Características fenotípicas; X = média das características fenotípicas; G_i = efeito fixo dos genótipos na $i^{\text{ésima}}$ genótipo; F_j = efeito fixo do fazenda na $j^{\text{ésima}}$ fazenda; $(GxF)_k$ = efeito fixo na $K^{\text{ésima}}$ idade; ε_{ijk} = erro aleatório com $ijk^{\text{ésima}}$ observações.

RESULTADOS

Foi encontrado na posição 62 no éxon I do gene receptor da melatonina (MTRN1A) um polimorfismo de substituição do tipo transição (T↔C) que ocorre na segunda base da trinca do código genético no aminoácido 21, de GTG (selvagem) por GCG (mutante), resultando em alteração do aminoácido de Leucina para Prolina, onde ambos são classificados como polares.

Foram observados nos 77 animais todos os possíveis genótipos (TT, TC e CC) (Figura 4), sendo genótipo observado mais frequente o CC (0,481), e o alelo mais frequente foi o C (0,623). A homozigose observada e a heterozigose esperada foram superior e inferior a 0,5, respectivamente. A análise da estatística Fis resultou em endocruzamento na população avaliada (Fis=0,397). Foi observado desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P<0,05) (Tabela 7).

Figura 4. Representação do esferograma do sequenciamento que demonstra o polimorfismo (T, C e Y=TC) na posição 62 no éxon I do gene MTRN1A.

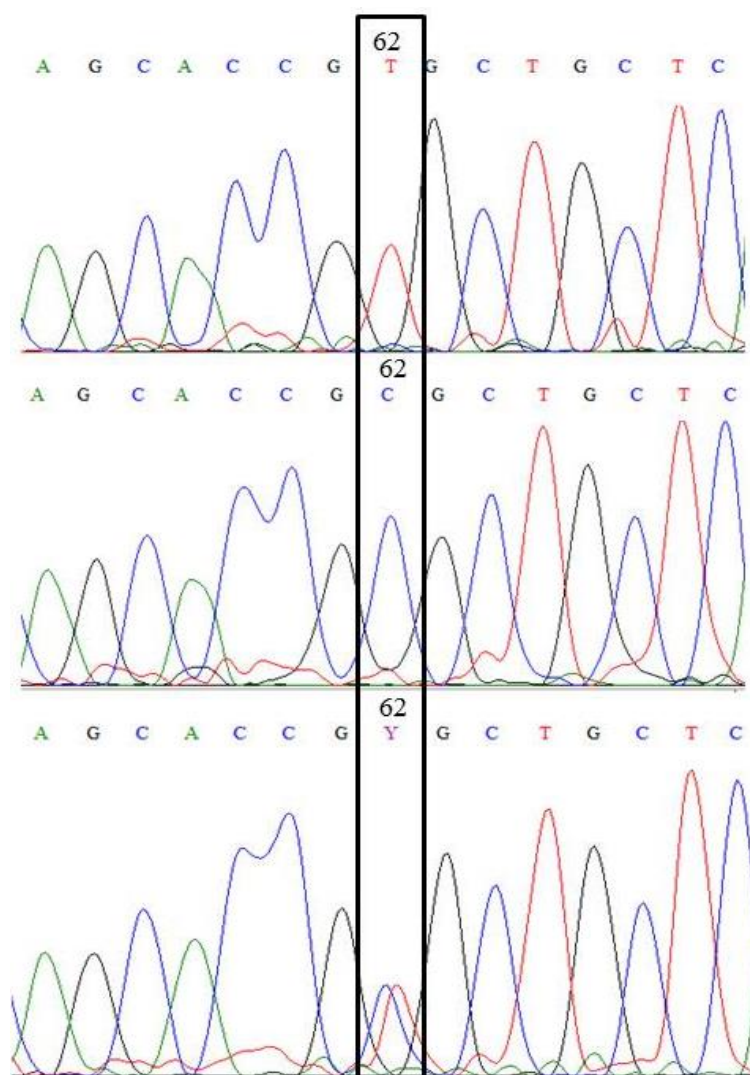


Tabela 7. Resultados das análises estatísticas populacional.

Posição (Mutação)	Frequências Genotípicas	Frequencia Alélica	H _{obs}	H _{esp}	Fis	PHW
62 (T → C)	TT (0,233)	C (0,623)	0,714	0,469	0,397	0,001
	CT (0,286)	T (0,377)				
	CC (0,481)					

SNPs= Polimorfismos de Único Nucleotídeo, Fis= Coeficiente de endocruzamento, PHW= Probabilidade de Hardy-Weinberg,

Foram estabelecidas médias e desvios padrão para as 77 búfalas em relação às características reprodutivas, e, obteve-se para o intervalo entre partos a média de $16,25 \pm 4,30$, já para a idade ao primeiro parto a média de $33,98 \pm 3,55$. Em relação à associação dos genótipos com as características reprodutivas, a mutação resultou em variações não significativas, pois não gerou efeito nos fenótipos das búfalas ($P > 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8. Associação dos novos SNP no éxon I do gene MTRN1A com características reprodutivas em búfalas.

Genótipos	IEP (meses) Médias (\pmDP)	IPP(meses) Médias (\pmDP)
CC	16,49 \pm 4,27	34,01 \pm 3,80
CT	16,05 \pm 5,04	33,47 \pm 3,74
TT	16,01 \pm 3,39	34,57 \pm 2,74
Médias (\pm DP)	16,25 \pm 4,30	33,98 \pm 3,55
Probabilidades	0,8431	0,6299

IEP= Intervalo entre Partos; IPP= Idade ao Primeiro Parto.

DISCUSSÃO

Em nosso estudo foi detectado um novo polimorfismo de substituição não sinonímia no éxon I do gene MTRN1A. Embora ainda não se tenham estudos à cerca desse SNP, as frequências alélicas e genotípicas foram bem estabelecidas para o éxon II do gene MTRN1A. Carcangiu et al., (2011), Luridiana (2012) e Zetouni et al., (2014), observaram frequências alélicas semelhantes para os alelos C (0,44; 0,42; 0,48, respectivamente) e T (0,56; 0,58; 0,52, respectivamente). Para as frequências genotípicas, Carcangiu et al., (2011) e Zetouni et al., (2014) observaram valores semelhantes, embora Luridiana et al., (2012) apresentaram diferentes resultados para TT (0,34), CT (0,38) e CC (0,28).

Avaliando as características reprodutivas, o intervalo entre parto em nosso estudo apresentou resultados médios semelhantes aos de Rolim Filho et al., (2009) com média de intervalo entre parto de 16,54 \pm 3,74 meses. Porém, Marques (1991), Camargo Junior et al., (2012) e Bezerra Junior et al., (2014) obtiveram resultados médios inferiores aos resultados supracitados com médias de 13,29 \pm 2,77 meses, 13,14 \pm 0,78 meses e 13,89 \pm 2,99 meses. Resultados superiores foram apresentados por Oliveira Neta et al., (2012) em seus estudos com 70 búfalas em lactação no município de Moju-PA, com média 18,6 meses. Cassiano et al., (2004) afirma que quanto menor for o intervalo entre parto maior seria a disponibilidade de um contingente maior de novilhas de alto potencial genético que possam substituir as fêmeas a serem descartadas, fator que reflete positivamente nos custos de produção (Lopes et al., 2009).

A média da idade ao primeiro parto encontrada foi bem próxima ao encontrada Camargo Junior et al., (2012) com média 34,58 \pm 3,96 meses, resultados superiores foram relatados por Marques (1991) e Rolim Filho et al., (2009) com médias de 37,94 \pm 5,53 e 39,52 \pm 7,54 meses, respectivamente. Os resultados apontam uma precocidade no rebanho estudado, influenciando diretamente na produtividade do rebanho, visto que, búfalas precoces produzirão mais crias e leite em sua vida produtiva que aquelas que entraram tardiamente na reprodução.

Embora se tenha observado a presença deste polimorfismo no éxon I, não foi demonstrada a associação às características de intervalo entre partos, idade ao primeiro parto e período de serviço ($P < 0,05$). Zetouni et al., (2014) observaram em 200 búfalas um SNP na posição 72 do éxon II do gene MTRN1A, e buscaram associações com as médias da idade ao primeiro parto e do primeiro intervalo entre partos, porém não obtiveram resultados significativos ($p > 0,05$).

Para Luridiana et al., (2012), em seus estudos com o SNP supracitado, não foram observadas associações com idade ao primeiro parto em búfalas mediterrâneas na Itália, embora a associação do genótipo T/T e a atividade reprodutiva em dias de fotoperíodo longo indiquem que o polimorfismo pode ser considerado um marcador genético, demonstrando, búfalos aptos a reproduzir fora da estação.

Contudo, embora se tenha encontrado este SNP, e ele tenha apresentado uma troca nos aminoácidos não houve influência quando este foi associado às características

reprodutivas, intervalo entre parto e idade ao primeiro parto, dos animais estudados. Portanto, há necessidade de se pesquisar a existência de outros SNPs no éxon I do gene MTRN1A que sejam eficientes nas associações com as características reprodutivas em búfalas.

AGRADECIMENTOS

Estamos muito gratos pelas amostras fornecidas pelos produtores das fazendas de Terra Firme, no Estado do Pará . Nós também gostaríamos de estender a nossa gratidão ao Laboratório de Tecnologia Biomolecular da Universidade Federal do Pará , que cedeu suas instalações laboratoriais.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bezerra Junior JS, Fraga AB, Couto AG, Barros CC and Silva RMO (2014). Produção de leite, duração da lactação e intervalo entre partos em búfalas mestiças Murrah. *Ver. Caatinga*. 27: 184–191.
- Borghese A, Barile, VL, Terzano, GM, Pilla, AM, Parmeggiani, A. Melatonin trend during season in heifers and buffalo cows (1995). *Bubalus bubalis*. 1: 61–64.
- Carcangiu V, Mura MC, Pazzola M, Vacca GM, Paludo M, Marchi B, Daga C, BUA S, Luridiana S. (2011) Characterization of the Mediterranean Italian buffaloes melatonin receptor 1^a (MTNR1A) gene and its association with reproductive seasonality. *Therio*.76: 419–426.
- Camargo Júnior RNC, Marques JRF, Marcondes CR, Araújo CV, et al. (2012). Indices of reproductive efficiency of buffaloes of the Brazilian Eastern Amazon. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 64: 796-803.
- Cassiano LAP, Mariante AS, McManus C, Marques JRF, Costa NA. Parâmetros genéticos das características produtivas e reprodutivas de búfalos na Amazônia brasileira (2004). *Pesq. Agropec. Bras*. 39: 451 – 457.
- Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ and Masana, MI (2003). Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front in Biosc*. 8: 1093–1108.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2012). Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro 40: 1-71.
- Lopes MA, Demeu FA, Santos G, Cardoso MG (2009). Impacto econômico do intervalo entre partos em rebanhos bovinos leiteiros. *Ver. Ciên. Agrotéc*. 33.
- Luridiana S, Mura MC, Pazzola M, Paludo M, et al. (2012). Association between melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene polymorphism and the reproductive performance of Mediterranean Italian buffaloes. *Reprod. Fertil. Dev*. 24: 983-987.
- Marques, J.R.F. *Avaliação genético-quantitativa de algumas características do desempenho produtivo de grupos genéticos de búfalos (Bubalus bubalis)*. 1991. 134 p. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista – Botucatu, 1991.
- Marques JRF and Costa JS (2008). Conservação e melhoramento dos recursos genéticos animais da Amazônia brasileira. In CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA –ZOOTEC 2008, 10., 2008, João Pessoa – PB. *Anais...* João Pessoa: UFPB, CD-ROM.

- Migaud M, Daveau A and Malpoux B (2005). MTNR1A melatonin receptors in the ovine preammillary hypothalamus: day-night variation in the expression of the transcripts. *Biol Reprod.* 72: 393–398.
- Nowak R and Rodway RG (1985). Effect of intravaginal implants of melatonin on the onset of ovarian activity in adult and prepubertal ewes. *J. Reprod. Fertil.* 74: 287-293.
- Oliveira Neta AC, Ribeiro, HFL Rolim Filho ST, Chaves LC, Daher Junior E, Nunes KB (2012). Intervalo entre partos e produção leiteira de búfalos criados no Estado do Pará. *Ciê. Anim.* 22: 212 – 215.
- Parmeggiani A, Di Palo R, Zicarell, L, Campanile G, Esposito L, Seren E, Accorsi PAE, Soflai SM (1994). Melatonina e stagionalità riproduttiva nella bufala. [Melatonin and reproductive seasonality in the buffalo cow]. *Agric. Ric.* 153: 41–48.
- Raymond M and Rousset F (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- Rocha RMP, Matos MHTM, Lima LF, Saraiva MVA, Alves AMCV, Rodrigues, APR and Figueiredo JR (2011). Melatonina e Reprodução Animal: Implicações na Fisiologia Ovariana. *Acta Vet Bras.* 5: 147-157.
- Rolim Filho, ST, Ribeiro HFL, Vale WG, Picanço NS, Barbosa EM, Ferreira R.N (2009). Desempenho reprodutivo de fêmeas bubalinas criadas em sistema misto (várzea e pastagem artificial) no Estado do Pará. I. Idade a primeira cria, intervalo entre partos, época de parição, eficiência reprodutiva e taxa de prenhez. *Ciê. Anim. Bras.* 10: 754-763.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SAS INSTITUTE INC. 8.0. (2000). User's guide. SAS Institute Inc., Cary
- Weaver DR, Liu C and Reppert SM (1996). Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol.* 10: 1478–1487.
- Zetouni L, de Camargo GM, da Silva Fonseca PD, Cardoso DF, et al. (2014). Polymorphisms in the MTRN1A gene and their effects on the productive and reproductive traits in buffaloes. *Trop. Anim. Health Prod.* 46: 337-340.
- Zicarelli L (1994). Management in different environmental condition. *Buf. J.* 44: 17-38.

6. CONCLUSÃO GERAL

A presente tese caracterizou pela primeira vez a região promotora do gene receptor da melatonina 1A (MTRN1A) na espécie bubalina e ainda, detectou a presença de 26 SNPs e um bloco de deleção (ACAA) nesta região, os quais foram associados a características reprodutivas como intervalo entre parto e idade ao primeiro parto.

Além disso, 11 destes SNPs apresentaram-se fortemente associados a vários fatores de ligação, os quais influenciam na transcrição da regulação gênica, fazendo-se necessário testar os referentes SNPs com outras características reprodutivas em búfalas de relevância econômica para validar o gene como forte candidato para a seleção.

Em relação à aplicação da técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima *HpaI* para o SNP presente no éxon II no gene do receptor da melatonina não apresentou valor de marcador para seleção com objetivo de diferenciar e associar caracteres de reprodução em rebanhos de búfalos em regiões com diferenças sazonais, embora seja um excelente marcador para estudos de genética de população.

Para o SNP encontrado no éxon I no gene do receptor da melatonina foi observado que embora ele tenha apresentado uma troca nos aminoácidos não houve influência quando este foi associado às características reprodutivas, observando-se a necessidade de se pesquisar a existência de outros SNPs no éxon I do gene MTRN1A que sejam eficientes nas associações com as características reprodutivas em búfalas.

Portanto, vale ressaltar a importância do gene MTRN1A para as espécies sazonais como os bubalinos, e dar continuidade a pesquisas referentes a esse gene em outras populações e distintas regiões para que seja estabelecida sua real atuação e relevância.