

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**POLIMORFISMOS NOS GENES DA LEPTINA E DO
RECEPTOR DE MELATONINA EM BÚFALAS (*Bubalus
bubalis*)**

Larissa Zetouni

Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**POLIMORFISMOS NOS GENES DA LEPTINA E DO
RECEPTOR DE MELATONINA EM BÚFALAS (*Bubalus
bubalis*)**

Larissa Zetouni

Orientador: Prof. Dr. Humberto Tonhati

Co-Orientador: Dr. Marcelo Cervini

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Abril de 2012

Z61p Zetouni, Larissa
Polimorfismos nos genes da leptina e do receptor de melatonina em búfalos (*Bubalus bubalis*) / Larissa Zetouni. -- Jaboticabal, 2012 ix, 59 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientador: Humberto Tonhati

Banca examinadora: Maria Elisabete Jorge Amaral, Joslaine Noely dos Santos Gonçalves Cyrillo

Bibliografia

1. *Bubalus bubalis*. 2. Leptina. 3. Melatonina. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.293.2:636.082

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LARISSA ZETOUNI – solteira, nascida em 05 de setembro de 1986, na cidade de Taubaté (SP), filha de Maria Cristina Viviani Cavalheiro e Fadi Zetouni. Iniciou em março de 2005 o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá (PR), obtendo o título de Zootecnista em janeiro de 2010. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por um ano, sob orientação do Prof. Dr. Vagner Alencar Arnaut de Toledo, desenvolvendo o projeto intitulado “Produção de Geléia Real em Colônias de abelhas *Apis mellifera* Africanizadas em sistemas de Mini-recrias e Recrias”. Ingressou, em agosto de 2010, no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati.

“... até que um dia, por astúcia ou acaso, depois de quase todos os enganos, ela descobriu a porta do labirinto. (...) nada de ir tateando os muros como um cego. Nada de muros. Seus passos tinham - enfim! – a liberdade de traçar seus próprios labirintos.”

(Mário Quintana)

À Tática Leika Taguti, meu querido diário,
*“enquanto houver você do outro lado,
aqui do outro eu consigo me orientar”.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado, olhando por mim, mesmo nos momentos em que imagino que ele esteja muito ocupado.

Ao Prof. Dr. Humberto Tonhati, por ter aceitado me orientar mesmo sem me conhecer, por ter confiado em mim e por ter me dado essa chance maravilhosa. Obrigada, querido professor, pela oportunidade que mudou a minha vida.

Ao meu co-orientador, Dr. Marcelo Cervini, por ter me iniciado no mundo da molecular, sempre com muita paciência e bom humor, e por toda a força, sugestões e correções.

À Universidade Estadual de Maringá, pela excelente formação, que tanto me ensinou e me fez crescer.

À Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, por todas as grandes oportunidades que contribuíram imensamente para meu mestrado.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida, que tornou possível a realização desse projeto.

À criadora de búfalos Wilma Penteado Ferreira (Fazenda Santa Elisa), por ter disponibilizado o material biológico necessário para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Vagner Alencar Arnaut de Toledo, por ter sido o maior professor que tive nessa vida. Se cheguei onde estou hoje, foi por tudo que me ensinou.

À minha querida amiga Ana Paula Del Vesco, por se fazer tão presente mesmo com toda a distância, sempre me incentivando nos momentos de dúvida, me apoiando nos momentos difíceis e comemorando comigo as nossas vitórias. Você faz uma falta gritante na minha vida, na minha rotina, no meu dia-a-dia. Depois de dois anos longe de você, posso afirmar com certeza que a vida era mais fácil, e mais doce, com você do meu lado. Morro de saudades, amiga!

Às grandes amigas Lenice Mendonça de Menezes e Milene Hata, que compartilharam comigo tantos momentos bons e ficaram ao meu lado nos ruins, e por terem sido grande parte da força que me moveu durante esse mestrado. Meninas,

nunca serei capaz de agradecê-las o suficiente, obrigada por TUDO, do fundo do meu coração. Eu não teria conseguido sem vocês.

Aos queridos Larissa “Goiabada” Sapiensa e Filipe “Boneco” Silva, por terem sido minha primeira família em Jaboticabal e por terem me acolhido tão bem em um momento de tantas incertezas.

Ao meu grande amigo-irmão André Ballerini Horta, por tudo. Tudo mesmo. Reencontrar você aqui foi o maior presente que ganhei de Deus nos últimos anos.

Aos queridos Gregório Miguel Ferreira de Camargo, Patrícia Dias da Silva Fonseca e Fernanda Monsalves Gil, por terem sido tão pacientes, por sempre estarem dispostos a ajudar e por sempre compartilharem comigo todo o conhecimento que possuem. Vocês foram meus anjos da guarda e eu sou extremamente grata a vocês por tudo, muito obrigada mesmo!

Aos amigos de laboratório e da salinha: Diércles, Camila, Naudin, Daniel e Daniele, por todas as risadas, conversas e momentos de descontração.

Ao Raul, por tanta paciência e por toda a ajuda com minhas análises estatísticas.

Às queridas amigas Marina (Viz), Marina (Pici) e Poliana, por terem, em tão pouco tempo, conquistado um espaço tão grande no meu coração. Pelas caronas, por toda a ajuda, pelas conversas, almoços, momentos de descontração, risadas e planos, valeu mulherada!

À minha banca de qualificação, professor Tonhati, professor Jeffrey e Dr. Raul, por toda a ajuda e sugestões valiosas.

À Prof^a. Dra. Sandra Aidar de Queiroz, pela oportunidade do estágio-docência na disciplina de Melhoramento Genético Animal, por ter compartilhado tanto conhecimento e por ter sido sempre tão simpática, atenciosa e compreensiva.

Aos amigos do Kung Fu: Tati, Dri, Maria, Claire, Kelmi, Adriana, Aparecido, Rodrigo, Arthur, LG e Prof. Valcir, por terem me ajudado com o equilíbrio necessário entre o corpo e a mente.

À minha irmã, Marcella Gasperini Carvalho, e minha afilhada, Sophia Carvalho, por todo o amor que me dão, e por toda a força e apoio, mesmo com toda essa distância. Amo vocês demais e meu coração vai estar sempre com vocês.

À minha grande amiga Priscila Diniz, por ser essa pessoa tão incrível e única, e pela nossa sempre tão literal “troca de ideias”. Sinto sua falta queridona, todos os dias.

À todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação, por toda a ajuda e paciência, explicando a mesma coisa 500 vezes por dia com um sorriso no rosto.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
Introdução	1
Revisão de Literatura	3
Produção de leite, gordura e proteína	3
Idade ao primeiro parto e intervalo de partos	4
O Gene da Leptina	5
O Gene da Melatonina	7
Objetivos	10
Referências Bibliográficas	11
CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DO POLIMORFISMO <i>LEP-1620 (A/G)</i> DO GENE DA LEPTINA E SEUS EFEITOS NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE DE BÚFALAS (<i>Bubalus bubalis</i>)	23
Resumo	23
Abstract	24
Introdução	25
Material e Métodos	27
Resultados e Discussão	32
Conclusão	38
Referências Bibliográficas	39
CAPÍTULO 3 - ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO GENE RECEPTOR DE MELATONINA <i>MTRN1A</i> E SUAS CORRELAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS EM BÚFALAS (<i>Bubalus bubalis</i>)	43
Resumo	43
Abstract	44
Introdução	45
Material e Métodos	47
Resultados e Discussão	51
Conclusão	54
Referências Bibliográficas	55

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2

Tabela 1. Estrutura e estatística descritiva dos dados para produções médias de leite, gordura e proteína e as porcentagens médias de gordura e proteína	29
Tabela 2. Frequências gênicas e genotípicas obtidas através da técnica PCR-RFLP.....	33
Tabela 3. Médias dos quadrados mínimos para produção de leite, gordura e proteína e porcentagem de gordura e proteína em função dos genótipos da leptina obtidos.....	34
Tabela 4. Número de observações por genótipo em cada mês de lactação	35
Tabela 5. Efeito de substituição alélica e efeito de dominância	37

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2

Figura 1. Foto representativa do gel de agarose (1,5%) com os fragmentos de 522 pb	32
Figura 2. Gel de agarose (2%) com os padrões de migração dos três genótipos	32
Figura 3. Gel de agarose (2%) demonstrando os padrões de migração AA e AG	33
Figura 4. Curvas de lactação dos diferentes genótipos para produção de leite (kg/dia)	36
Figura 5. Curvas de lactação dos diferentes genótipos para porcentagem de gordura	36
Figura 6. Curvas de lactação dos diferentes genótipos para porcentagem de proteína	36

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 3

Tabela 1. Frequências gênicas e genotípicas obtidas através da técnica PCR-RFLP	52
Tabela 2. Médias dos quadrados mínimos da idade ao primeiro parto e primeiro intervalo entre partos em função dos genótipos da melatonina obtidos	52

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 3

Figura 1. Foto representativa do gel de agarose (1%) com os fragmentos de 824 pb	51
Figura 2. Gel de agarose (2%) com os padrões de migração dos três genótipos	51

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os búfalos são classificados na ordem *Artiodactyla*, sub-ordem *Ruminantia*, família *Bovidae*, sub-família *Bovinae*, tribo *Bovini* e gênero *Bubalus*. O gênero *Bubalus* está dividido em dois grandes grupos: os *Bubalus bubalis bubalis*, com número de cromossomos igual a $2n = 50$, conhecidos como “river buffalos”, ou búfalos do rio, e *Bubalus bubalis kerebau*, com número de cromossomos igual a $2n = 48$, sendo estes conhecidos como “swamp buffalos”, ou búfalos do pântano (CARROLL, 1988). Dados moleculares indicam uma origem genética distinta do búfalo-do-rio e búfalo-do-pântano (KUMAR *et al.*, 2007; LEI *et al.*, 2007).

A introdução dos búfalos no Brasil se deu a partir do final do século XIX, predominantemente em pequenos lotes originários da Ásia, Itália e Caribe (ABCB, 2009). Em todo o mundo, foram descritas cerca de 19 raças de búfalo. No Brasil, quatro raças de búfalo possuem padrão definido pela Associação Brasileira dos Criadores de Búfalo (ABCB): Murrah (indiana), Jafarabadi (indiana, com as variedades Gir e Palitana), Mediterrâneo (origem italiana) e Carabao (sudeste asiático).

O Brasil possui uma das maiores populações de búfalos do mundo, com aproximadamente 1,2 milhões de cabeças (IBGE, 2010), representando o maior rebanho bubalino entre os países ocidentais. Entre os anos de 1997 e 2007, a produção mundial de leite de búfala apresentou um aumento de 43% (BREDA *et al.*, 2010), porcentagem superior à reportada para vacas leiteiras no mesmo período, que foi de 20% (FAO, 2009). O leite bubalino possui excelentes qualidades físico-químicas devido a alta concentração de seus componentes (TONHATI *et al.*, 2000a; ROSATI & VAN VLECK, 2002; ASPILCUETA-BORQUIS *et al.*, 2010), sendo caracterizado por altas porcentagens de gordura e proteína.

Nos países ocidentais, a maior parte da produção do leite de búfala, cerca de 70%, é utilizado para a fabricação da *mozzarella*. Este produto apresenta melhores qualidades nutricionais que os derivados bovinos, e é o principal derivado do leite de búfala, apresentando grande valor agregado, sendo o aumento de sua produção e melhorias na qualidade o principal objetivo dentro da cadeia produtiva de leite bubalino.

Embora seja significativa a prática do melhoramento genético nos rebanhos bubalinos, com a finalidade do aumento da produção de leite, é possível avaliar algumas dificuldades na cadeia produtiva, como a estacionalidade reprodutiva das búfalas, característica que causa grande limitação na distribuição da produção de leite ao decorrer do ano.

Em relação às características produtivas, como porcentagem de gordura e proteína, suas herdabilidades demonstram que é possível fazer seleção através das mesmas, melhorando a produção do rebanho (TONHATI *et al.*, 2000a). Marcadores moleculares e o estudo da genética molecular, além do

melhoramento genético tradicional, são ferramentas que podem ser utilizadas para auxiliar a seleção, através do estudo de polimorfismos em genes que determinam características de interesse econômico. O uso de marcadores moleculares permite que o potencial genético de um animal seja determinado com maior precisão e antes mesmo da expressão do seu fenótipo.

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para detecção de variabilidade genética ao nível de sequência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares ao longo de todo o genoma dos animais. Através da utilização de enzimas de restrição, foi desenvolvida a técnica de análise de Polimorfismos do Comprimento do Fragmento de Restrição de DNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP), e o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando a enzima DNA polimerase (Reação em Cadeia da Polimerase, ou *Polimerase Chain Restriction* – PCR) levou a descrição de outras classes de marcadores moleculares como RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso, ou *Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites e AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados, ou *Amplified Fragment Length Polymorphism*) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Polimorfismos são variações de formas fenotípicas associadas a alelos de um gene ou homólogos de cromossomos que ocorrem em uma população (ou entre populações). A identificação de polimorfismos permite inúmeras aplicações em várias áreas do conhecimento, sendo importantes na validação de genealogias, associação com características reprodutivas e de produção, estudos de conservação de material genético, entre outros.

Dentre os diferentes tipos de polimorfismo, podemos destacar o SNP (Polimorfismo de nucleotídeo único, ou *Single Nucleotide Polymorphism*). Os SNPs são polimorfismos caracterizados pela troca de uma base por outra em uma região específica do DNA. Estão localizados em abundância ao longo de todo o genoma, sendo de grande importância em estudos de associação desses marcadores com características fenotípicas. Vários estudos associam a presença de um determinado alelo de SNP em um gene específico com características fenotípicas de interesse econômico em espécies de animais domésticos (CASAS *et al.*, 2006; KATHIRAVAN *et al.*, 2009; KIJAS *et al.*, 2009; HOU *et al.*, 2010).

REVISÃO DE LITERATURA

PRODUÇÃO DE LEITE, GORDURA E PROTEÍNA

Quando comparadas com vacas zebuínas, as búfalas são capazes de produzir o litro de leite com custo inferior, possuindo produtividade leiteira economicamente superior (DI PALO, 1992). O leite apresenta maior rendimento industrial, e os produtos derivados de leite de búfalas possuem maior valor agregado, o que permite que a matéria prima seja remunerada a preços cerca de duas vezes maiores que aqueles pagos ao leite bovino (BERNARDES, 2007).

O leite de búfalas possui sabor adocicado, e apresenta relação Ca:P de 1,71, enquanto que a mesma relação para bovinos é de 1,31 (DE FRANCISCIS & DI PALO, 1994). É rico em vitaminas A e C, além de possuir teor de proteína de 5,2%, enquanto que o teor do leite de vaca é de 3,3% (VERRUMA & SALGADO, 1994). A grande característica do leite bubalino é seu elevado teor de sólidos totais, como a gordura, em torno de 8,0%, o que proporciona um excelente rendimento para produção de derivados, como a *mozzarella* (SWAMINATHAN & PARPIA, 1968; COCKRILL, 1981; NASCIMENTO & CARVALHO, 1993). Entretanto, mesmo com seu alto teor de gordura, o leite de búfalas apresenta menor concentração de colesterol por litro, quando comparado com o leite de outras espécies (SWAMINATHAN & PARPIA, 1968).

Estudos realizados na Índia demonstraram valores médios para produção de leite por lactação variando entre 1.131kg e 2.544kg (BASU & GHAI, 1978; MATHUR & MATHUR, 1992). Em rebanhos italianos, ROSATI & VAN VLECK (2002) obtiveram média de 2.286kg de leite por lactação. No Brasil, RODRIGUES *et al.* (2010) relataram valores médios de 1.663kg de leite, e de 116,84kg para produção de gordura em rebanhos bubalinos criados na Amazônia. Esses resultados demonstram que as raças bubalinas brasileiras apresentam um ótimo potencial para a produção de leite. Através de manejo adequado e um programa de melhoramento genético eficiente, a produtividade dos búfalos no Brasil pode atingir valores satisfatórios.

TONHATI *et al.* (2000a) encontraram valores para porcentagens de gordura e proteína no leite de búfalas de 6,87% e 3,9%, respectivamente. Os teores de sólidos do leite são de grande importância na cadeia produtiva da bubalinocultura, pois são os principais responsáveis pelo rendimento industrial para a fabricação de derivados, como a *mozzarella*.

IDADE AO PRIMEIRO PARTO E INTERVALO DE PARTOS

A produção de leite está diretamente relacionada às variações na atividade reprodutiva dos animais. Dessa maneira, menores intervalos entre partos podem resultar em uma maior produção de leite durante a vida produtiva do animal, além de um possível aumento no número de partos por ano (SENO *et al.*, 2010).

Quando comparados aos bovinos, os búfalos apresentam puberdade e maturidade sexual mais tardia (OBA, 1993), e essas características são influenciadas diretamente pela época de nascimento, estação do ano, disponibilidade de alimentos, raças, cruzamentos, manejo e diferenças individuais.

SENO *et al.* (2010), trabalhando com búfalas Murrah criadas no estado de São Paulo, obtiveram média de 36 meses para a característica idade ao primeiro parto. Esse valor foi inferior aos encontrados por TONHATI *et al.* (2000b) e MOHAMED *et al.* (1993), que obtiveram médias de 39 e 38 meses, respectivamente. De acordo com TANEJA (1999), existe uma grande variação na idade ao primeiro parto de búfalas criadas nos trópicos, principalmente devido às condições de manejo.

Em relação ao intervalo entre partos, o ideal é que o mesmo seja de aproximadamente um ano. Essa característica é um dos parâmetros mais importantes para medir a eficiência reprodutiva dos animais. A média mundial para a espécie bubalina é de 14,5 meses (SAMPAIO NETO *et al.*, 2001), sendo que essa característica é extremamente influenciada pela duração da lactação, pois alguns produtores evitam o encerramento da lactação, em busca de maiores produções de leite, o que ocasiona um aumento no intervalo entre partos (MARQUES *et al.*, 1991). Já para o primeiro intervalo entre partos de búfalas, CASSIANO *et al.* (2003) encontraram um valor médio de 501,3 dias, enquanto que SENO *et al.* (2010) obtiveram média de 453 dias. A característica primeiro intervalo entre partos é importante porque búfalas que parem mais cedo possivelmente apresentarão maior número de crias em sua vida produtiva. Trabalhos com bovinos demonstraram que vacas que parem tardiamente tendem a apresentar um menor número de crias durante sua vida reprodutiva, quando comparadas com vacas que pariram mais jovens (LÓPEZ DE TORRE & BRINKS, 1990). LESMEISTER *et al.* (1973) demonstraram que novilhas que nasceram de mães mais jovens apresentam tendências de parir primeiro quando comparadas com novilhas filhas de vacas mais velhas, portanto, é possível que o mesmo ocorra para búfalas, porém são escassos na literatura estudos sobre a característica primeiro intervalo entre partos para búfalas.

O GENE DA LEPTINA

A leptina é um hormônio peptídico não glicosilado de 16 kDa (quilodaltons), secretado principalmente pelo tecido adiposo branco (INGVARTSEN & BOISCLAIR, 2001), que age como um sinalizador para o hipotálamo sobre as reservas de gordura corporal e o estado energético do organismo (HENRY & CLARKE, 2008; KONNER *et al.*, 2009). A leptina desempenha um papel essencial na regulação homeostática da ingestão de alimentos, deposição de tecido adiposo, função imunológica, repartição de energia e no metabolismo (LIEFERS *et al.*, 2005). O hormônio leptina apresenta uma cadeia polipeptídica inicial com 167 aminoácidos, dos quais os primeiros 21 aminoácidos representam uma sequência sinalizadora que é descartada antes que a proteína madura seja secretada na circulação sanguínea.

Acreditava-se que o tecido adiposo branco servia apenas para reserva de energia, entretanto, após a descoberta da leptina, evidenciou-se que este tecido é o maior sítio para sua produção. Primeiramente, presumia-se que a leptina era encontrada exclusivamente no tecido adiposo branco, porém, apesar de essa ser sua principal via de síntese e secreção, este hormônio também se expressa nos tecidos placentários e fetais (CHILLIARD *et al.*, 2001), no hipotálamo (MORASH *et al.*, 1999), hipófise (JIN *et al.*, 2000), epitélio gástrico fúndico (BADO *et al.*, 1998), músculo esquelético (WANG *et al.*, 1998), sincitiotrofoblasto (MASUZAKI *et al.*, 1997) e epitélio mamário (SMITH-KIRWIN *et al.*, 1998).

A leptina foi descoberta em 1994, como o produto do gene *ob* em roedores em 1994 (ZHANG *et al.*, 1994). Diferenças genéticas no gene da leptina foram primeiramente observadas em camundongos *ob/ob*, pois estes não produziam leptina e eram hiperfágicos, obesos e inférteis (HAMANN & MATTHAEI, 1996). Notou-se que a esterilidade das fêmeas era causada por uma insuficiência hormonal a nível hipotálamo-hipófise e não devido ao excesso de tecido adiposo (CHEHAB *et al.*, 1996). HALAAS *et al.* (1995) demonstraram que a administração de leptina em animais estéreis restaurava a fertilidade e causava redução da massa de gordura corporal.

A leptina age como um barômetro corporal, criando um forte e crítico elo entre homeostase energética, apetite e reprodução (FAROOQI & O'RAHILLY, 2009; BLUHER & MANTZOROS, 2007). Como as concentrações de leptina são fortemente influenciadas pela massa de tecido adiposo (HOUSEKNECHT *et al.*, 1998), a leptina é vista como uma molécula sinalizadora que liga o estado nutricional às funções reprodutivas (ZIEBA *et al.*, 2005). CUNNINGHAM *et al.* (1999) demonstraram que uma quantidade adequada de leptina circulante se faz necessária para a obtenção da puberdade.

Os níveis plasmáticos de leptina são afetados, principalmente, pelo nível de gordura corporal e pelo balanço energético (BLOCK *et al.*, 2001). A redução das concentrações plasmáticas de leptina age como um sinal para que o cérebro conserve energia através da diminuição de funções reprodutivas e imunológicas, pois as mesmas não são essenciais para sobrevivência a curto prazo (HOUSEKNECHT *et al.*, 1998), fazendo com que o organismo utilize a energia disponível em funções essenciais para a

sobrevivência. CHILLIARD *et al.* (2005) demonstraram que uma das principais funções da leptina é a de ajudar os animais a adaptarem-se a períodos de subnutrição, pois essa proteína é a principal reguladora do armazenamento, equilíbrio e uso da energia disponível pelo organismo (CEDDIA *et al.*, 1998).

A leptina também parece estar envolvida na secreção hormonal de várias glândulas endócrinas (KERSHAW & FLIER, 2004), e pode agir não somente como um sinal endócrino no cérebro ou nos tecidos periféricos onde seus receptores são encontrados, mas também como um sinal autócrino ou parácrino nos próprios tecidos onde é produzida, em roedores (HUAN *et al.*, 2003), humanos (KERSHAW & FLIER, 2004; MARGETIC *et al.*, 2002) e ruminantes (CHELIKANI *et al.*, 2003).

Ligando-se a receptores específicos, a leptina age ativando, no cérebro, o centro da saciedade (SALMAN *et al.*, 2007). O receptor da leptina encontra-se, principalmente, nos neurônios do neuropeptídeo Y, e essa ligação gera uma redução do consumo de alimento (LIEFERS *et al.*, 2002) e um aumento no consumo de energia (FRUHBECK, 2006). O neuropeptídeo Y também está envolvido no controle das funções reprodutivas (MAGNI *et al.*, 2000).

Durante os anos de 1994 a 2001, significativos progressos foram feitos sobre a fisiologia da leptina em humanos e em roedores, porém o progresso foi mais lento em ruminantes, devido a dificuldades encontradas no desenvolvimento de ferramentas específicas para estudar a expressão gênica e as variações plasmáticas encontradas nessa espécie (INGVARTSEN & BOISCLAIR, 2001). O gene da leptina bovina é composto de três éxons e dois íntrons, correspondendo em torno de 18,9 kb (quilobase) do genoma. O primeiro e o segundo íntron têm cerca de 14 e 1,7 kb, respectivamente. A organização éxon-íntron desse gene é altamente conservada entre as espécies (SALMAN *et al.*, 2007), sendo que a sequência dos ovinos é cerca de 95,6; 92,8; 88,2; 83,6 e 82% idêntica à dos bovinos, suínos, humanos, ratos e camundongos, respectivamente (KUMAR *et al.*, 1998).

O gene *LEP*, localizado no cromossomo autossômico 4 de *Bos taurus*, é o responsável pela codificação da leptina (LAGONIGRO *et al.*, 2003). Como esse hormônio está envolvido com o consumo alimentar, particionamento de energia e com o metabolismo das vacas, a leptina pode, conseqüentemente, afetar características como produção de leite (LIEFERS *et al.*, 2002), balanço energético (BUCHANAN *et al.*, 2003) e reprodução (SILVA *et al.*, 2002).

Mutações nos genes que codificam a leptina ou em seus receptores são responsáveis por obesidade, infertilidade e resistência à insulina em roedores e humanos (HOUSEKNECHT & PORTOCARRERO, 1998). O estudo da leptina e a associação de seus polimorfismos a características importantes para a produção têm sido de grande importância para programas de melhoramento genético. Em suínos, ROBERT *et al.* (1998) observaram que os polimorfismos no gene da leptina estavam associados com animais magros, e HARDGE *et al.* (1998) observaram correlação estatisticamente significativa entre o polimorfismo detectado por RFLP com a enzima de restrição *Hinfl* no gene da leptina com a relação carne:gordura e com a espessura de gordura em uma população de 560 suínos.

Em bovinos de corte, inúmeros polimorfismos no gene da leptina foram detectados (POMP *et al.*, 1997; WILKINS & DAVEY, 1997; FITZSIMMONS *et al.*, 1998; KONFORTOV *et al.*, 1999; HAEGEMAN *et al.*, 2000), os quais foram associados à deposição de gordura na carcaça (FITZSIMMONS *et al.*, 1998 e BUCHANAN *et al.*, 2002) e armazenamento de energia (CORVA *et al.*, 2009; KULIG & KMIEC, 2009; SCHENKEL *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2007).

Em gado leiteiro, os diferentes polimorfismos encontrados foram associados a inúmeras características de interesse econômico, como balanço energético, produção de leite, peso vivo e fertilidade (LIEFERS *et al.*, 2002), consumo de matéria seca (BANOS *et al.*, 2008), consumo de ração (NKRUMAH *et al.*, 2005; LAGONIGRO *et al.*, 2003; LIEFERS *et al.*, 2002) e concentrações séricas de leptina (LIEFERS *et al.*, 2003). CHEBEL *et al.* (2008) encontraram uma associação entre SNPs encontrados na região codificadora do gene da leptina com saúde e lactação de vacas leiteiras. VAN DER LENDE *et al.* (2005) descobriram diferentes SNPs associados a características como produção e composição do leite e concentrações de leptina circulante no período final da gestação. Além disso, variações na concentração de leptina durante a gestação são afetadas por polimorfismos encontrados no gene *LEPR* (receptor da leptina) (LIEFERS *et al.*, 2004), localizado no cromossomo 3, sugerindo possíveis associações desse último com características produtivas ligadas a leptina.

Apesar de terem sido detectados muitos polimorfismos no gene da leptina em bovinos, são escassos os registros na literatura sobre a identificação e expressão desse gene em búfalos. Por ser um gene que foi amplamente associado a características importantes para a produção, faz-se necessário o seu estudo na espécie bubalina, a fim de encontrar associações entre polimorfismos e características produtivas e reprodutivas como um auxílio para o melhoramento genético dessa espécie.

O GENE DA MELATONINA

A melatonina é um hormônio secretado pela glândula pineal (epífise) especificamente no período noturno (ausência de luz), estando associada a inúmeras funções fisiológicas nos animais (REITER *et al.*, 1993; SKENE & ARENDT, 2006). A atividade da melatonina nos organismos sincroniza diferentes funções biológicas à variação de luz ambiental. A síntese da melatonina ocorre a partir do triptofano, sendo controlada “à distância” via ciclo circadiano localizado no núcleo supraquiasmático e “proximamente” por noraepinefrina em respostas aos sinais do ciclo circadiano (CHATTORAJ *et al.*, 2009). A glândula pineal, através da síntese de melatonina, é responsável pela tradução do fotoperíodo ambiental em sinalização hormonal endócrina.

Mudanças na duração da secreção da melatonina durante o período noturno foram determinadas em um grande número de espécies (ARENDT, 1998) e entre indivíduos da mesma espécie (LIU & BORJIGIN, 2006). Sua síntese é controlada pela via polissináptica (retina – núcleos supraquiasmáticos – medula – pineal). Para WAYNE *et al.* (1988), a principal característica que leva a mudanças sazonais na

reprodução de ruminantes são as variações ao longo do ano da duração do período em que a concentração de melatonina se mantém elevada durante a noite. PARMEGGIANI *et al.* (1994) encontraram diferentes padrões de liberação diária de melatonina em búfalas que apresentavam ou não tendência estacional na reprodução. Variações nas concentrações de melatonina plasmática entre búfalas também foram observadas por outros autores (BORGHESE *et al.*, 1994; MATTOS *et al.*, 2000), indicando uma maior concentração após o pôr-do-sol em animais menos sensíveis ao fotoperíodo. De acordo com JOHNSTON *et al.* (2005), a luz pode regular a produção de melatonina por dois mecanismos: primeiro, a luz determina a fase e duração da síntese da melatonina via sincronização do núcleo supraquiasmático com o fotoperíodo externo. Posteriormente, a luz atua inibindo a síntese de melatonina.

Em mamíferos, dois subtipos de receptores da melatonina (*MTNR1A* e *MTNR2A*) foram identificados (MESSER *et al.*, 1997), os quais participam diretamente no mecanismo sazonal e circadiano, funcionando como sensores da variação temporal. Entretanto, estudos indicam que apenas o *MTNR1A* possui atividade suficiente e significativa, com papel importante nas mudanças de funções comportamentais e reprodutivas mediado pelo fotoperíodo (BARRETT *et al.*, 1997). Grande parte dos estudos em animais domésticos envolvendo melatonina e estacionalidade reprodutiva foram realizados em ovinos de diferentes raças (WOODFILL *et al.*, 1994; MESSER *et al.*, 1997; ARENDT, 1998; NOTTER *et al.*, 2003), consolidando essa molécula e toda sua via de síntese, como o principal sistema a ser estudado para o entendimento de sua interação com a estacionalidade reprodutiva em animais de importância econômica.

Nos genes envolvidos 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 cruzamento fora de sua estação reprodutiva ideal, confirmando a importância desse gene como potencial marcador molecular para essa característica.

Recentemente, a publicação da primeira geração de mapas RH de alta resolução do genoma total dos búfalos (AMARAL *et al.*, 2008) e de outros trabalhos publicados anteriormente (EL NAHAS *et al.*, 1999 e 2001; IANNUZZI *et al.*, 2003) demonstraram um grande avanço para que possamos conhecer e entender melhor essa espécie, porém pouco se sabe sobre a organização do genoma e a presença de polimorfismos em genes candidatos para características de interesse econômico nesses animais.

A melatonina e as substâncias intermediárias de sua síntese são de grande importância na fisiologia da reprodução, estando relacionadas com a estacionalidade reprodutiva em vários mamíferos. A identificação e validação de diferenças nas sequências desses genes em búfalas serão importantes em futuros estudos de associação entre o possível polimorfismo e o fenótipo desejado. Esses resultados

poderão auxiliar no manejo reprodutivo dos bubalinos, uma vez que características de eficiência reprodutiva são mensuradas em idade avançada. Dessa forma, além do maior conhecimento sobre o assunto, a identificação e validação desses polimorfismos poderão contribuir para a implementação de seleção assistida por marcadores moleculares.

OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivos:

- A identificação do polimorfismo *LEP*-1620 (A/G) no gene bubalino da leptina e suas possíveis associações com as características produção de leite, gordura e proteína, e porcentagem de gordura e proteína.

- A identificação do polimorfismo no gene receptor de melatonina *MTRN1A* em búfalas, e suas possíveis associações com as características idade ao primeiro parto e primeiro intervalo entre partos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCB. Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 2009. Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br>>. Acesso em 12 de janeiro de 2011.

AMARAL, M. E. J.; GRANT, J. R.; RIGGS, P. K.; STAFUZZA, N. B.; RODRIGUES FILHO, E. A.; GOLDAMMER, T.; WEIKARD, R.; BRUNNER, R. M.; KOCHAN, K. J.; GRECO, A. J.; JEONG, J.; CAI, Z.; LIN, G.; PRASAD, A.; KUMAR, S.; SARADHI, G. P.; MATHEW, B.; KUMAR, M. A.; MIZIARA, M. N.; MARIANI, P.; CAETANO, A. R.; GALVÃO, S. R.; TANTIA, M. S.; VIJH, R. K.; MISHRA, B.; KUMAR, T. B.; PELAI, V. A.; SANTANA, A. M.; FORNITANO, L. C.; JONES, B. C.; TONHATI, H.; MOORE, S.; STOTHARD, P.; WOMACK, J. E. A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. **BMC Genomics**, v. 9, p. 631, 2008.

ARENDDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 3, p. 13-22, 1998.

ASPILCUETA-BORQUIS, R. R.; DI PALO, R.; ARAUJO NETO, F. R.; BALDI, F.; CAMARGO, G. M. F.; ALBUQUERQUE, L. G.; ZICARELLI, L.; TONHATI, H. Genetic parameter estimates for buffalo milk yield, milk quality and mozzarella production and Bayesian inference analysis of their relationships. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 1636–1644, 2010.

BADO, A.; LEVASSEUR, S.; ATTOUB, S.; KERMORGANT, S.; LAIGNEAU, J. P.; BORTOLUZZI, M. N.; MOIZO, L.; LEHY, T.; GUERRE-MILLO, M.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; LEWIN, M. J. The stomach is a source of leptin. **Nature**, v. 394, p. 790–793, 1998.

BANOS, G.; WOOLLIAMS, J. A.; WOODWARD, B. W.; FORBES, A. B.; COFFEY, M. P. Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3190-3200, 2008.

BARRETT, P.; CONWAY, S.; JOCKERS, R.; STROSBERG, A. D.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; DELAGRANGE, P.; MORGAN, P. J. Cloning and functional analysis of a polymorphic variant of the ovine Mel 1a melatonin receptor. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1356, n. 3, p. 299-307, 1997.

BASU, S. B.; GHAI, A. S. Studies on milk production in Murrah buffaloes. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 48, n. 8, p. 593-596, 1978.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.

BLOCK, S. S.; BUTLER, W. R.; EHRHARDT, R. A.; BELL, A. W.; VAN AMBURGH, M. E.; BOISCLAIR, Y. R. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. **Journal of Endocrinology**, v. 171, p. 339–348, 2001.

BLUHER, S.; MANTZOROS, C. S. Leptin in reproduction. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 14, p. 458-464, 2007.

BORGHESE, A.; BARILE, V. L.; TERZANO, G. M.; PILLA, A. M.; PARMEGGIANI A. Melatonin trend during season in heifers and buffalo cows. **Bubalus bubalis**, v. 1, p. 61–64, 1995.

BREDA, F. C.; ALBUQUERQUE, L. G.; EUCLYDES, R. F.; BIGNARDI, A. B.; BALDI, F.; TORRES, R. A.; BARBOSA, L.; TONHATI, H. Estimation of genetic parameters for Milk yield in Murrah buffaloes by Bayesian inference. **Journal Dairy Science**, v. 93, p. 784-791, 2010.

BUCHANAN, F. C.; FITZSIMMONS, C. J.; VAN KESSEL, A. G.; THUE, T. D.; WINKELMAN-SIM, D. C.; SCHMUTZ, S. M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 105–116, 2002.

BUCHANAN, F. C.; VAN KESSEL, A. G.; WALDNER, C.; CHRISTENSEN, D. A.; LAARVELD, B.; SCHMUTZ, S. M. Hot topic: An association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. **Journal Dairy Science**, v. 86, p. 3164-3166, 2003.

CARROLL, R. L. **Vertebrate Paleontology and Evolution**. W. H. Freeman and Company, New York, 698 p., 1988.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D. G.; CHASE, C. C., JOHNSON, D. D.; SMITH, T. P. L. Effects of calpastatin and *I*-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 520–53, 2006.

CASSIANO, L. A. P.; MARIANTE, A. S.; MCMANUS, C.; MARQUES, J. R. F.; DA COSTA, N. A. Caracterização fenotípica de raças bubalinas nacionais e do tipo Baio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 11, p. 1337-1342, 2003.

CEDDIA, R. P.; WILLIIAN JR, W. N.; LIMA, F. B.; CARPIMELLI, A. R.; CURI, R. Pivotal role of leptin in insulin effects. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 715-722, 1998.

CHATTORAJ, A.; LIU, T.; ZHANG, L. S.; HUANG, Z.; BORJIGIN, J. Melatonin formation in mammals: *In vivo* perspective. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 10, p. 237-243, 2009.

CHEBEL, R. C.; SUSCA, F.; SANTOS, J. E. P. Leptin genotype is associated with lactation performance and health of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 2893–2900, 2008.

CHEHAB, F. F.; LIM, M. E.; LU, R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nature Genetics**, v. 12, p. 318–320, 1996.

CHELIKANI, P. K.; GLIMM, D. R.; KENNELLY, J. J. Short communication: tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2369–2372, 2003.

CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAUAUD, C. Leptin in ruminants: Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p. 271-295, 2001.

CHILLIARD, Y.; DELAUAUD, C.; BONNET, M. Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 03–22, 2005.

COCKRILL, R.W. The water buffalo: A review. **British Veterinary Journal**, v. 137, p. 8-16, 1981.

CORVA, P. M.; FERNANDEZ, G. V. M.; SORIA, L. A.; PAPALEO, J. M.; MOTTER, M.; VILLARREAL, E. L.; SCHOR, A.; MEZZADRA, C. A.; MELUCCI, L. M.; MIQUEL, M. C. Effect of leptin gene polymorphisms on growth, slaughter and meat quality traits of grazing Brangus steers. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 105-116, 2009.

CUNNINGHAM, M. J.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Leptin's actions on the reproductive axis: Perspectives and mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 216–222, 1999.

DE FRANCISCIS, G.; DI PALO, R. Buffalo milk production. In: **Proceedings of 4th World Buffalo Congress**, São Paulo, Brasil, p.137-145. 1994.

DI PALO, R. Produzione lattea nella bufala con diete tradizionali e con l'impiego di acidi grassi. **Ph.D's Thesis**, University of Naples, 1992.

EL NAHAS, S. M.; DE HONDT, H. A.; SOUSSA, S. F.; HASSAN, A. M. Assignment of new loci to river loci to river buffalo chromosomes confirms the nature of chromosomes 4 and 5. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.116, p. 21-28, 1999.

EL NAHAS, S. M.; DE HONDT, H. A.; WOMACK, J. E. Current Status of the River Buffalo (*Bubalus bubalis* L.) gene map. **The American Genetic Association**, v. 92, p. 221-225, 2001.

FAO. Food Agriculture Organization, 2009. Disponível em: < <http://faostat.fao.org>>. Acesso em 07 de fevereiro de 2012.

FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, p. 980S-984S, 2009.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 3^a edição, 1998.

FITZSIMMONS, C. J.; SCHMUTZ, S. M.; BERGEN, R. D.; MCKINNON, J. J. A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. **Mammalian Genome**, v. 9, p. 432-434, 1998.

FRUHBECK, G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. **Biochemical Journal**, v. 393, p. 07-20, 2006.

HAEGEMAN, A.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L. J. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. **Animal Genetics**, v. 31, p. 70, 2000.

HALAAS, J. L.; GAJIWALA, K. S.; MAFFEI, M.; COHEN, S. L.; CHAIT, B. T.; RABINOWITZ, D.; LALLONE, R. L.; BURLEY, S. K.; FRIEDMAN, J. M. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, v. 269, p. 543-546, 1995.

HAMANN, A.; MATTHAEI, S. Regulation of energy balance by leptin. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 104, p. 293-300, 1996.

HARDJE, T.; KÖPKE, K.; WIMMERS, K.; LEUTHOLD, D. Association between polymorphism of the leptin gene (*lep*) and performance traits in a porcine resource family and in commercial outbred population. **Animal Genetics**, v. 29, n.1, p. 70, 1998.

HENRY, B.A.; CLARKE, I. J. Adipose tissue hormones and the regulation of food intake. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, p. 842-849, 2008.

HOU, G.; WANG, D.; GUAN, S.; ZENG, H.; HUANG, X.; MA, Y. Associated analysis of single nucleotide polymorphisms of IGF2 gene's exon 8 with growth traits in Wuzhishan pig. **Molecular Biology Reports**, v.37, n.1, p.497-500, 2010.

HOUSEKNECHT, K. L.; BAILE, C. A.; MATTERI, R. L.; SPURLOCK, M. E. The biology of leptin: A review. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1405–1420, 1998.

HOUSEKNECHT, K. L.; PORTOCARRERO, C. P. Leptin and its receptors: regulators of wholebody energy homeostasis. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, p. 457-475, 1998.

HUAN, J. N.; LI, J.; HAN, Y.; CHEN, K.; WU, N.; ZHAO, A.Z. Adipocyte-selective reduction of the leptin receptors induced by antisense RNA leads to increased adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 45638–45650, 2003.

IANNUZZI, L.; DI MEO, G. P.; PERUCATTI, A.; SCHIBLER, L.; INCARNATO, D.; GALLAGHER, D.; EGGEN, A.; FERRETTI, L.; CRIBIU, E. P.; WOMACK, J. The river buffalo (*Bubalus bubalis* 2n = 50) cytogenetic map: Assignment of 64 loci by fluorescence in situ hybridization and R-banding. **Cytogenetic and Genome Research**, v.102, p.65-75, 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/default.php>>. Acesso em 07 de fevereiro de 2012.

INGVARTSEN, K. L.; BOISCLAIR, Y. R. Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p. 215–250, 2001.

JIN, L.; ZHANG, S.; BURGUERA, B. G.; COUCE, M. E.; OSAMURA, R. Y.; KULIG, E.; LLOYD, R. V. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. **Endocrinology**, v. 141, p. 333–339, 2000.

JOHNSTON, J. D.; EBLING, F. J.; HAZLERIGG, D. G. Photoperiod regulates multiple gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 2967-2974, 2005.

KATHIRAVAN, P.; KATARIA, R. S.; MISHRA, B. P.; DUBEY, P. K.; SELVAKUMAR, M.; TYAGI, N. Seven novel single nucleotide polymorphisms identified within river buffalo (*Bubalus bubalis*) lactoferrin gene. **Tropical Animal Health Production**, v. 42, p. 1021-1026, 2009.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p. 2548–2556, 2004.

KIJAS, J. W.; TOWNLEY, D.; DALRYMPLE, B. P.; HEATON, M. P.; MADDOX, J. F.; MCGRATH, A.; WILSON, P.; INGERSOLL, R. G.; MCCULLOCH, R.; MCWILLIAM, S.; TANG, D.; MCEWAN, J.; COCKETT, N.; ODDY, V. H.; NICHOLAS, F. W.; RAADSMA, H.; International Sheep Genomics Consortium. A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. 4668, 2009.

KONFORTOV, B. A.; LICENCE, V. E.; MILLER, J. R. Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 1142-1145, 1999.

KONNER, A. C.; KLOCKENER, T.; BRUNING, J. C. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. **Physiology & Behavior**, v. 97, p. 632-638, 2009.

KULIG, H.; KMIEC, M. Association between leptin gene polymorphisms and growth traits in Limousin cattle. **Genetika**, v. 45, p. 838-841, 2009.

KUMAR, B.; FRANCIS, S. M.; SUTTIE, J. M.; THOMPSON, M. P. Expression of obese mRNA in genetically lean and fat selection lines of sheep. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 120, p. 543-548, 1998.

KUMAR, S.; NAGARAJAN, M.; SANDHU, J. S.; KUMAR, N.; BEHL, V.; NISHANTH, G. Mitochondrial DNA analyses of Indian water buffalo support a distinct genetic origin of river and swamp buffalo. **Animal Genetics**, v. 38, n. 3, p. 227-232, 2007.

LAGONIGRO, R.; WIENER, P.; PILLA, F.; WOOLLIAMS, J. A.; WILLIAMS, J. L. Short Communication: A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. **Animal Genetics**, v. 34, p. 371–374, 2003.

LEI, C. Z.; ZHANG, W.; CHEN, H.; LU, F.; LIU, R. Y.; YANG, X. Y.; ZHANG, H. C.; LIU, Z. G.; YAO, L. B.; LU, Z. F.; ZHAO, Z. L. Independent maternal origin of Chinese swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Genetics**, v. 38, n. 2, p. 97-102, 2007.

LESMEISTER, J. L.; BURFENING, P. J.; BLACKWELL, R. L. Date of first calving in beef cows and subsequent calf production. **Journal of Animal Science**, v. 36, p. 1, 1973.

LIEFERS, S. C.; TE PAS, M. F. W.; VEERKAMP, R. F.; CHILLIARD, Y.; DELAUAUD, C.; GERRITSEN, R.; VAN DER LENDE, T. Association of leptin gene polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows. **Mammalian Genome**, v. 14, p. 657-663, 2003.

LIEFERS, S. C.; TE PAS, M. F. W.; VEERKAMP, R. F.; VAN DER LENDE, T. Association between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake and fertility in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1633–1638, 2002.

LIEFERS, S. C.; VEERKAMP, R. F.; TE PAS, M. F. W.; CHILLIARD, Y.; VAN DER LENDE, T. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 227–238, 2005.

LIEFERS, S. C.; VEERKAMP, R. F.; TE PAS, M. F. W.; DELAUAUD, C.; CHILLIARD, Y.; VAN DER LENDE, T. A missense mutation in the bovine leptin receptor gene is associated with leptin concentrations during late pregnancy. **Animal Genetics**, v. 35, p. 138–141, 2004.

LIU, T.; BORJIGIN, J. Relationship between nocturnal serotonin surge and melatonin onset in rodent pineal gland. **Journal of Circadian Rhythms**, 2006.

LÓPEZ DE TORRE, G. E.; BRINKS, J. S. Some alternatives to calving date and interval as measures of fertility in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 9, p. 2650-2657, 1990.

MAGNI, P.; MOTTA, M.; MARTINI, L. Leptin: A possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function. **Regulatory Peptides**, v. 92, p. 51–56, 2000.

MARGETIC, S.; GAZZOLA, C.; PEGG, G. G.; HILL, R. A. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. **International Journal of Obesity**, v. 26, p. 1407–1433, 2002.

MARQUES, J. R. F.; BARBOSA, N.; CARVALHO, L. O. D. M.; OTAVIO, L.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; COSTA, N. A.; BATISTA, E. A. M.; RIBEIRO, M. J. P. S. S.; BARBOSA, C.; RAMOS, A. A. **Características da produção leiteira de búfalos (*Bubalus bubalis* L.)**. Belém: Embrapa-CPATU, 36 p., 1991.

MASUZAKI, H.; OGAWA, Y.; SAGAWA, N.; HOSODA, K.; MATSUMOTO, T.; MISE, H.; NISHIMURA, H.; YOSHIMASA, Y.; TANAKA, I.; MORI, T.; NAKAO, K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. **Nature Medicine**, v. 3, p. 1029–1033, 1997.

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.2485-88, 2009.

MATHUR, A. K.; MATHUR, B. S. L. Murrah buffaloes in their breeding tract. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 62, n. 10, p. 961-967, 1992.

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, n.5, Belo Horizonte, 2000.

MESSER, L. A.; WANG, L.; TUGGLE, C. K.; YERLE, M.; CHARDON, P.; POMP, D.; WOMACK, J. E.; BARENDSE, W.; CRAWFORD, A. M.; NOTTER, D. R.; ROTHSCHILD, M. F. Mapping of the melatonin receptor 1a (*MNTR1A*) gene in pigs, sheep and cattle. **Mammalian Genome**, v.8, p.368-370, 1997.

MOHAMED, M.; KAWTHER, A. M.; KHATTAB, A. S. Genetic relationship of age and weight at first calving with first lactation milk yield in Egyptian bufaloes. **Buffalo Bulletin**, v. 12, n. 2, p. 38–46, 1993.

MORASH, B.; LI, A.; MURPHY, P. R.; WILKINSON, M.; UR, E. Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. **Endocrinology**, v. 140, p. 5995–5998, 1999.

NASCIMENTO, C., CARVALHO, L.O.M. **Criação de búfalos: Alimentação, manejo, melhoramento e instalações**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 403 p., 1993.

NKRUMAH, J. D.; LI, C.; YU, J.; HANSEN, C.; KEISLER, D. H.; MOORE, S. S. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 20-28, 2005.

NOTTER, D. R.; COCKETT, N. E.; HADFIELD, T. S. Evaluation of melatonin receptor 1a as a candidate gene influencing reproduction in an autumn-lambing sheep flock. **Journal of Animal Science**, v.81, p.912-917, 2003.

OBA, E. Tópicos atualizados ligados à reprodução na espécie bubalina. In: **Sanidade e Produtividade em búfalos**. Jaboticabal, FUNEP, 202 p., 1993.

PARMEGGIANI, A.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G.; ESPOSITO, L.; SEREN, E.; ACCORSI, P. A.; SOFLAI, S. M. Melatonin and reproductive seasonality in the buffalo cow. **Agricoltura Ricerca**, v.153, p.41-48, 1994.

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 for Mel 1a receptor in the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 62, n.4, p.1096-1101, 2000.

POMP, D.; ZOU, T.; CLUTTER, A. C.; BARENDSE, W. Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of PCR-based polymorphism. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1427, 1997.

REITER, R. J.; PEOGGELER, B.; TAN, D. X.; CHEN, L. D.; MANCHESTER, L. C.; GUERRERO, J. M. Antioxidant capacity of melatonin, a novel action not requiring a receptor. **Neuroendocrinology Letters**, v. 15, p.103-116, 1993.

ROBERT, C.; PALIN, M.; COULOMBE, N.; ROBERGE, C.; SILVERSIDES, F. G.; BENKEL, B. F.; MCRAY, R. M.; PELLETIER, G. Backfat thickness in pigs is positively associated with leptin mRNA levels. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 78, p. 473-482, 1998.

RODRIGUES, A. E.; MARQUES, J. R. F.; ARAÚJO, C. V.; CAMARGO JÚNIOR, R. N. C.; DIAS, L. N. S. Estimação de parâmetros genéticos para características produtivas em búfalos na Amazônia Oriental. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 712-717, 2010.

ROSATI, A.; VAN VLECK, L. D. Estimation of genetic parameters for milk, fat, protein and mozzarella cheese production for the Italian river buffalo *Bubalus bubalis* population. **Livestock Production Science**, v.74, p.185–190, 2002.

SALMAN, A. K. D.; BERMAL, R. C.; GIACHETTO, F. P. Gene da leptina em ruminantes. **REDVET - Revista eletrônica de Veterinária**, v. 8, n. 12, 2007. Disponível em <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121207.html>>. Acesso em 14 de dezembro de 2011.

SAMPAIO NETO, J. C.; MARTINS FILHO, R.; LÔBO, R. N. B.; TONHATI, H. Avaliação dos desempenhos produtivos e reprodutivos de um rebanho bubalino no Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 368-373, 2001.

SCHENKEL, F. S.; MILLER, S. P.; YE, X.; MOORE, S. S.; NKRUMAH, J. D.; LI, C.; YU, J.; MANDELL, I. B.; WILTON, J. W.; WILLIAMS, J. L. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2009-2020, 2005.

SILVA, L. F. P.; VANDEHAAR, M. J.; NIELSEN, M. S. W.; SMITH, G. W. Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3277–3286, 2002.

SENO, L. O.; CARDOSO, V. L.; EL FARO, L.; SESANA, R. C.; ASPILCUETA-BORQUIS, R. R.; CAMARGO, G. M. F.; TONHATI, H. Genetic parameters for milk yield, age at first calving and interval between first and second calving in milk Murrah buffaloes. **Livestock Research for Rural Development**, v. 22, 2010. Disponível em < <http://www.lrrd.org/lrrd22/2/seno22038.htm>>. Acesso em 10 de abril de 2012.

SKENE, D. J.; ARENDT, J. Human circadian rhythms: Physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 344-353, 2006.

SMITH-KIRWIN, S. M.; O'CONNOR, D. M.; DE JOHNSTON, J.; LANCEY, E. D.; HASSINK, S. G.; FUNANAGE, V. L. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, p. 1810–1813, 1998.

SWAMINATHAN, M., PARPIA, H.A.B. Buffalo Milk: its nutritive value and use in the production of infant foods. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 9, p. 206-226, 1968.

TANEJA, V. K. Dairy breeds and selection. In: FALVEY, L.; CHANTALAKHANA, C. (Ed.). **Smallholder dairying in the Tropics**. Nairobi: International Livestock Research Institute, 462 p., 1999.

TONHATI, H.; CERON-MUNOZ, M. F.; OLIVEIRA, J. A.; DUARTE, J. M. C.; FURTADO, T. P.; TSEIMAZIDES, S. P. Parâmetros genéticos para a Produção de Leite, Gordura e Proteína em Bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 2051–2056, 2000a.

TONHATI, H.; VASCONCELLOS, F. B.; ALBUQUERQUE, L. G. Genetic aspects of productive and reproductive traits in a Murrah buffalo herd in São Paulo, Brazil. **Journal of Animal Breeding Genetics**, v. 117, p. 331-336, 2000b.

VAN DER LENDE, T.; TE PAS, M. F. W.; VEERKAMP, R. F.; LIEFERS, S. C.; GERALD, L. Leptin gene polymorphisms and their phenotypic associations. **Vitamines & Hormones**, v. 71, p. 373–404, 2005.

VERRUMA, M. R.; SALGADO, J. M. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 131-137, 1994.

WANG, J.; LIU, R.; HAWKINS, M.; BARZILAI, N.; ROSSETTI, L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. **Nature**, v. 393, p. 684–688, 1998.

WAYNE, N. L.; MALPAUX, B. G.; KARSCH, F. J. How does melatonin code for day length in the ewe: Duration of nocturnal melatonin release or coincidence of melatonin with a light-entrained sensitive period? **Biology of Reproduction**, v.39, p.66-75, 1988.

WILKINS, R. J.; DAVEY, H. W. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. **Animal Genetics**, v. 28, p. 376, 1997.

WOODFILL, C. J. I.; WAYNE, N.; MOENTER, S. M.; KARSCH, F. Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific time cues. **Biology of Reproduction**, v.50, p.965–976, 1994.

WRIGHT, C. D. Polymorphism of the melatonin receptor (*MNTR1A*) gene and their association to reproductive performance in fall lambing ewes. **M.S. Thesis**, South Dakota Estate, 2000.

YANG, D.; CHEN, H.; WANG, X.; TIAN, Z.; TANG, L.; ZHANG, Z.; LEI, C.; ZHANG, L.; WANG, Y. Association of polymorphisms of leptin gene with body weight and body sizes indexes in Chinese indigenous cattle. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, p. 400-405, 2007.

ZHANG, Y.; PROENÇA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v.372, p.425-432, 1994.

ZIEBA, D. A.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G. L. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 166–185, 2005.

CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DO POLIMORFISMO *LEP-1620 (A/G)* DO GENE DA LEPTINA E SEUS EFEITOS NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE DE BÚFALAS (*Bubalus bubalis*).

RESUMO – O gene responsável pela codificação do hormônio leptina tem sido associado à produção de leite, e diversos polimorfismos encontrados nesse gene foram associados a características produtivas em bovinos. O objetivo do presente estudo foi a identificação do polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* no gene bubalino da leptina e suas possíveis associações com as produções de leite, gordura, proteína e porcentagens de gordura e proteína. Foram coletadas amostras de pelo da cauda de 200 búfalas, e após a extração do DNA as amostras foram genotipadas pela técnica PCR-RFLP. Três amostras foram sequenciadas e foi encontrado um SNP na posição 70 do íntron 2 do gene da leptina, caracterizado pela substituição de um A por um G. As médias das produções mensais de leite, gordura, proteína e as porcentagens de gordura e proteína foram avaliadas em um modelo misto. Os genótipos encontrados (AA, AG, GG) foram positivamente associados às características porcentagem de gordura e de proteína ($p < 0,05$), sendo que os animais AA apresentaram médias superiores para as características. As curvas de lactação para as características produção de leite e porcentagens de gordura e proteína apresentaram trajetórias semelhantes para os três genótipos. Esses resultados indicam que o polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* pode ser utilizado futuramente como marcador molecular para as características porcentagem de gordura e proteína do leite de búfalas.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, leptina, polimorfismo, SNP.

ABSTRACT – The gene responsible for encoding the hormone leptin has been associated with milk production, and several polymorphisms of this gene were associated with production traits in cattle. The aim of the present study was to identify the *LEP-1620 (A/G)* polymorphism in the buffalo leptin gene and its possible associations with milk, fat and protein yield, and fat and protein percentages. Samples of tail hair from 200 buffalo cows were collected, and after DNA extraction the samples were genotyped by PCR-RFLP. Three samples were sequenced and an SNP was found at position 70 of intron 2 in the leptin gene, characterized by the substitution of an A for a G. The means from monthly milk, fat and protein yield and fat and protein percentages were evaluated by a mixed model. The genotypes found (AA, AG, GG) were positively associated with fat and protein percentages ($p < 0,005$), and the AA animals showed the highest means for this traits. The lactation curves for milk yield and fat and protein percentages showed similar trajectories for the three genotypes. These results indicate that the *LEP-1620 (A/G)* polymorphism can be used in the future as a molecular marker for fat and protein percentages traits of buffalo cow's milk.

Keywords: *Bubalus bubalis*, leptin, polymorphism, SNP.

INTRODUÇÃO

Estima-se que a população mundial de búfalos seja de aproximadamente 177 milhões de cabeças, estando presente em cerca de 42 países (FAO, 2008). A maior parte desses animais encontra-se em países do continente asiático, onde desempenham um papel importante como animais de trabalho no campo. Na Índia, Paquistão e Egito, a maior parte do leite produzido e consumido pela população local é de origem bubalina (NANDA & NAKAO, 2003).

Entretanto, a produção de leite bubalino é significativamente menor do que a produção de leite bovino (TONHATI *et al.*, 2008). As maiores produções mundiais de leite de búfala reportadas são da Índia e Itália, provavelmente porque avaliações genéticas do rebanho bubalino são práticas comuns nesses países (MOIOLI & BORGHESE, 2005).

Estudos sobre estimativas de parâmetros genéticos para a produção de leite e seus constituintes em búfalos tem sido desenvolvidos (TONHATI *et al.*, 2010; ASPILCUETA-BORQUIS *et al.*, 2010), demonstrando valores moderados de herdabilidade para essas características, indicando que a seleção seria efetiva para o melhoramento genético das mesmas. Entretanto, a produção de leite e seus constituintes são características expressas em um só sexo, ou seja, para a avaliação de reprodutores candidatos à seleção se faz necessária a utilização do teste de progênie, o que implica em alto custo operacional e longo intervalo de gerações.

Com o avanço dos marcadores moleculares na década de 80, surgiu a possibilidade de utilizá-los como ferramentas auxiliares para o melhoramento genético animal. Os marcadores moleculares apresentam as vantagens de não sofrerem influências ambientais e de serem herdados segundo as leis de Mendel, auxiliando a eficiência do processo de avaliação dos animais. Várias pesquisas foram realizadas na tentativa de identificar marcadores moleculares associados aos componentes do leite em búfalas (REN *et al.*, 2011; MITRA *et al.*, 1998, COSENZA *et al.*, 2009), porém estudos com o gene da leptina de búfalos são escassos na literatura. No entanto, para bovinos leiteiros, o hormônio leptina tem sido associado à produção de leite.

O gene da leptina foi descoberto através de estudos com camundongos obesos, estéreis e deficientes em leptina (ZHANG *et al.*, 1994), e tem sido considerado como gene candidato para associação com características quantitativas de interesse econômico em diversas espécies de animais domésticos, como deposição de gordura na carcaça (BUCHANAN *et al.*, 2002), balanço energético, produção de leite, peso vivo e fertilidade (LIEFERS *et al.*, 2002), entre outras.

Durante o início da lactação, a produção de leite é sustentada através de uma forte mobilização do tecido adiposo (CHAGAS *et al.*, 2007), o que resulta em uma grande perda de peso e escore corporais, além de causar uma queda aguda nas concentrações de leptina (CHILLIARD *et al.*, 2005), concentrações essas que atingem seu ponto mínimo dez dias após o parto (KADOKAWA *et al.*, 2000).

Quanto maior o tempo para que se restabeleça a secreção de leptina no organismo, maior será a duração do anestro pós-parto (JOLLY *et al.*, 1995).

Diversos SNPs foram descobertos no gene da leptina bovina, como *LEP-2470*, *LEP-1457*, *LEP-1238* e *LEP-963*, e os mesmos foram associados à composição do leite, dificuldade do parto, duração da gestação, taxa de mortalidade perinatal, entre outras (GIBLIN *et al.*, 2010). LIEFERS *et al.* (2002) e CHEBEL *et al.* (2008) associaram SNPs da região codificadora do gene da leptina bovina à lactação e saúde de vacas leiteiras.

O SNP *LEP-1620 (A/G)* (GenBank: Y11369), localizado no íntron 2 do gene da leptina (LIEN *et al.*, 1997), foi positivamente correlacionado ao peso à desmama em bovinos da raça Nelore (SOUZA *et al.*, 2010), porém estudos demonstrando correlações desse polimorfismo com características de produção de leite não foram encontrados na literatura. Além disso, não há registros de estudos do gene leptina e seus possíveis polimorfismos em bubalinos.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar a existência do polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* em búfalas e suas possíveis correlações com produção de leite, gordura, proteína e porcentagens de gordura e proteína.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram coletadas amostras de pelo da cauda de 200 búfalas, pertencentes ao rebanho comercial da fazenda Santa Eliza, localizada no município de Dourado (SP), que integra o Programa de Controle Leiteiro associado ao Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP-Jaboticabal (SP). As amostras coletadas foram devidamente identificadas e armazenadas a 4° C em embalagens plásticas individuais.

Extração do DNA

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP-Jaboticabal (SP).

A extração de DNA das amostras coletadas foi realizada a partir da metodologia Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico adaptada por LIMA (2003). Cerca de 40 folículos pilosos por animal foram depositados em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) e centrifugados rapidamente. Após a centrifugação, adicionou-se 500 µL de solução TE-Tween (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween 20) em cada tubo, levando-os à incubação no banho a 65°C por uma hora e meia, agitando-os periodicamente. Em seguida, foram adicionados 2 µL de proteinase K por amostra (600 µg/µL) e os mesmos foram incubados a 55°C por seis horas, com agitação periódica, sendo, posteriormente, incubados a 37°C por uma noite.

Após esses procedimentos, adicionou-se um volume de PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico) para um volume de amostra e os tubos foram agitados em agitador automático por dez segundos, sendo centrifugados, em seguida, por dez minutos a 12000 rpm a 23°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, sendo o volume final de aproximadamente 300 µL.

Em seguida, foi feita a precipitação do DNA com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M e etanol absoluto gelado. Os tubos foram misturados por inversão e colocados no freezer (-80°C) por uma hora. Após esse período, foram centrifugados a 4°C por 25 minutos, a 12000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o DNA remanescente foi completamente seco em temperatura ambiente, sendo em seguida armazenado em 100 µL de TE (10:1).

Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras de DNA extraídas foram submetidas à técnica de PCR para amplificação das regiões de interesse. As sequências dos *primers* utilizados foram: (LEP 1) 5'- GTC TGG AGG CAA AGG GCA GAG T -3' e (LEP 2) 5'- CCA CCA CCT CTG TGG AGT AG -3', descritas por LIEN *et al.* (1997).

As soluções *mix* para a PCR foram preparadas com um volume final de 15 μL , contendo 2 μL de DNA (75 ng), 1,5 μL de cada *primer* (15 pM), 3,5 μL de água e 6,5 μL de Go Taq® Green Master Mix (Promega), que contém, em sua formulação, 400 μM de dATP, 400 μL de dGTP, 400 μL de dCTP, 400 μL dTTP e 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2).

Para a amplificação das regiões de interesse, foi utilizado o seguinte programa no termociclador: 94°C por cinco minutos; 94°C por 40 segundos, 62,5°C por 45 segundos e 72°C por um minuto (38 ciclos); seguido de extensão final a 72°C por cinco minutos. Após o ciclo de amplificações, as amostras ficaram armazenadas a 4°C.

Para verificação da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%), corados com GelRed™ (Uniscience), por 40 minutos a 90 V. O tamanho esperado do fragmento era de 522 pares de base (pb). A visualização foi feita com o uso do aparelho Gel-Doc (Bio-Rad®), em luz ultravioleta (UV).

PCR-RFLP (Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição)

Nessa etapa, para o preparo do *mix* da técnica RFLP, foram utilizados 5 μL do produto de PCR, 0,5 μL da enzima de restrição FastDigest® BsaAI, 1 μL do tampão 10X FastDigest® Green Buffer e 8,5 μL de água, em um volume final de 15 μL . As amostras foram submetidas a 37°C por cinco minutos, para a digestão do fragmento. Em seguida, foram coradas com GelRed™ (Uniscience) e submetidas a eletroforese em gel de agarose (2%), por aproximadamente 90 minutos, a 110 V. A visualização foi feita em luz UV e o gel foi documentado pelo aparelho Gel-Doc (Bio-Rad®).

Sequenciamento e análise das sequências obtidas

Três amostras de produtos de PCR, uma de cada um dos diferentes padrões de clivagem observados através da técnica de PCR-RFLP foram sequenciadas, para validação dos resultados da digestão. Essa etapa foi realizada por serviço terceirizado, pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP. Foi utilizada a técnica de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (ddNTPs), descrita por SANGER *et al.* (1977), e utilizou-se o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), em um sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems). As sequências dos fragmentos obtidos foram alinhadas utilizando-se o programa CodonCode Aligner®, para edição dos dados, montagem das sequências contíguas e caracterização das sequências nucleotídicas.

Descrição dos dados fenotípicos

Foram analisados os controles de produção de leite, gordura e proteína e as porcentagens de gordura e proteína de 174 primeiras lactações de búfalas, filhas de dez reprodutores. As produções de leite foram obtidas a partir do quinto dia pós-parto. As médias das produções no controle foram consideradas em classes mensais de lactação, variando de um a dez, e foram incluídas nas análises somente búfalas com pelo menos seis controles. Os detalhes da estrutura descritivas dos dados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Estatística descritiva dos dados para as médias da produção de leite, gordura e proteína e porcentagem de gordura e proteína para búfalas na primeira lactação.

	PL(kg)	PG(kg)	PP(kg)	%G	%P
Nº Observações	1802	1377	1377	1377	1377
Búfalas	230	177	177	177	177
Touros	10	10	10	10	10
Media	5,79	0,37	0,25	6,46	4,27
DP	1,80	0,13	0,08	1,20	0,42
GC	14	11	11	11	11

DP = Desvio padrão; GC = Grupo contemporâneo.

PL = produção de leite; PG = produção de gordura; PP = produção de proteína; %G = porcentagem de gordura; %P = porcentagem de proteína

Análises estatísticas

As frequências gênicas e genotípicas foram determinadas a partir da contagem direta dos genótipos observados por meio do gel de agarose. As frequências gênicas, genotípicas (F) e o teste do χ^2 para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos dos genes estudados foram estimadas pelas seguintes equações:

$$p(A) = \frac{N_{AA} + (0,5N_{AG})}{N}$$

$$q(G) = \frac{N_{GG} + (0,5N_{AG})}{N}$$

$$F(AA) = \frac{N_{AA}}{N}$$

$$F(AG) = \frac{N_{AG}}{N}$$

$$F(GG) = \frac{N_{GG}}{N}$$

Onde N_{AA} e N_{GG} correspondem, respectivamente, ao número de indivíduos homozigotos AA e GG, N_{AG} corresponde ao número de indivíduos heterozigotos AG e N representa o número total de indivíduos.

Para testar a aderência das frequências observadas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, as frequências genotípicas esperadas foram estimadas a partir da expansão do binômio descrito por FALCONER & MACKAY (1996):

$$(x_A + x_G)^2 = x_A^2 + 2x_Ax_G + x_G^2$$

Onde x_A^2 e x_G^2 representam as frequências esperadas para os homozigotos dos alelos A e G, respectivamente, e $2x_Ax_G$ corresponde à frequência esperada dos heterozigotos AG.

As medidas das produções mensais de leite, gordura, proteína e as porcentagens de gordura e proteína foram avaliadas em um modelo misto, aplicando-se uma análise de medidas repetidas no tempo. Para tanto, foi utilizado o procedimento MIXED do SAS (2000) com a opção *repeated*. Como medida repetida, considerou-se o mês de controle. Os dados foram analisados com o seguinte modelo linear:

$$y = \mu + \text{Touro} + \text{GC} + b_1(I_{ijk} - \bar{I}) + b_2(I_{ijk} - \bar{I})^2 + \text{CML} + \text{gen} + e$$

Onde:

y = variável dependente (médias mensais de produção de leite, gordura e proteína e as porcentagens de gordura e proteína)

μ = média geral para a população para as características em estudo

Touro = efeito aleatório do pai da búfala

GC = efeito fixo de grupo contemporâneo formado pela o ano e estação de parto (água e seca)

I_{ijk} = efeito da idade da vaca ao parto, como covariável

\bar{I} = média da covariável idade

b_1 = coeficiente de regressão linear para idade da vaca ao parto

b_2 = coeficiente quadrático para idade da vaca ao parto

CML = efeito fixo da classe do mês de lactação (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10)

gen = efeito fixo do genótipo (AA, AG, GG)

e = erro aleatório.

As médias dos valores para os diferentes genótipos foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os efeitos de substituição alélica (α) e de dominância (d) foram estimados através de contrastes entre as soluções para os diferentes genótipos utilizando o teste F.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 200 amostras utilizadas, 193 amplificaram através da técnica de PCR. Os fragmentos obtidos apresentaram comprimento de 522 pb (Figura 1).

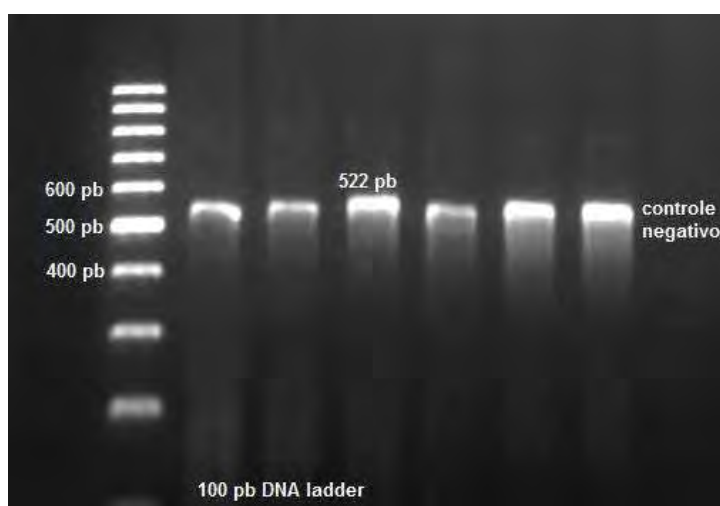


Figura 1. Foto representativa do gel de agarose (1,5%) com os fragmentos de 522 pb.

Na técnica de RFLP, foram obtidos três padrões de digestão. O homocigoto AA corresponde ao fragmento de 522 pb não digerido; o heterocigoto AG apresenta o fragmento de 522 pb não digerido e outros dois fragmentos, um de 441 pb e outro de 81 pb; e o homocigoto GG, que apresenta dois fragmentos, com 441 pb e 81 pb. Esses resultados corroboram com os encontrados por LIEN *et al.* (1997), que foram os primeiros a descrever a substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) no íntron 2 do gene da leptina em *Bos taurus*. O procedimento demonstrou-se eficiente para uma correta genotipagem dos animais, porém bandas menores que 100 pb são difíceis de serem observadas, como pode ser observado nas Figuras 2 e 3. Entretanto, o polimorfismo aqui estudado já foi descrito na literatura como contendo essa banda de 81 pb, e foi por essa razão que está sendo considerada a sua existência.

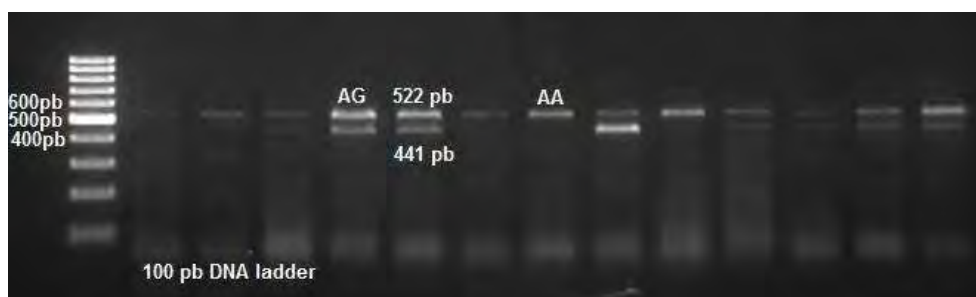


Figura 2. Gel de agarose (2%) demonstrando os padrões de migração AA e AG.

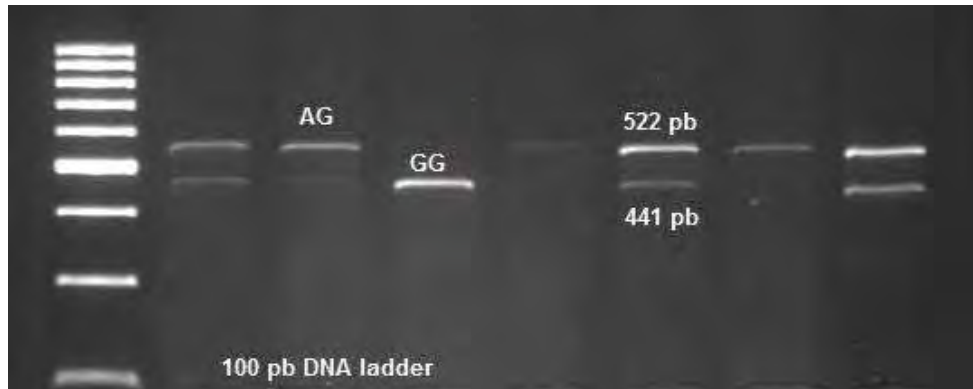


Figura 3. Gel de agarose (2%) demonstrando os padrões de migração AA e AG.

Em um estudo com várias raças de animais *Bos taurus*, *Bos indicus* e cruzados de *Bos taurus* x *Bos indicus*, CHOUDHARY *et al.* (2005) revelaram esses mesmos três genótipos em todas as raças de animais estudados, e foram os primeiros a identificar o polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* em *Bos indicus*. Entretanto, SALMAN *et al.* (2008), trabalhando com bezerros pertencentes a três grupos genéticos, cruzados de fêmeas Nelore e machos Angus, Simental e Canchim, ao estudarem o gene da leptina, utilizando as técnicas moleculares RFLP e SSCP (polimorfismos de conformação de cadeia simples), não encontraram esse polimorfismo presente no íntron 2 da população estudada, o que, segundo os autores, indicaria uma baixa variabilidade genética dessa região do gene da leptina na população estudada.

Para a confirmação dos polimorfismos, três produtos de PCR, um de cada padrão de migração (AA, AG, GG), foram sequenciados, e a sequência encontrada foi depositada no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), sob o número JN689387, sendo indicada a posição do SNP.

Em relação às frequências gênicas e genotípicas observadas, os padrões de migração AA, AG e GG corresponderam, respectivamente, a 58, 104 e 31 indivíduos (Tabela 2).

Tabela 2. Frequências gênicas e genotípicas obtidas através da técnica PCR-RFLP

N	Frequência gênica		Frequência genotípica		
	A	G	AA	AG	GG
193	0,57	0,43	0,30	0,54	0,16

Os valores esperados para as frequências genotípicas foram 0,32, 0,49 e 0,18 para os genótipos AA, AG e GG, respectivamente. As frequências observadas aderem ao teorema de Hardy-Weinberg quando comparadas às esperadas pelo teste do χ^2 ao nível de significância de 5%, pois $\chi^2_{\text{obs}} < \chi^2_{\text{t}}$. Esse resultado indica que a população encontra-se em equilíbrio, o que significa que não houve seleção para o gene da leptina nessa população.

Em relação ao efeito fixo do genótipo, foram analisadas as possíveis associações existentes entre o SNP encontrado e as características produção de leite, gordura e proteína, e porcentagens de gordura e proteína, mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Médias dos quadrados mínimos para produção de leite, gordura e proteína e porcentagem de gordura e proteína em função dos genótipos da leptina obtidos.

Características	Genótipos Leptina					
	AA		AG		GG	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
PL	5,80(A)	0,15	5,77(A)	0,13	5,75(A)	0,17
PG	0,39(A)	0,01	0,38(A)	0,01	0,35(A)	0,02
PP	0,25(A)	0,01	0,24(A)	0,01	0,23(A)	0,01
%G*	6,64(A)	0,11	6,51(AB)	0,09	6,27(B)	0,12
%P*	4,29(A)	0,03	4,27(A)	0,03	4,20(B)	0,03

DP = desvio padrão da média; PL = produção de leite; PG = produção de gordura; PP = produção de proteína;

%G = porcentagem de gordura; %P = porcentagem de proteína

* corresponde ao efeito significativo do genótipo da leptina sobre as características no estudo considerado no modelo ($P < 0.05$).

^{A, B} letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ($P < 0.05$), pelo teste de Tukey-Kramer.

As médias das características porcentagem de gordura e porcentagem de proteína foram estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) entre os genótipos encontrados, sendo que os animais AA apresentaram as maiores médias para as características porcentagem de gordura e proteína. SOUZA *et al.* (2010), estudando o polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* em três linhagens de animais Nelore, encontraram um valor aditivo do alelo A, relacionando a presença desse alelo a maiores valores para a característica peso a desmama, sendo que os animais AA apresentaram médias superiores aos AG e GG. Para as características produção de leite, gordura e proteína não foram observadas associações significativas ao nível de 5%.

Não foram encontrados na literatura estudos relacionando o SNP *LEP-1620 (A/G)* e as características produção de leite, gordura e proteína e porcentagem de gordura e de proteína. Entretanto, GIBLIN *et al.* (2010), estudando dez diferentes SNPs do gene da leptina e de seu receptor em vacas da raça Holandesa, encontraram associações entre os mesmos e características relacionadas à produção de leite. O alelo T do SNP *LEP-2470 (T/C)* foi correlacionado ($p < 0,05$) com uma menor porcentagem de proteína no leite e apresentou uma tendência ($p < 0,10$) de associar-se com maiores produções de leite, enquanto que os SNPs *LEP-1238 (C/G)* e *LEP-963 (C/T)* foram positivamente correlacionados ($p < 0,05$) com porcentagens de gordura e proteína. O alelo T do *LEP-963 (C/T)* demonstrou uma tendência ($p < 0,10$) de estar associado a uma redução na produção de leite. Entretanto, BANOS *et al.* (2008) e LIEFERS *et al.* (2005) não encontraram associações significativas entre os SNPs *LEP-1238 (C/G)* e *LEP-963 (C/T)* e as características produção de leite e de seus constituintes. Essas discrepâncias entre os estudos podem estar relacionadas a diferentes razões, como as diferentes frequências dos alelos entre

as populações estudadas, ou os modelos estatísticos utilizados, ou ainda devido à interação genótipo X ambiente.

Em relação ao controle nos diferentes meses de lactação, foram estimadas as curvas de lactação por genótipo para produção de leite e porcentagens de gordura e proteína.

Tabela 4. Número de observações por genótipo em cada mês de lactação.

ML	PL			%G			%P		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG	AA	AG	GG
1	41	76	21	28	57	19	28	59	19
2	72	121	37	47	85	29	49	86	30
3	64	112	32	48	78	27	49	78	27
4	57	113	31	50	90	29	50	91	30
5	66	122	29	51	99	27	52	101	27
6	59	109	30	47	82	28	47	83	28
7	60	112	31	53	81	28	53	85	28
8	64	112	29	48	91	24	50	94	25
9	43	60	23	32	40	14	32	40	14
10	17	44	15	10	25	10	11	25	10
Total	543	981	278	414	728	235	421	742	238

ML = mês de lactação; PL = produção de leite; %G = porcentagem de gordura; %P = porcentagem de proteína.

As figuras 4, 5 e 6 apresentam as curvas de lactação referentes à produção de leite e às porcentagens de gordura e proteína, de acordo com cada um dos genótipos. A produção de leite apresentou pico entre os meses dois e três da lactação, concordando com os dados encontrados na literatura (TONHATI *et al.*, 2008; ASPILCUETA-BORQUIS *et al.*, 2010) de que, para búfalas leiteiras, o pico normalmente ocorre dois meses após o parto. As trajetórias das curvas foram semelhantes entre os três genótipos, ou seja, as produções de leite por meses de lactação apresentaram valores próximos para todos os animais estudados. O mesmo ocorreu para porcentagem de gordura, os três genótipos obtiveram curvas semelhantes, entretanto os animais GG apresentaram uma queda nos valores de porcentagem de gordura a partir do sexto mês de lactação, porém apresentaram um leve aumento no nono mês. As curvas de lactação para porcentagem de proteína apresentaram as trajetórias mais destoantes, porém, ainda assim, com crescimento no mesmo sentido. No início da lactação, os valores das porcentagens de proteína eram altos para os três genótipos, porém apresentaram uma queda brusca conforme se aproximavam do segundo mês de lactação. Os animais GG obtiveram a maior queda nos valores, no terceiro mês de lactação. As curvas de lactação para as porcentagens de gordura e proteína possuem crescimento semelhante, apresentando maiores valores nos meses finais da lactação. Esse fato pode ser explicado visto que, conforme a produção de leite diminui, os sólidos apresentam-se mais concentrados, aumentando suas porcentagens. ARUMUGHAN & NARAYANAN (1982) observaram grande influência do estágio de lactação sobre os teores de gordura do leite de búfalas da raça Murrah, e PANDEY *et al.* (1986) relataram a importância que o estágio de lactação possui na composição do leite

de búfalas, concordando com os resultados observados por diversos autores (GHOSH & ANANTAKRISHNAN, 1964; SINGH *et al.*, 1979; LAL & NARAYANAN, 1991; DUBEY *et al.*, 1997).

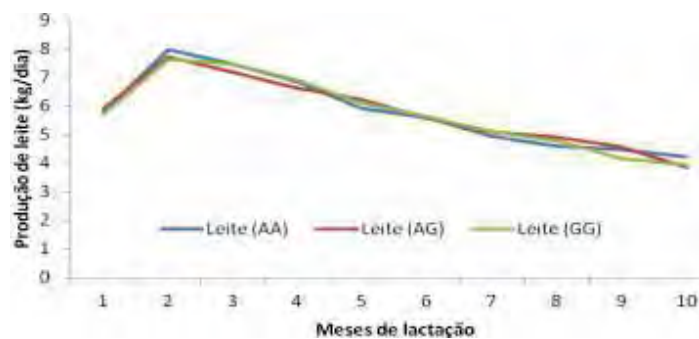


Figura 4. Curvas de lactação dos diferentes genótipos para produção de leite (kg/dia).

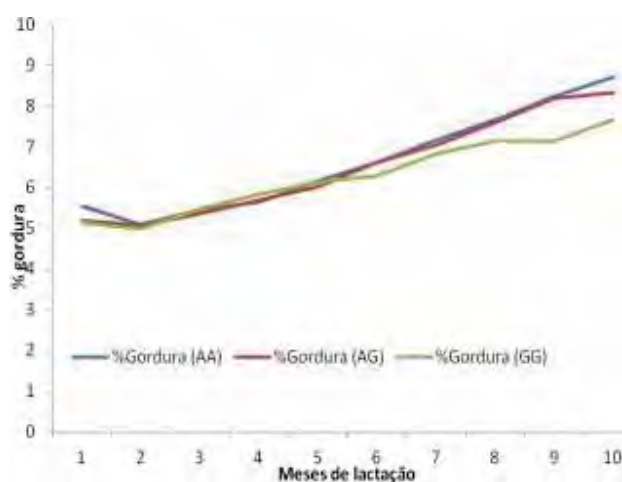


Figura 5. Curvas de lactação dos diferentes genótipos para porcentagem de gordura.

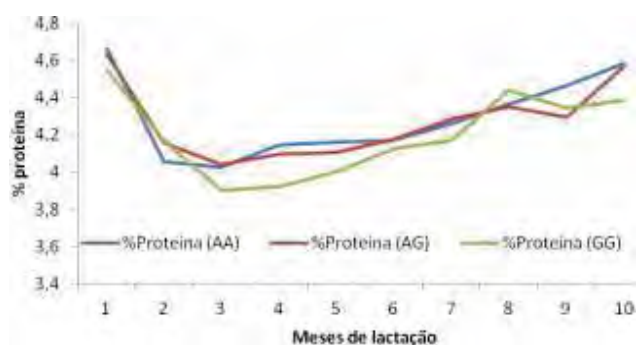


Figura 6. Curvas de lactação dos diferentes genótipos para porcentagem de proteína.

Foram calculados os efeitos de dominância e substituição alélica. Para porcentagem de gordura, o efeito de substituição foi significativo, com a superioridade do alelo A em relação ao alelo G (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito de substituição alélica e efeito de dominância.

	α	p	d	p
%G	0,1659	0,0589	-0,1754	0,1821
%P	0,03762	0,1402	-0,03414	0,3713

%G = porcentagem de gordura; %P = porcentagem de proteína; α = efeito de substituição alélica; d = efeito de dominância; p = significância.

Para a característica porcentagem de proteína, entretanto, os resultados não foram significativos para efeito de substituição alélica e dominância. DI STASIO *et al.* (2003), trabalhando com o gene GH1 como candidato para variação de características de produção de carne em bovinos da raça Piemontesa, encontraram um efeito significativo de substituição alélica, do alelo C em relação ao alelo D, porém os autores advertiram que devido ao número reduzido da amostra trabalhada, apresentando uma distribuição genotípica altamente desbalanceada (os animais DD eram significativamente inferiores na população estudada, apresentando frequência genotípica de 0,05), estudos posteriores se fazem necessários para comprovar os efeitos observados. Além disso, o modelo estatístico utilizado deve ser levado em conta, pois quando se ignoram os efeitos poligênicos as estimativas dos efeitos de um só gene podem se mostrar tendenciosas (KENNEDY *et al.*, 1992). Essas podem ser algumas explicações do porque os resultados se demonstraram contraditórios.

No presente estudo, novas informações sobre o polimorfismo *LEP-1620 (A/G)* foram relatadas, visto que não existem registros na literatura sobre a existência do SNP em questão na espécie bubalina, e como seus genótipos podem estar associados às porcentagens de gordura e proteína do leite de búfalas. Apesar de o gene da leptina ter sido extensivamente estudado na espécie bovina, pouco se sabe sobre seus efeitos nas características produtivas dentro da bubalinocultura.

Nesse trabalho, foi demonstrada uma associação significativa entre os genótipos encontrados e as porcentagens de gordura e proteína do leite de búfalas. Devido a grande importância do hormônio leptina em diversas funções do organismo dos animais, o estudo desse gene e de seus polimorfismos, e suas possíveis associações com outras características de interesse econômico para búfalos se faz necessário, para que melhor possamos entender a função desse gene e seus efeitos na produção da espécie bubalina.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que o polimorfismo encontrado pode ser utilizado futuramente como um marcador molecular para a característica porcentagem de gordura e proteína do leite de búfalas, e estudos posteriores se fazem necessários para consolidar essa informação. Além disso, novos estudos sobre o gene da leptina bubalina se fazem de extrema importância para a descoberta de novos polimorfismos e suas possíveis associações com características produtivas e reprodutivas na espécie bubalina, a fim de serem descobertos novos marcadores moleculares para auxiliar no melhoramento genético da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARUMUGHAN, C.; NARAYANAN, K. M. 1982. Influence of stage of lactation on the physical and chemical characteristics of buffalo milk fat. **Indian Journal of Animal Science**, v. 52, n. 9, p. 731-735, 1982.

ASPILCUETA-BORQUIS, R. R.; BIGNARDI, A. B.; SENO, L. O.; CAMARGO, G. M. F.; MUÑOZ-BERROCAL, M.; ALBUQUERQUE, L. G.; DI PALO, R.; TONHATI, H. Genetic parameters for milk yield analyzed by test-day models in Murrah buffaloes in Brazil. **Italian Journal of Animal Science**, v. 9, p. 179–182, 2010.

BANOS, G.; WOOLLIAMS, J. A.; WOODWARD, B. W.; FORBES, A. B.; COFFEY, M. P. Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3190-3200, 2008.

BUCHANAN, F. C.; FITZSIMMONS, C. J.; VAN KESSEL, A. G.; THUE, T. D.; WINKELMAN-SIM, D. C.; SCHMUTZ, S. M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 105–116, 2002.

CHAGAS, L. M.; BASS, J. J.; BLACHE, D.; BURKE, C. R.; KAY, J. K.; LINDSAY, D. R.; LUCY, M. C.; MARTIN, G. B.; MEIER, S.; RHODES, F. M.; ROCHE, J. R.; THATCHER, W. W.; WEBB, R. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4022-4032, 2007.

CHEBEL, R. C.; SUSCA, F.; SANTOS, J. E. P. Leptin genotype is associated with lactation performance and health of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.2893–2900, 2008.

CHILLIARD, Y.; DELAUAUD, C.; BONNET, M. Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 03–22, 2005.

CHOUDHARY, V.; KUMAR, P.; BHATTACHARYA, T. K.; BUSHAN, B.; SHARMA, A. DNA polymorphism of leptin gene in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, p.740–742, 2005.

COSENZA, G.; PAUCIULLO, A.; FELIGINI, M.; COLETTA, A.; COLIMORO, L.; DI BERARDINO, D.; RAMUNNO, L. A point mutation in the splice donor site of intron 7 in the alphas2-casein encoding gene of the Mediterranean River buffalo results in an allele-specific exon skipping. **Animal Genetics**, v. 40, n. 5, p. 791, 2009.

DI STASIO, L.; BRUGIAPAGLIA, A.; DESTEFANIS, G.; ALBERA, A.; SARTORE, S. GH1 as candidate gene for variability of meat production traits in Piemontese cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 120, p. 358–361, 2003.

DUBEY, P. C.; SUMAN, C. L.; SANYAL, M. K. Factors affecting composition of milk of buffaloes. **Indian Journal of Animal Science**, v. 67, n. 9, p. 802-804, 1997.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. Edinburgh: Longman Group Limited, 1996. 464p.

FAO. Food Agriculture Organization, 2008. Disponível em: < <http://faostat.fao.org>>. Acesso em 07 de fevereiro de 2012.

GIBLIN, L.; BUTLER, S. T.; KEARNEY, B. M.; WATERS, S. M.; CALLANAN, M. J.; BERRY, D. P. Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires. **BMC Genetics**, v. 11, p. 73, 2010.

GHOSH, S. N.; ANANTAKRISHNAN, C. P. Composition of milk. Part V. Effect of stage of lactation. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 17, p. 17-28, 1964.

JOLLY, P. D.; MCDUGALL, S.; FITZPATRICK, L. A.; MACMILLAN, K. L.; ENTWISTLE, K. W. Physiological effects of undernutrition on postpartum anoestrus in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 477–492, 1995.

KADOKAWA, H.; BLACHE, D.; YAMADA, Y.; MARTIN, G. B. Relationships between changes in plasma concentrations of leptin before and after parturition and the timing of first post-partum ovulation in high-producing Holstein dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 12, p. 405–411, 2000.

KENNEDY, B. W.; QUINTON, M.; VAN ARENDONK, J. A. M. Estimation of effects of single genes on quantitative traits. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 2000–2012, 1992.

LAL, D.; NARAYANAN, K. M. Effect of lactation number of the animal on milk total solids. **Indian Journal of Animal Science**, v. 61, n. 3, p. 311-315, 1991.

LIEFERS, S. C.; TE PAS, M. F. W.; VEERKAMP, R. F.; VAN DER LENDE, T. Association between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake and fertility in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1633–1638, 2002.

LIEFERS, S. C.; VEERKAMP, R. F.; TE PAS, M. F.; DELAVAUD, C.; CHILLIARD, Y.; PLATJE, M.; VAN DER LENDE, T. Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows. **Animal Genetics**, v. 36, p. 111-118, 2005.

LIEN, S.; SUNDVOLD, H.; KLUNGLAND, H.; VAGE, D. I. Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). **Animal Genetics**, v.28, p.238–246, 1997.

LIMA, S. P. G. Estudo do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio de crescimento bovino (bGH), em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama. 2003. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MITRA, A.; SCHLEE, P.; KRAUSE, I.; BLUSCH, J.; WERNER, T.; BALAKRISHNAN, C. R.; PIRCHNER, F. Kappa-casein polymorphisms in Indian dairy cattle and buffalo: a new genetic variant in buffalo. **Animal Biotechnology**, v 9, n. 2, p. 81-87, 1998.

MOIOLI, B.; BORGHESE, A. Buffalo breeds and management systems. In: **Proceedings Buffalo Production Research**, Istituto Sperimentale per la Zootecnia Animal, Monterotondo, Rome, Italy, p. 51-76, 2005.

NANDA, A. S.; NAKAO, T. Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: Current status and future prospectus. **Animal Science Journal**, v.74, p.443–455, 2003.

PANDEY, H. S.; KATPATAL, B. G.; BISHT, G. S. Factors affecting milk constituents in Murrah buffaloes. **Indian Journal of Animal Science**, v. 56, n. 4, p. 425-429, 1986.

REN, D. X.; MIAO, S. Y.; CHEN, Y. L.; ZOU, C. X.; LIANG, X. W.; LIU, J. X. Genotyping of the k-casein and β -lactoglobulin genes in Chinese Holstein, Jersey and water buffalo by PCR-RFLP. **Journal of Genetics**, v. 90, n. 1, 2011. Disponível em <<http://www.ias.ac.in/jgenet/OnlineResources/90/e1.pdf>>. Acesso em 13 de abril de 2012.

SALMAN, A. K. D.; GIACHETTO, P. F. **Identificação de polimorfismos no gene da leptina bovina.** EMBRAPA - Comunicado Técnico 336, Porto Velho, RO, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SAS INSTITUTE. User's guide. Cary: SAS Institute, 2000.

SINGH, A.; BASU, S. B.; BHATIA, K. L. Milk fat and SNF percentages of Murrah Buffaloes. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 32, n.4, p. 446-449, 1979.

SOUZA, F. R. P.; MERCADANTE, M. E. Z.; FONSECA, L. F. S.; FERREIRA, L. M. S.; REGATIERI, I. C.; AYRES, D. R.; TONHATI, H.; SILVA, S. L.; RAZOOK, A. G.; ALBUQUERQUE, L. G. Assessment of *DGAT1* and *LEP* gene polymorphisms in three Nelore (*Bos indicus*) lines selected for growth and their relationship with growth and carcass traits. **Journal of Animal Science**, v.88, p.435-441, 2010.

TONHATI, H.; ARAUJO NETO, F. R.; BALDI, F.; ASPILCUETA-BORQUIS, R. R. Association study between milk traits and mozzarella yield using Bayesian inference. In: **Proceedings of 9th World Buffalo Congress**, Buenos Aires, Argentina, p. 339-341, 2010.

TONHATI, H.; CERON-MUNOZ, M. F.; OLIVEIRA, J. A.; EL FARO, L.; LIMA, A. L. F.; ALBUQUERQUE, L. G. Test-day milk yield as a selection criterion for dairy buffaloes (*Bubalus bubalis* Artiodactyla, Bovidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.674-679, 2008.

ZHANG, Y.; PROENÇA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v.372, p.425-432, 1994.

CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO GENE RECEPTOR DE MELATONINA *MTRN1A* E SUAS ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS EM BÚFALAS (*Bubalus bubalis*).

RESUMO – O principal fator ambiental que afeta a regulação da sazonalidade reprodutiva é o fotoperíodo, através da secreção de melatonina. O receptor de melatonina *MTRN1A* parece estar envolvido na regulação da sazonalidade reprodutiva. O objetivo do presente estudo foi a identificação de polimorfismos no gene *MTRN1A* bubalino e suas possíveis associações com as características idade ao primeiro parto e primeiro intervalo entre partos em búfalas. Foram coletadas amostras de pelo da cauda de 200 búfalas, e após a extração do DNA as amostras foram genotipadas pela técnica PCR-RFLP. Três amostras foram sequenciadas e foi encontrado um SNP na posição 72 do éxon 2 do gene *MTRN1A*, caracterizado pela substituição de um C por um T. As médias da idade ao primeiro parto e do primeiro intervalo entre partos foram avaliadas em um modelo misto, e os genótipos encontrados (CC, CT, TT) foram associados às características estudadas porém não foram significativos ($p > 0,05$).

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, melatonina, *MTRN1A*, SNP.

ABSTRACT – The main environmental factor that affects reproductive seasonality regulation is the photoperiod, through melatonin secretion. Melatonin receptor *MTRN1A* seems to be involved in the seasonal breeding regulation. The aim of the present study was to identify polymorphisms in the *MTRN1A* buffalo gene and its possible associations with age at first calving and interval between first and second calving traits in buffalo cows. Samples of tail hair from 200 buffalo cows were collected, and after DNA extraction the samples were genotyped by PCR-RFLP. Three samples were sequenced and an SNP was found at position 72 of exon 2 in the *MTRN1A* gene, characterized by the substitution of an C for a T. The means from age at first calving and interval between first and second calving were evaluated by a mixed model, and the genotypes found (CC, CT, TT) were associated with the traits studied but weren't significant ($p>0,05$).

Keywords – *Bubalus bubalis*, melatonin, *MTRN1A*, SNP.

INTRODUÇÃO

O búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) é um importante recurso da pecuária em diversos países da Ásia, região Mediterrânea e América Latina (PERERA, 2010). Dentre as espécies produtoras de carne e leite, o búfalo vem se destacando como alternativa na disponibilidade de nutrientes de alto valor biológico, porém ainda existem limitações reprodutivas em relação a esses animais.

No Brasil, a indústria para produção de derivados do leite de búfalas gera um faturamento de aproximadamente 55 milhões de dólares por ano (ABCB, 2010), sendo 70% da produção de derivados correspondente à *mozzarella* de búfala, produto que possui forte valor agregado e melhor qualidade nutricional que os derivados bovinos. Entretanto, a estacionalidade reprodutiva apresentada pelas búfalas ocasiona uma concentração dos partos no outono (BARUSELLI, 1993) e baixa eficiência reprodutiva durante o resto do ano, o que causa grande deficiência de leite no mercado e, conseqüentemente, de *mozzarella*, causando possíveis prejuízos ao produtor e à cadeia leiteira. Portanto, é de grande interesse encontrar meios de detectar búfalas que apresentem menor sensibilidade ao fotoperíodo, resultando em animais poliéstricos sazonais, semelhantes aos bubalinos criados próximos a região do Equador (GILL *et al.*, 1973).

Os bubalinos, quando criados em localidades distantes da região equatorial, apresentam comportamento reprodutivo influenciado positivamente pela diminuição de horas de luz do dia (ZICARELLI, 1990). Os animais possuem uma gama de estratégias para garantir chances ótimas de sobrevivência, dentre elas, processos para garantir tempo ótimo da função reprodutiva (BODEN & KENNAWAY, 2006). O principal mecanismo adaptativo amplamente observado na natureza é a capacidade de restringir a atividade reprodutiva somente para a época do ano que coincide com as condições mais propícias para a sobrevivência dos recém-nascidos (MALPAUX *et al.*, 2001). Muitos organismos, incluindo desde as bactérias até os grandes mamíferos, exibem ritmicidade em diversos processos biológicos de acordo, por exemplo, com a estação do ano ou a hora do dia (SOUSA *et al.*, 2008).

Através de fatores externos ou de mecanismos particulares de cada espécie, ritmos fisiológicos internos são formados, chamados de ritmos circadianos. São ritmos biológicos que apresentam duração de aproximadamente 24 horas e que são mantidos independentemente das condições ambientais, porém funcionam em sincronia com o ambiente. Em mamíferos, os ritmos circadianos são controlados por um relógio central, os Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ), que estão localizados no hipotálamo e recebem sinais do ambiente, principalmente por fotorrecepção pela retina, e transmitem essas informações por vias eferentes neurais e humorais (RICHTER *et al.*, 2004). Mudanças no comprimento do dia representam um fator crítico para muitos mamíferos que se reproduzem sazonalmente (BITTMAN & KARSCH, 1984).

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). A pineal funciona como um transdutor neuroendócrino, recebendo estímulos da retina e dos NSQ, e transmitindo-as para o sistema reprodutor como um todo por meio do padrão de secreção de melatonina (SIMONNEAUX & RIBELAYGA, 2003), liberando este hormônio durante a fase de escuro e marcando a existência e duração da noite (REITER & HESTER, 1966). 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).

Em diversas raças de ovinos, caprinos e bovinos, foram encontrados polimorfismos no éxon 2 do gene do receptor *MTNR1A* (MESSER *et al.*, 1997). A substituição na sequência do gene *MTRN1A* de uma guanina por uma adenina na posição 612 em ovelhas, e na posição 52 em cabras, apresentaram associação com animais de menor sazonalidade reprodutiva (CARCANGIU *et al.*, 2009a e 2009b).

Dessa forma, o estudo de polimorfismos e genes candidatos para um maior entendimento da sazonalidade reprodutiva é de extrema importância para melhorar a cadeia produtiva em búfalos. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi a identificação de SNPs no gene receptor de melatonina *MTRN1A* e suas possíveis associações às características reprodutivas idade ao primeiro parto (IPP) e primeiro intervalo entre partos (PIEP).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram coletadas amostras de pelo da cauda de 200 búfalas, pertencentes ao rebanho comercial da fazenda Santa Eliza, localizada no município de Dourado (SP), que integra o Programa de Controle Leiteiro associado ao Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP-Jaboticabal (SP). As amostras coletadas foram devidamente identificadas e armazenadas a 4° C em embalagens plásticas individuais.

Extração do DNA

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP-Jaboticabal (SP).

A extração de DNA das amostras coletadas foi realizada a partir da metodologia Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico adaptada por LIMA (2003). Cerca de 40 folículos pilosos por animal foram depositados em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) e centrifugados rapidamente. Após a centrifugação, adicionou-se 500 µL de solução TE-Tween (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween 20) em cada tubo, levando-os à incubação no banho a 65°C por uma hora e meia, agitando-os periodicamente. Em seguida, foram adicionados 2 µL de proteinase K por amostra (600 µg/µL) e os mesmos foram incubados a 55°C por seis horas, com agitação periódica, sendo, posteriormente, incubados a 37°C por uma noite.

Após esses procedimentos, adicionou-se um volume de PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico) para um volume de amostra e os tubos foram agitados em agitador automático por dez segundos, sendo centrifugados, em seguida, por dez minutos a 12000 rpm a 23°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, sendo o volume final de aproximadamente 300 µL.

Em seguida, foi feita a precipitação do DNA com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M e etanol absoluto gelado. Os tubos foram misturados por inversão e colocados no freezer (-80°C) por uma hora. Após esse período, foram centrifugados a 4°C por 25 minutos, a 12000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o DNA remanescente foi completamente seco em temperatura ambiente, sendo em seguida armazenado em 100 µL de TE (10:1).

Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras de DNA extraídas foram submetidas à técnica de PCR para amplificação. As sequências dos *primers* utilizados foram: *Foward* 5'- TGT GTT TGT GTT GAG CCT GG -3' e *Reverse* 5'- ATG GAG AGG GTT TGC GTT TA -3', descrita por MESSER *et al.* (1997).

As soluções *mix* para a PCR foram preparadas com um volume final de 15 μL , contendo: 1 μL de DNA (75 ng), 1,35 μL de cada *primer* (15 pM), 4,8 μL de água e 6,5 μL de Go Taq® Colorless Master Mix (Promega), que contém, em sua formulação, 400 μM de dATP, 400 μL de dGTP, 400 μL de dCTP, 400 μL dTTP e 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2).

Para amplificação das regiões de interesse, foi utilizado o seguinte programa: 94°C por três minutos; 94°C por um minuto, 58°C por 65 segundos e 72°C por um minuto (30 ciclos); seguido de extensão final a 72°C por dez minutos. Após o ciclo de amplificações, as amostras ficaram armazenadas a 4°C.

Para verificação da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%), corados com GelRed™ (Uniscience), por 50 minutos a 90 V. O tamanho esperado do fragmento era de 824 pares de base (pb). A visualização foi feita com o uso do aparelho Gel-Doc (Bio-Rad®), em luz ultravioleta (UV).

PCR-RFLP (Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição)

Nessa etapa, para o preparo do *mix* da técnica RFLP, foram utilizados 5 μL do produto de PCR, 0,5 μL da enzima de restrição HpaI, 1 μL do tampão 10X Buffer B e 9 μL de água, em um volume final de 15,5 μL . As amostras foram submetidas ao termociclador, a 37°C por uma hora, para a possível digestão do fragmento. Em seguida, foram coradas com GelRed™ (Uniscience) e submetidas a eletroforese em gel de agarose (2%), por aproximadamente 90 minutos, a 110 V. A visualização foi feita em luz UV e o gel foi documentado pelo aparelho Gel-Doc (Bio-Rad®).

Sequenciamento e análise das sequências obtidas

Três amostras de produtos de PCR, uma de cada um dos diferentes padrões de clivagem observados através da técnica de PCR-RFLP foram sequenciadas, para validação dos resultados da clivagem. Essa etapa foi realizada por serviço terceirizado, pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP. Foi utilizada a técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs), descrita por SANGER *et al.* (1977), e utilizou-se o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), em um sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems). As sequências dos fragmentos obtidos foram alinhadas utilizando-se o programa CodonCode Aligner®, para edição do pareamento dos dados, montagem das sequências contíguas e caracterização das sequências nucleotídicas.

Análises estatísticas

As frequências gênicas e genóticas foram determinadas a partir da contagem direta dos genótipos observados por meio do gel de agarose. O gene em questão apresenta somente dois alelos, com frequências gênicas p e q , respectivamente. As frequências gênicas, genóticas (F) e o teste do χ^2 para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos dos genes estudados foram estimadas pelas seguintes equações:

$$p(C) = \frac{N_{CC} + (0,5N_{CT})}{N}$$

$$q(T) = \frac{N_{TT} + (0,5N_{CT})}{N}$$

$$F(CC) = \frac{N_{CC}}{N}$$

$$F(CT) = \frac{N_{CT}}{N}$$

$$F(TT) = \frac{N_{TT}}{N}$$

Onde N_{CC} e N_{TT} correspondem, respectivamente, ao número de indivíduos homocigotos CC e TT, N_{CT} corresponde ao número de indivíduos heterocigotos CT e N representa o número total de indivíduos.

Para testar a aderência das frequências observadas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, as frequências genóticas esperadas foram estimadas a partir da expansão do binômio descrito por FALCONER & MACKAY (1996):

$$(x_A + x_G)^2 = x_A^2 + 2x_Ax_G + x_G^2$$

Onde x_A^2 e x_G^2 representam as frequências esperadas para os homocigotos dos alelos C e T, respectivamente, e $2x_Ax_G$ corresponde à frequência esperada dos heterocigotos CT.

As características idade ao primeiro parto e intervalo entre partos foram avaliadas em um modelo misto, utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (2000). Para a característica primeiro intervalo entre partos, utilizou-se o seguinte modelo linear:

$$y = \mu + \textit{Touro} + \textit{GC} + b_1(I_{ijk} - \bar{I}) + b_2(I_{ijk} - \bar{I})^2 + \textit{gen} + e$$

Onde:

y = variável dependente (primeiro intervalo entre partos)

μ = média geral para a população para as características em estudo

Touro = efeito aleatório do pai da búfala

GC = efeito fixo de grupo contemporâneo formado pelo ano e estação de parto (água e seca)

I_{ijk} = efeito da idade da vaca ao parto, como covariável

\bar{I} = média da covariável idade

b1 = coeficiente da regressão linear para idade da vaca ao parto

b2 = coeficiente quadrático para idade da vaca ao parto

gen = efeito fixo do genótipo

e = erro aleatório.

Para a característica idade ao primeiro parto, o modelo linear utilizado foi:

$$y = \mu + \textit{Touro} + \textit{GC} + \textit{gen} + e$$

Onde:

y = variável dependente (idade ao primeiro parto)

μ = média geral para a população para as características em estudo

Touro = efeito aleatório do pai da búfala

GC = efeito fixo de grupo contemporâneo formado pelo ano e estação de nascimento

gen = efeito fixo do genótipo

e = erro aleatório.

As médias dos valores para os diferentes genótipos foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 200 amostras utilizadas, 191 amplificaram através da técnica de PCR. Os fragmentos obtidos apresentaram comprimento de 824 pb, como pode ser observado na Figura 1.

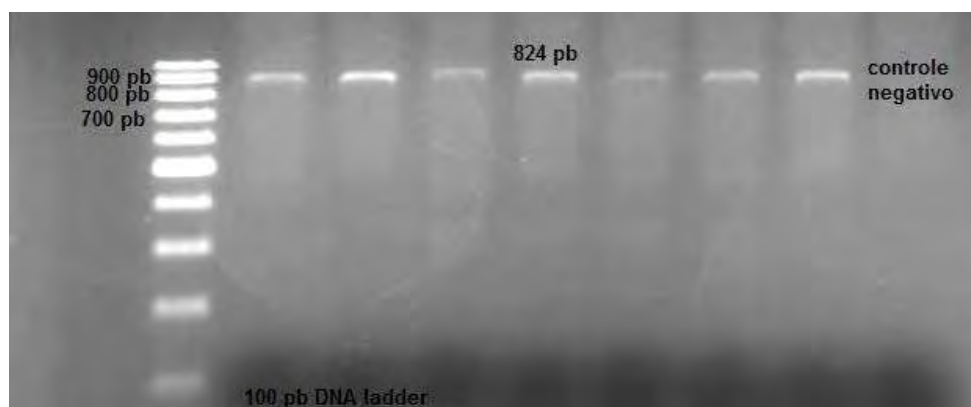


Figura 1. Foto representativa do gel de agarose (1%) com os fragmentos de 824 pb.

Através da técnica de RFLP, foram obtidos três padrões de digestão. O homocigoto TT corresponde ao fragmento de 824 pb não digerido, o heterocigoto CT apresenta o fragmento de 824 pb não digerido e outros dois fragmentos, um de 745 pb e outro de 79 pb, e o homocigoto CC apresentando os fragmentos de 745 pb e 79 pb. Bandas menores que 100 pb são difíceis de serem visualizadas, como podemos observar na Figura 2. Entretanto, esse polimorfismo já foi descrito na literatura, como contendo uma banda de 79 pb, e é por essa razão que essa banda está sendo considerada aqui. Esses resultados concordam com CARCANGIU *et al.* (2011), que observaram esse polimorfismo no gene *MTRN1A* em bubalinos, associando-o à sazonalidade reprodutiva, demonstrando que os animais TT apresentam maior aptidão para se reproduzirem fora de sua época ideal. A técnica de RFLP demonstrou-se eficaz para a genotipagem dos animais, como é mostrado na Figura 2.

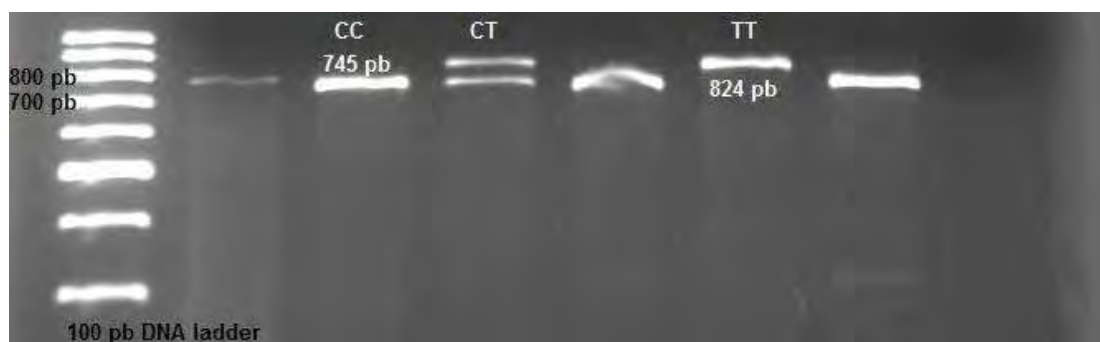


Figura 2. Gel de agarose (2%) com os padrões de migração dos três genótipos.

Para a confirmação dos polimorfismos, três produtos de PCR, um de cada padrão de migração (CC, CT, TT), foram sequenciados, e a sequência encontrada foi depositada no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), sob o número JN689386, sendo indicada a posição do SNP. Esse polimorfismo foi relacionado à sazonalidade reprodutiva em algumas raças de ovinos e caprinos (PELLETIER *et al.*, 2000; CHU *et al.*, 2006).

Em relação às frequências gênicas e genotípicas observadas, os padrões de migração CC, CT e TT corresponderam, respectivamente, a 43, 99 e 49 indivíduos (Tabela 1).

Tabela 1. Frequências gênicas e genotípicas obtidas através da técnica PCR-RFLP.

N	Frequência gênica		Frequência genotípica		
	C	T	CC	CT	TT
191	0,48	0,52	0,22	0,52	0,26

Os valores esperados para as frequências genotípicas foram 0,23, 0,50 e 0,27 para os genótipos CC, CT e TT, respectivamente. As frequências observadas aderem ao teorema de Hardy-Weinberg quando comparadas às esperadas pelo teste do χ^2 ao nível de significância de 5%, pois $\chi^2_{obs} < \chi^2_t$. Esse resultado indica que a população encontra-se em equilíbrio, o que significa que não houve seleção para o gene *MTRN1A* nessa população.

Em relação ao efeito fixo do genótipo, foram analisadas as possíveis correlações existentes entre o SNP encontrado e as características idade ao primeiro parto e primeiro intervalo entre partos, mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Médias dos quadrados mínimos da idade ao primeiro parto e primeiro intervalo entre partos em função dos genótipos da melatonina obtidos.

Características	Genótipos Melatonina					
	CC		CT		TT	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
IPP	35,28	0,74	35,28	0,56	34,30	0,76
PIEP	16,52	0,73	16,18	0,53	15,29	0,87

EP = desvio padrão da média; IPP = idade ao primeiro parto; PIEP = primeiro intervalo entre partos

As médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), porém não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os genótipos. Esses resultados podem significar que o SNP encontrado não contribui para a variação das características estudadas.

Não foram encontrados na literatura trabalhos relacionando polimorfismos do gene *MTRN1A* com idade ao primeiro parto e intervalo entre partos em búfalas. Entretanto, AHMAD *et al.* (1981), estudando os efeitos do mês e estação do ano em que ocorreu o parto de búfalas criadas no Paquistão, demonstraram que búfalas que pariram entre o inverno e a primavera tiveram um intervalo entre partos significativamente maior do que aquelas que pariram entre o verão e o outono. Considerando que a luminosidade é afetada pelas diferentes estações do ano e que o principal fator ambiental que afeta a

regulação da sazonalidade reprodutiva é o fotoperíodo, através da secreção de melatonina, esses resultados podem ser indícios de como a melatonina afeta o intervalo entre partos de búfalas, nas diferentes estações do ano.

A melatonina exerce um papel fundamental na regulação da sazonalidade reprodutiva, através do fotoperíodo, e trabalhos realizados em diferentes países (OBI REDDY *et al.*, 1987; SHAH, 1990; VALE *et al.*, 1990; BARUSELLI *et al.*, 1993; ZICARELLI, 1994; VALE & RIBEIRO, 2005) demonstraram que a eficiência reprodutiva dos bubalinos é afetada em maior parte por fatores ambientais, como a quantidade de horas de luz no dia, e não por fatores genéticos.

PALUDO *et al.* (2011) estudaram o gene *MTRN1A* para avaliar seus possíveis efeitos na idade à puberdade em búfalas Mediterrâneas criadas na Itália, porém seus resultados não foram significativos. Entretanto, estudos com ovelhas da raça Dorset (MATEESCU *et al.*, 2009; MURA *et al.*, 2010) demonstraram que o genótipo do gene *MTRN1A* influencia a puberdade e diminui o intervalo entre o primeiro e o segundo parto.

Na Itália, MAYMONE & PILLA (1961) observaram diminuição no intervalo entre partos durante os meses com maior número de partos (agosto a outubro). ROLIM FILHO *et al.* (2009) encontraram menores intervalos entre partos durante a estação chuvosa no Brasil. AHMAD *et al.* (1981), no Paquistão, também observaram grande influência da estação do ano no tamanho do intervalo entre partos, sendo maiores no inverno e primavera, e menores no verão e outono. Esses trabalhos enfatizam a influência de características ambientais, como estação do ano, na regulação da atividade reprodutiva em búfalos.

Nutrição, clima, raça e estação do ano são alguns dos fatores que podem influenciar na idade à puberdade e, conseqüentemente, na idade ao primeiro parto (BORGHESE *et al.*, 1994, 1996, 1997; TERZANO *et al.*, 1996, 1997).

CONCLUSÃO

No presente estudo, avaliou-se a presença de polimorfismos no gene bubalino do receptor de melatonina *MTRN1A*, previamente estudado e associado à sazonalidade reprodutiva em búfalas. O SNP encontrado não demonstrou associação às características idade ao primeiro parto e primeiro intervalo entre partos ($P < 0,05$).

Entretanto, estudos posteriores se fazem necessários para uma melhor compreensão do gene da melatonina e seus receptores nas funções reprodutivas dos búfalos. Devido a grande importância da melatonina na regulação da sazonalidade reprodutiva, o estudo desse gene se justifica para que possamos entender melhor sua influência sobre características reprodutivas na espécie bubalina. Além disso, podem existir outros polimorfismos no gene da melatonina e de seus receptores que estejam positivamente associados às características reprodutivas de interesse econômico para búfalas leiteiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCB. Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 2010. Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br>>. Acesso em 12 de janeiro de 2012.

AHMAD, N.; CHAUDHRY, R. A.; KHAN, B. B. Effect of month and season of calving on the length of subsequent calving interval in Nili-Ravi buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 3, p. 301-306, 1981.

BARUSELLI, P. S. **Manejo reprodutivo de bubalinos**. São Paulo: SAA/Cordenadoria da Pesquisa Agropecuária: Instituto de Zootecnia/EEZ-Vale do Ribeira, 46 p., 1993.

BARUSELLI, P. S.; OLIVEIRA, J. F. S.; MENDES, M. L. M.; JORGE, A. M.; FUJII, T.; PALAZZO, J. P. C. **Diagnóstico da bubalinocultura do Vale do Ribeira**. Campinas: CATI, 16 p., 1993.

BITTMAN, E. L.; KARSCH, F. J. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 30, p. 585–593, 1984.

BODEN, M. J.; KENNAWAY, D. J. Circadian rhythms and reproduction. **Reproduction**, v. 132, p. 379-392, 2006.

BORGHESE, A.; BARILE, V. L.; FICCO, G.; GALASSO, A.; MARCHIORI, E.; TERZANO, G. M. Feeding systems effect on reproduction performances in buffalo heifers. **In: Proceedings of 5th World Buffalo Congress**, Caserta, Italy, p. 697-701, 1997.

BORGHESE, A.; BARILE, V. L.; TERZANO, G. M.; PILLA, A. M.; PARMEGGIANI A. Melatonin trend during season in heifers and buffalo cows. **Bubalus bubalis**, v. 1, p. 61–64, 1995.

BORGHESE, A.; TERZANO, G. M.; BARILE, V. L.; ANNICCHIARICO, G.; ALLEGRINI, S.; ZICARELLI, L. et al. Puberta e mantenimento dell'attività ciclica ovarica nella bufala. **Agricoltura Ricerca**, v. 153, p. 5-16, 1994.

BORGHESE, A.; TERZANO, G. M.; BARILE, V. L.; CATALANO, A.; MALFATTI, A. Onset puberty in buffalo heifers in different feeding and management systems. **In: Proceedings of International Symposium On Buffalo Resources and Production Systems**, Cairo, Egypt, p. 41-46, 1996.

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 1A (*MTNR1A*) gene and its association with reproductive seasonality. **Theriogenology**, v. 76, n.3, p. 419-426, 2011.

CARCANGIU, V.; MURA, M. C.; VACCA, G. M.; PAZZOLA, M.; DETTORI, M. L.; LURIDIANA, S.; BINI, 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, 2009a.

CARCANGIU, V.; VACCA, G. M.; MURA, M. C.; DETTORI, M. L.; PAZZOLA, M.; LURIDIANA, S.; BINI, P. Relationship between *MTNR1A* melatonin receptor gene polymorphism and seasonal reproduction in different goat breeds. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 71– 78, 2009b.

CHU, M. X.; HE, Y. Y.; CHENG, D. X.; YE, S. C.; FANG, L.; WANG, Y. Y. Association between expression of reproductive seasonality and alleles of melatonin receptor 1A in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 276–284, 2006.

DUBOCOVICH, M. L.; RIVERA-BERMEDEZ, M. A.; GERDIN, M. J.; MASAN, M. I. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. 1093–1098, 2003.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. Edinburgh: Longman Group Limited, 464p., 1996.

GILL, R. C.; GANGWAR, P. C.; KOONER, D. S. Studies on the oestrus behavior in buffaloes. **Indian Journal of Animal Science**, v. 43, p. 472-475, 1973.

MALPAUX, B.; MIGAUD, M.; TRICOIRE, H.; CHEMINEAU, P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, p. 336–347, 2001.

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.

MAYMONE, B.; PILLA, A. M. L' intervallo interpartum della bufala in rapporto alla stagionalità dei parti ed all'effetto di altri fattori extragenetici. **Annali Istituto Sperimentale Zootecnico**, Palermo, v. 15, p. 15-60, 1961.

MESSER, L. A.; WANG, L.; TUGGLE, C. K.; YERLE, M.; CHARDON, P.; POMP, D.; WOMACK, J. E.; BARENDSE, W.; CRAWFORD, A. M.; NOTTER, D. R.; ROTHSCHILD, M. F. Mapping of the melatonin receptor 1a (*MTNR1A*) gene in pigs, sheep and cattle. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 368–370, 1997.

MIGAUD, M.; DAVEAU, A.; MALPAUX, B. *MTNR1A* Melatonin receptors in the ovine pre-mammillary hypothalamus: day-night variation in the expression of the transcripts. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 393–398, 2005.

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.

NOWAK, R.; RODWAY, R. G. Effect of intravaginal implants of melatonin on the onset of ovarian activity in adult and prepubertal ewes. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 74, p. 287–293, 1985.

OBI-REDDY, A.; TRIPATHI, V. N.; RAINA, V. S. Effect of climate on the incidence of oestrus and conception rate in murrah buffaloes. **Indian Journal of Animal Science**, v. 57, p. 204-207, 1987.

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. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 76, n. 3, p. 157-160, 2011.

PARMEGGIANI, A.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G.; ESPOSITO, L.; SEREN, E.; ACCORSI, P. A.; SOFLAI, S. M. Melatonin and reproductive seasonality in the buffalo cow. **Agricoltura Ricerca**, v. 153, p. 41–48, 1994.

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. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1096 –1101, 2000.

PERERA, B. M. A. O. Reproductive cycles of buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3, p. 194-1999, 2010.

RICHTER, H. G.; TORRES-FARFN, C.; ROJAS-GARCIA, P. P.; CAMPINO, C.; TORREALBA, F.; SERÓN-FERRÉ, M. The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. **Journal of Biology Research**, v. 37, p. 11-28, 2004.

REITER, R. J; HESTER, R. J. Interrelationships of the pineal gland, the superior cervical ganglia and the photoperiod in the regulation of the endocrine systems of hamsters. **Endocrinology**, v. 79, p. 1168-1170, 1966.

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, p. 754-763, 2009.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SAS INSTITUTE. User's guide. Cary: SAS Institute, 2000.

SHAH, S.N.H. **Prolonged calving intervals in Nili-Ravi buffalo.** 1990. 162 p. Tese (Doutorado) – Utrecht: Rijksuniversiteit te Utrecht, 1990

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 325-395, 2003.

SOUSA, C. E. C.; CRUZ-MACHADO, S. S; TAMURA, E. K. Os ritmos circadianos e a reprodução em mamíferos. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução.** Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 15-20, 2008.

TERZANO, G. M.; BARILE, V. L.; FRANCIA, U.; MALFATTI, A.; TODINI, L.; BORGHESE, A. Onset of puberty in buffalo heifers bred on pasture or in intensive feeding systems. **Bulgarian Journal Agricultural Science**, v. 2, p. 89-92, 1996.

TERZANO, G. M.; GALASSO, A.; BARILE, V. L.; PACELLI, C.; MONTEMURRO, N.; BORGHESE, A. Effect of feeding systems and puberty on blood metabolites trends in buffalo heifers. In: **Proceedings of 5th World Buffalo Congress**, Caserta, Italy, p. 951-956, 1997.

VALE, W. G.; OHASHI, O. M.; SOUSA, J. S.; RIBEIRO, H. F. L. Studies on the reproduction of water buffalo in the Amazon basin. In: **Livestock Reproduction in Latin America**. Viena: Joint FAO/IAEA division of Nuclear Techniques in food and Agriculture, p. 201-210, 1990.

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, n. 2, p. 63-73, 2005.

WEAVER, D. R.; LIU, C.; REPERT, S. M. Nature's knock-out: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. **Molecular Endocrinology**, v. 10, p. 1478–1487, 1996.

ZICARELLI, L. **Considerazioni sull'allevamento bufalino**. Salerno: Ente Regionale sviluppo Agricolo in Campânia, 1990.

ZICARELLI, L. Management under different environmental conditions. **Buffalo Journal**, v.44, p. 17–38, 1994.