



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

CINTIA LUANA PINHEIRO SANTOS

NOVOS POLIMORFISMOS DOS GENES *LALBA* E *OLRI* E SUAS ASSOCIAÇÕES
COM CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO DE LEITE EM BÚFALAS

BELÉM

2025

CINTIA LUANA PINHEIRO SANTOS

**NOVOS POLIMORFISMOS DOS GENES *LALBA* E *OLRI* E SUAS ASSOCIAÇÕES
COM CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO DE LEITE EM BÚFALAS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Doutorado da Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Produção animal, para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho

BELÉM

2025

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

- S237n Santos, Cintia Luana Pinheiro
Novos polimorfismos dos genes LALBA e OLR1 e suas associações com características de produção de leite em búfalas / Cintia Luana Pinheiro Santos. - 2025.
63 f.: il.
- Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia (PPGSPAA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2025.
Orientador: Prof. Dr. Ednaldo Silva Filho
1. Melhoramento genético animal. 2. Bubalinocultura leiteira. 3. Biologia molecular. 4. Pará. I. Silva Filho, Ednaldo, *orient.* II. Título
-

CINTIA LUANA PINHEIRO SANTOS

**NOVOS POLIMORFISMOS DOS GENES *LALBA* E *OLRI* E SUAS ASSOCIAÇÕES
COM CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO DE LEITE EM BÚFALAS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Doutorado da Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal da Amazônia: área de concentração Saúde e Produção animal, para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho

Aprovado em: 30/04/2025

BANCA EXAMINADORA



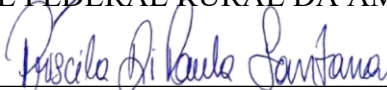
Dr. Ednaldo da Silva Filho - Orientador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



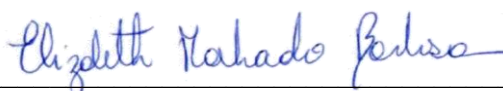
Dr. Igor Guerreiro Hamoy - 1º Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



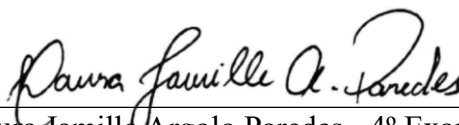
Dra. Priscila Di Paula Bessa Santana - 2º Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



Dra. Elizabeth Machado Barbosa - 3º Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ – UNIFAP



Dra. Laura Jamille Argolo Paredes - 4º Examinador

UNIVERSIDADE DA AMAZÔNIA – UNAMA

Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho – 1º Suplente

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

Dr. Caio Santos Silva – 2º Suplente

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA

DEDICATÓRIA

Dedico esta, bem como, todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais Cintia e Augusto, minha querida irmã Cecília que com seu amor deixou tudo mais leve nesse período e ao meu amor Paulo Victor que sempre acreditou em meu potencial e que eu chegaria até aqui, te amo. E as minhas amigas Ju e Rafa que não mediram esforços para me apoiar e proporcionar momentos felizes ao longo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora de Nazaré, que sempre estiveram presentes em todas as conquistas que pude alcançar. De maneira que, se não fosse por ele e pela intercessão dela eu não teria chegado até esse momento.

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

A minha pequena irmã Cecília, que mesmo sem entender me salvou de muitos momentos difíceis com seu coração doce e gentil. Sua inocência me fez ver o mundo melhor e mais bonito. Obrigada por ser luz na minha vida. Te amo irmã (como ela sempre me chamou).

Ao meu excelente orientador e amigo, Dr. Ednaldo Filho que desde o 4º semestre de minha graduação em Zootecnia me recebeu em seu grupo de pesquisa de braços abertos, sempre me deixando ser quem eu sempre quis ser, uma pesquisadora responsável e grata por conseguir desenvolver meu lado profissional. O senhor foi indispensável nesse meu crescimento, tudo que alcancei hoje dou graças a você. Obrigada por ter acreditado em mim.

As amigas do laboratório de Biologia Molecular/UFRA Elem e Roberta, que sempre foram solícitas e parceiras em todas as etapas do doutorado. Em especial as minhas amigas do coração Juliana Vasconcelos e Rafaelle Guimarães que foram incansáveis e indispensáveis nessa caminhada, meus mais sinceros agradecimentos por todos os momentos que vocês me colocaram de pé e não me deixaram desistir. Obrigada pela paciência e pelo companheirismo.

Ao meu amor, parceiro e melhor amigo Paulo Figueiredo pelo companheirismo, pelo amor, pela força, pelo apoio incansável de todos os dias e principalmente por nunca ter descreditado de mim. Você é o melhor companheiro de vida que eu poderia ter e saiba essa conquista também é sua. Te amo demais.

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

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Os búfalos exercem uma notável função econômica, social e ambiental no mundo, seu leite é o segundo mais produzido e apresenta ótimos índices de composição nutricional. E nesse interim, se faz necessário compreender os fatores genéticos buscando os mecanismos que podem influenciar na produtividade de animais de produção. Com isso, objetivou-se investigar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes do metabolismo proteico e lipídico, a fim de associá-los com dados de produção leiteira em búfalas da região amazônica. Para isso, foram coletadas amostras de sangue de 85 fêmeas pertencentes a uma propriedade do município de Bujaru/Pa. As extrações de DNA foram realizadas através do método fenólico, seguido de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Purificação e Sequenciamento das regiões codificadoras dos genes *LALBA* (833 pb) e *OLRI* (750 pb). Os possíveis sítios de ligação a fatores de transcrição em ambos os genes, foram investigados pelo Software Nsite v. 5. Ademais, para o gene *LALBA* o mRNA das células epiteliais do leite foi extraído para determinar o perfil de expressão em sete haplótipos selecionados na população. Após as edições e alinhamentos de sequências foram encontrados quatorze SNPs ao todo, sendo dez no gene *LALBA* e quatro no gene *OLRI*. Com destaque para um SNP do tipo InDel no gene *LALBA*. Nenhum dos quatorze SNPs detectados apresentou associação significativa com a produção média de leite da população ($P>0.05$). Seis dos dez SNPs observado em *LALBA* apresentaram frequências alélicas dos nucleotídeos selvagens superiores a 0,5 com 90% em equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW), com o SNP -42 (A>G) apresentando forte sítio de ligação para o fator de transcrição *hepatocyte nuclear factor 3* (HNF3). A análise de expressão demonstrou que os haplótipos 4 e 2 apresentaram os maiores níveis de expressão comparado aos demais ($P<0.05$). Dois dos quatro SNPs encontrados no gene *OLRI* foram do tipo transição e os outros dois do tipo transversão, todos com frequências alélicas de nucleotídeos selvagens elevadas acima de 0,90 com 75% sob as condições do EHW. Contudo, para os SNPs nas posições -555 InDel (TAAA) e -720 (C>T) constatados no gene *LALBA*, bem como, o da posição -672 (A>T) no gene *OLRI* revelaram que os heterozigotos exibiram maiores valores de produção média de leite comparado aos homozigotos podendo, portanto, sofrerem seleção na população para incremento na produção do volume de leite em ambos. De forma que, tanto os maiores níveis de expressão de mRNA de *LALBA* visualizados no leite bubalino em dois haplótipos diferentes, quanto a presença de indivíduos heterozigotos com maiores produções de leite, com destaque para o Indel encontrado em *LALBA* -555 (TAAA) e o SNP em *OLRI* -672 (A>T) mostraram-se candidatos devido ao efeito adicional que novos alelos carregam provocando maior

variabilidade genética dentro do rebanho. Sendo assim, podem ser características desejáveis de serem fixadas na população. Entretanto, mais abordagens focadas na relação entre as mutações pontuais e os níveis de expressão nas células somáticas do leite, aliados a outros genes que podem estar influenciando nos níveis de produção de leite devem ser realizados para investigar se essas variantes podem ser comprovadas por meio dos fenótipos dos animais.

Palavras-chave: Búfalas, Gordura, Expressão gênica, Proteína, Mutação pontual, Produção de leite.

ABSTRACT

Buffaloes play a notable economic, social, and environmental role worldwide. Their milk is the second most produced and has excellent nutritional composition. In the meantime, it is necessary to understand the genetic factors by searching for the mechanisms that can influence the productivity of production animals. Therefore, the objective was to investigate single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein and lipid metabolism genes, to associate them with data on milk production in buffaloes from the Amazon region. For this purpose, blood samples were collected from 85 females belonging to a property in the municipality of Bujaru/PA. DNA extractions were performed using the phenolic method, followed by Polymerase Chain Reaction (PCR), Purification, and Sequencing of the coding regions of the LALBA (833 bp) and OLR1 (750 bp) genes. The possible binding sites to transcription factors in both genes were investigated by the Nsite v. 1.0 Software. Furthermore, for the LALBA gene, the mRNA from milk epithelial cells was extracted to determine the expression profile in seven haplotypes selected in the population. After editing and sequence alignments, fourteen SNPs were found in total, ten in the LALBA gene and four in the OLR1 gene. One SNP of the InDel type in the LALBA gene stood out. None of the fourteen SNPs detected showed a significant association with the average milk production of the population ($P > 0.05$). Six of the ten SNPs observed in LALBA showed allele frequencies of wild-type nucleotides greater than 0.5, with 90% in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), with SNP -42 (A>G) presenting a strong binding site for the transcription factor hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3). Expression analysis showed that haplotypes 4 and 2 showed the highest expression levels compared to the others ($P < 0.05$). Two of the four SNPs found in the OLR1 gene were of the transition type, and the other two were of the transversion type, all with high wild-type nucleotide allele frequencies above 0.90, with 75% under EHW conditions. However, for the SNPs at positions -555 InDel (TAAA) and -720 (C>T) found in the LALBA gene, as well as the one at position -672 (A>T) in the OLR1 gene, it was revealed that the heterozygotes exhibited higher average milk production values compared to the homozygotes and may, therefore, be subject to selection in the population for increased milk volume production in both. Thus, both the higher levels of LALBA mRNA expression observed in buffalo milk in two different haplotypes and the presence of heterozygous individuals with higher milk production, especially the Indel found in LALBA -555 (TAAA) and the SNP in OLR1 -672 (A>T), were candidates due to the additional effect that new alleles carry, causing greater genetic variability within the herd. Therefore, they may be desirable characteristics to be fixed in the population. However, more

approaches focused on the relationship between point mutations and expression levels in somatic cells of milk, together with other genes that may be influencing milk production levels, should be carried out to investigate whether these variants can be proven through the phenotypes of the animals.

Keywords: Buffaloes, Fat, Gene expression, Protein, Point mutation, Milk production.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLA: Ácido linoleico conjugado

DNA: ácido desoxirribonucleico

mRNA: RNA mensageiro

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RNA: ácido ribonucleico

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

SNPs: polimorfismos de nucleotídeo único

α -LA: alfa-lactalbumina

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1	CONTEXTUALIZAÇÃO	13
1.1	Bubalinocultura Leiteira no Brasil e na Amazônia	14
1.2	O leite de búfala	17
1.2.1	Proteínas	17
1.2.2	Gordura	18
1.3	Fatores que influenciam na produção de leite	19
1.4	Genética molecular - Genes candidatos na produção de leite em bubalinos	21
1.4.1	Alfa-lactalbumina (<i>LALBA</i>)	22
1.4.2	Receptor 1 de lipoproteína de baixa densidade oxidada (OLR1)	24
2	OBJETIVOS	26
	REFERÊNCIAS	27
3	Article	35
3.1	Novel polymorphisms in the Alpha-Lactalbumin (<i>Lalba</i>) gene and analysis of gene expression in dairy buffaloes (<i>Bubalus bubalis</i>) in the Amazon	35
	Abstract	35
	Introduction	36
	Material and methods	37
	Results	39
	Discussion	43
	Conclusion	45
	References	46
4	Article	49
4.1	Identification of Novel SNPs in the regulatory region of the Oxidized Low-density lipoprotein Receptor 1 (<i>OLRI</i>) gene in dairy buffaloes (<i>Bubalus bubalis</i>)	49
	Abstract	49
	Introduction	50
	Material and methods	51
	Results	52
	Discussion	53
	Conclusion	55
	References	58
5	CONCLUSÕES GERAIS	61
	ANEXO	62

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A criação de búfalos é caracterizada como uma atividade agropecuária de grande importância financeira, capaz de fornecer carne, leite e robustez para atividades no dia a dia do campo. Logo, o búfalo é uma espécie substancial para a produção de alimentos, pois exibe grande potencial produtivo no qual seus produtos são proporcionais e até mesmo superiores a outros presentes no mercado (SILVA; RIBEIRO, 2021).

No Brasil são conhecidas quatro raças bubalinas: Carabao, Jafarabadi, Murrah e Mediterrâneo, sendo as duas últimas especializadas para produção de leite. A primeira atividade desenvolvida com a espécie foi destinada a produção de carne, entretanto com a notoriedade de composição demonstrada pelo leite, a bubalinocultura leiteira foi então ganhando destaque. Atualmente no país, os produtores contam com o auxílio da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB), criada em 1960 com a finalidade de incentivar a criação, promovendo a junção dos associados em atividades que visem o aperfeiçoamento técnico-científico e o fomento dos mercados interno e externo (ABCB, 2024).

Posto isso, a produção leiteira de búfalos passou a ser uma atividade de notável relevância econômica, principalmente devido a gama de nutrientes de alta qualidade presentes no leite. O mesmo, possui maiores teores de proteína, vitaminas, minerais e gordura, que garante nível elevado de rendimento na fabricação de derivados lácteos, quando comparado ao bovino, sendo o produto mais conhecido mundialmente a mozzarella bubalina (RICCI; DOMINGUES, 2012). Mas, produtos como requeijão, iogurte, ricota e outros tipos de queijo, como cotage e frescal, encontram-se disponíveis no mercado consumidor de Minas Gerais, por exemplo (ERNESTO, 2017).

Contudo o conhecimento adequado da composição do leite possui grande importância, pois pode proporcionar um maior desenvolvimento do processamento na indústria, trazendo aos consumidores produtos de qualidade, uma vez que, análises incorretas além de causar perdas econômicas ao sistema de produção, podem também trazer riscos à saúde pública (MIHAIU *et al.*, 2010). Com isso, a determinação de seus constituintes e a contagem de células somáticas (CCS) são critérios que avaliam a qualidade do leite. Os mesmos são realizados de maneira mais progressiva e criteriosa para identificar possíveis erros na execução dos manejos e assim serve de referência para valorizar cada vez mais a matéria prima (RANGEL *et al.*, 2013).

Porém, no estado do Pará ainda não há para o leite bubalino padronizações das características físico-químicas de seus derivados (BITTENCOURT *et al.*, 2013; DADARIO *et al.*, 2018). Junto a falta de legislação, há também muitos fatores que influenciam a baixa produção e

qualidade do leite bubalino, dentre eles podem-se destacar época do ano, carências no manejo sanitário e nutricional, além de genéticos e ambientais (CAVALI; PEREIRA, 2020).

Tendo em vista a relevância das características que o leite de búfala apresenta, entender como sua constituição genética age sobre as mesmas pode fornecer uma direção na definição de táticas de melhoramento genético. Dessa maneira, muitas técnicas são empregadas para a identificação e obtenção de genes importantes em animais de produção. Uma delas é o sequenciamento de Sanger o qual é amplamente utilizado nas pesquisas para detecção de mutações, como os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) e microssatélites (SSR), ambos caracterizados como marcadores moleculares empregados na seleção assistida por marcadores (SAM), bem como na seleção genômica ampla (GWAS).

Com a era genômica o sequenciamento foi capaz de aumentar a quantidade de DNA sequenciado e como consequência gerar um vasto volume de informações genéticas a nível de pares de bases. A partir de então, muitos estudos como o mapeamento de mudanças no DNA, análise da expressão diferencial de genes a nível de RNAm e pequenos RNAs, identificação dos *splicings* alternativos e a interação entre a molécula de DNA, RNAs e proteínas, puderam ser realizados (LYSTER *et al.*, 2009).

Dentre as tecnologias que são empregadas na busca por genes candidatos a utilização de chips com alta densidade de marcadores SNPs e distintas metodologias de GWAS são as que mais revelaram genes promissores na produção de leite em bubalinos (PAUCIULLO *et al.*, 2012b; DENG *et al.*, 2016a; LI *et al.*, 2017; MANZOOR *et al.*, 2018; DU *et al.*, 2019). Baseados nessas referências muitos pesquisadores fazem uso do sequenciamento em diferentes populações, visando comprovar a existência desses genes e se estes encontram-se associados com índices zootécnicos leiteiros podendo assim aumentar a produtividade.

1.1 Bubalinocultura Leiteira no Brasil e na Amazônia

Os búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*) possuem origem asiática, sendo, portanto, animais que se difundiram para quase todos os continentes. São conhecidos por suas características intrínsecas como: docilidade, longevidade, rusticidade, adaptabilidade em diferentes regiões do mundo com distintas propriedades de solo, clima e vegetações, dessa forma são encontrados habitando áreas onde os bovinos seriam incapazes de serem criados (áreas alagadas) (CAVALI; PEREIRA, 2020). Além disso, apresentam também uma elevada capacidade de converter alimentos de baixo atributo nutricional em carne e leite de qualidade (FILHO *et al.*, 2022).

O começo da criação de búfalos no Brasil foi destinado a produção de carne, mas desde os anos 1980 e 1990 esse cenário começou a mudar com o entusiasmo em investigar a produção de leite, fato que foi sendo percebido principalmente pelo crescimento de unidades industriais empenhadas na produção de derivados do leite bubalino, os quais possuem alto valor agregado no mercado, o que permite a remuneração mais elevada da matéria prima a valores cerca de duas vezes maiores que os que pagos no leite bovino (BERNARDES, 2014).

A população total de bubalinos no Brasil de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2023), cresceu ao longo dos anos devido ao empenho no desenvolvimento das atividades pecuárias por eles realizadas. Atualmente, o efetivo no país está acima de 1,6 milhão de cabeças distribuídas por todas as regiões.

Em relação a distribuição do rebanho bubalino por região, o Norte desde o ano de 1995 veio demonstrando maiores quantidades de cabeças bubalinas. Os dados demonstrados pelo censo agropecuário de 2022, o mais atualizado disponível, só reforça o notável crescimento da região na atividade pecuária. Onde no ano de 2022 o Norte exibiu grande contribuição no número total de animais com 1.158.626 de cabeças, representando aproximadamente 69,3% da bubalinocultura nacional. E no âmbito estadual, o Pará possui destaque por concentrar o maior rebanho bubalino da América latina com mais de 650 mil cabeças, seguido do estado do Amapá, com mais de 300 mil cabeças (IBGE, 2023).

Todavia, na bubalinocultura brasileira os produtores são considerados de pequenos e médios com maior parte dessa criação em sistema extensivo, sendo a raça Murrah a mais predominante especialmente pela sua considerável aptidão para a produção de leite e seus componentes. E mesmo que esse sistema apresente números satisfatórios, a produção de búfalas leiteiras no país apresenta desafios quando comparada com sistemas de países como a Itália, que é referência no segmento (ZOPOLLATTO, 2019).

Na Amazônia a bubalinocultura não se distancia muito do resto do país, pois também se caracteriza principalmente pela criação extensiva, em pastagens nativas com destaque para a Arquipélago do Marajó e a região da calha do rio Amazonas (MARES GUIA *et al.*, 1999). Entretanto, em alguns casos os sistemas de criação nessas regiões são firmados em quatro tipos de ecossistemas de pastagens variados como em áreas alagadas da ilha do Marajó, áreas alagadas do Baixo Amazonas, áreas de terra firme e terras secas lavradas. Mas, mesmo assim, ainda é baixo o nível de produção de leite nesses ambientes restrito pela falta de manejo adequado na cadeia produtiva como um todo (FILHO *et al.*, 2022).

A produção leiteira é uma das principais aptidões dos bubalinos, sendo importante em muitos países do mundo por influenciar diretamente na lucratividade da atividade. Entretanto, no Brasil

a produtividade percebida ainda é bastante variável. Autores como Tonhati *et al.* (2000) trabalharam com as raças Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi e mestiços pertencentes a seis rebanhos bubalinos criados em São Paulo verificaram médias de produção de 1042,5 kg/lactação, 1481,4 kg/lactação, 1062,8 kg/lactação e 1068,5 kg/lactação, respectivamente, sendo a maior média para a raça Murrah. Contudo, Malhado *et al.* (2007) com búfalas da raça Murrah criadas na Bahia foi verificada média de produção de leite de 1.863,5 kg/lactação, maior que as encontradas pelos autores citados anteriormente.

De acordo com Rosa *et al.* (2007) a média de produção de bubalinos leiteiros no Brasil é de 1.583 kg/lactação, com média diária de 7,3 litros de leite produzidos, estando essa média próxima das que foram citadas anteriormente. Em pesquisa realizada sobre a cadeia produtiva de búfalos de São Paulo Vilela e Santini (2010), reportaram médias de produção variando entre 5 e 7 litros/dia. Entretanto, para a ABCB a média de variação de produção é de 6 a 10 litros/dia (ABCB, 2023).

No estado do Pará, Rodrigues *et al.* (2010) trabalharam com 1.1882 registros de fêmeas bubalinas da raça Murrah e seus mestiços e encontraram média de produção de leite de 1.663,84 kg. Contudo, muitas propriedades da região amazônica desenvolvem a atividade leiteira em pastagens cultivadas de boa disponibilidade com melhor valor nutricional (QUINZEIRO neto *et al.*, 2014). Como, por exemplo, em pastagens cultivadas de *Brachiaria* e *Panicum* na Amazônia Oriental búfalos das raças Murrah, Mediterrâneo e mestiços produziram em uma ordenha diária 1.806 kg de leite em 262 dias de período de lactação, com 6,96% de gordura (MARQUES *et al.*, 2020).

Outros autores também mostraram que as raças Murrah, Mediterrâneo e mestiços criados em terra seca com pastagens cultivadas ou em áreas alagadas conseguem produzir leite com elevado percentual de gordura e médias de produção total de leite na faixa da média brasileira ou até mesmo maiores, como visto, por Moura-Carvalho e Lourenço Junior (2001) que verificaram que búfalas mediterrâneas produziram 2.055 kg de leite/lactação com 7,7% de gordura em 316 dias de período de lactação e as mestiças meio sangue Murrah e Mediterrâneo produziram 2.062 kg de leite/lactação com 7,3 % de gordura em 338 dias de período de lactação. Portanto, é demonstrado na literatura que quando se impulsiona o sistema de produção a resposta produtiva se torna maior e melhor nesse caso, para bubalinos leiteiros.

Esses achados reforçam ainda mais a informação de que no país as médias de produção leiteira observada em búfalas são variáveis e reduzidas estando atreladas a presença de muitos fatores nutricionais, edafoclimáticos, de ambiência e bem estar, sanitários bem como, os genéticos aplicados de maneira inadequada no desenvolvimento da atividade pecuária desses

animais. Portanto, o emprego de estratégias que visem a execução adequada de manejo no tripé da produção animal nutrição, genética e ambiente são capazes de mudar o cenário.

1.2 O leite de búfala

O leite de búfala se mostra considerável tanto para o consumo natural, quanto sendo uma matéria prima na fabricação de derivados. E dentre as características que se destacam para o desenvolvimento da atividade pecuária, as propriedades do leite são de longe as que mais se sobressaem, visto que, o mesmo possui acentuadas diferenças quando comparado ao leite de vaca.

Essas particularidades permitem sua descomplicada identificação através do ponto de vista físico-químico e sensorial, como, por exemplo, o sabor ligeiramente doce, coloração mais branca, devido a inexistência de pigmentos carotenoides (provitamina A), apresentando assim um leite concentrado, ou seja, menos água e mais matéria seca (TONHATI *et al.*, 2005; MOTOLO *et al.*, 2024). Posto isso, é justamente na composição que o leite de búfala apresenta a sua maior vantagem, sobretudo por conter altos teores de proteína, gordura e sólidos totais, além de minerais como cálcio e fósforo (CAVALI; PEREIRA, 2020).

Outros aspectos interessantes que o leite bubalino possui quando comparado ao bovino diz respeito as menores proporções de colesterol, 25% a mais de aminoácidos essenciais e maiores teores de Ácido linoleico conjugado (CLA), tendo nessas particularidades a capacidade de propiciar benefícios a saúde humana por conta das maiores quantidades de gordura presente no leite (PARK *et al.*, 2017; VERDURICO *et al.*, 2012).

A lactose é o principal carboidrato presente no leite, o qual atua como base também para a fabricação de derivados através de sua fermentação. E em bubalinos, os teores de lactose apresentam valores entre 4% e 5% (ZOTOS; BAMPIDIS, 2014). E por apresentar uma ótima osmolaridade é o componente que menos sofre variações entre todos os outros presentes no leite (FERNANDES *et al.*, 2005).

1.2.1 Proteínas

O conteúdo proteico do leite de búfala é maior do que o encontrado em bovinos (AHMAD *et al.*, 2008; Ricci; DOMINGUES, 2012). De forma que as proteínas do leite fazem parte de duas principais categorias que podem ser desmembradas com base em sua solubilidade.

Em se tratando da composição de proteínas, a caseína apresenta maior quantidade no leite bubalino (88%), em segundo lugar estão as soroproteínas (12%). Dessa maneira, a caseína é

classificada em quatro principais tipos e com distintas propriedades sendo: α_1 , α_2 , β , κ -caseína e γ -caseína (ALICHANIDIS *et al.*, 2016). E a fração de proteína sérica do leite contém também quatro principais proteínas que são a β -lactoglobulina (50%), α -lactoalbumina (20%), soroalbumina (10%) e imunoglobulinas (10%), como igG1 (principalmente), IgG2, IgA e IgM (FOX *et al.*, 2000). Em estudo mais recente, as proporções de β -lactoglobulina, α -lactoalbumina no leite de búfala foram mais elevadas comparadas ao estudo citado anteriormente, o qual, demonstrou valores de 56% e 24%, respectivamente (ALICHANIDIS *et al.*, 2016).

As micelas das caseínas visualizadas no leite de búfala são maiores que as reportadas em leite de vaca, o que favorece seu maior aproveitamento na coalhada devido à baixa retenção de água (PIGNATA *et al.*, 2014). Além do mais, estudos recentes têm buscado alternativas quanto a produtos lácteos que não induzam alergias nos humanos. O leite bubalino é uma dessas alternativas e além dele, outros leites como de cabras e ovelhas são candidatos a serem utilizados na fabricação dos mesmos por possuírem propriedades menos alérgicas que o leite de vaca (FERREIRA *et al.*, 2022).

1.2.2 Gordura

No leite bubalino os índices de gordura presentes são praticamente o dobro do que é visualizado no leite de vacas sendo, portanto, a fração mais relevante pelo seu alto valor energético e nutritivo. Com isso, é o constituinte que apresenta maior valor econômico, pois seus glóbulos são maiores, com maior densidade e temperatura de fusão de 32°C a 45°C possibilitando aumento nos teores de sólidos totais e matéria seca quando comparado aos percebidos no leite de vaca (COSTA FILHO *et al.*, 2015).

Em estudo realizado por Chen *et al.* (2023) com búfalas da raça mediterrâneo foi relatado que o percentual médio de gordura no leite foi de 7,87%. Entretanto, sabe-se que essa característica tem potencial para ser aumentada quando se realiza intensificação nos manejos nutricionais, reprodutivos, de ambiência e bem estar, assim como, na aplicação de seleção genética. De forma que, a gordura presente no leite bubalino é a porção que mais sofre alterações provocadas por condições inadequadas de criação (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Araújo *et al.* (2011) realizaram pesquisas com bubalinos leiteiros criados próximo a linha do equador que apresenta regiões de clima tropical, identificaram que a maior oferta de forragem (período chuvoso) favoreceu maiores volumes de leite produzido, bem como maior percentual de gordura no leite. Além disso, outro estudo relacionando períodos de disponibilidade de forragem com a ordem de parto em búfalas leiteiras, demonstrou que animais de terceira ordem

e no período de maior disponibilidade apresentaram índices de gordura no leite de 8,41%. Sendo também exibido no estudo o contrário, de forma que as mesmas búfalas de terceira ordem de parto exibiram índices de gordura no leite de 5,65% quando estavam no período de baixa disponibilidade de forragem, fato esse que provocou uma queda considerável no teor de gordura do leite (SOARES *et al.*, 2013).

Do ponto de vista nutricional, os lipídios apresentam teores notáveis de ácidos graxos essenciais ao organismo. As proporções de ácidos graxos saturados no leite e búfala variam de 60% a 65% enquanto que, o ácido graxo insaturado pode variar de 35% a 40% (LOCK; GARNSWORTHY, 2003). Dessa maneira, as proporções visualizadas são consideradas nutricionalmente apropriadas para a espécie.

Outra particularidade no leite de búfala é a presença de CLA, o qual possui o dobro da quantidade verificada no leite bovino. Sendo assim, o CLA é um grupo de isômeros do ácido linoleico (C18:2) sendo, portanto, um composto que está naturalmente presente no leite de ruminantes. O CLA é originado a partir da reação de isomerização que ocorre durante o metabolismo do C18:2 no ambiente ruminal por microrganismos ruminais, no processo conhecido como biohidrogenação (ELIAS *et al.*, 2004).

Além disso, nos últimos anos o interesse dos consumidores por alimentos que detenham bons índices nutricionais e com isso, possam conceder substâncias que tragam benefícios a saúde humana aumentaram. E muitos estudos na literatura exibem as propriedades benéficas que o CLA apresenta na prevenção de doenças e no auxílio da manutenção e regulação do metabolismo em humanos (COSENZA *et al.*, 2017).

1.3 Fatores que influenciam na produção de leite

Inúmeros fatores podem colaborar para que haja diminuição na produção, bem como, na qualidade do leite como por exemplo: raça, idade, condição de escore corporal, efeitos genéticos, manejo nutricional, condições ambientais, estágio de lactação, ordem de lactação, frequência de ordenha, tipo de ordenha, hábitos distintos de manejo, dentre outros (GONÇALVES *et al.*, 2019). O impacto desses fatores gera redução no bem estar dos animais e como consequência dispêndios econômicos a atividade leiteira.

Quando se trata dos sistemas de produção de bubalinos leiteiros, os fatores ambientais e nutricionais são os que apresentam maiores impactos na reprodução e produção dos mesmos. De modo que, os búfalos são animais poliétricos estacionais de dia curto o que reflete diretamente na disponibilidade de leite para a indústria, a qual depende da região em que o

rebanho se encontra. Além disso, quando as condições nutricionais adequadas de acordo com as exigências de cada categoria animal não são atendidas, prejudicam o estabelecimento da idade a puberdade, a manutenção da ciclicidade ovariana, a volta da ciclicidade no pós parto e a manutenção da gestação (GARCIA, 2006). Por conta disso, as biotecnologias da reprodução como inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embriões (TE), criopreservação de semem e embriões vêm sendo empregadas visando manter maior regularidade na oferta desse leite durante o ano todo, bem como para manter a multiplicação de material genético de forma mais rápida e assertiva (BERNARDES, 2007; MELLO *et al.*, 2013). Outra estratégia que se tem mostrado proveitosa nos períodos críticos é a realização da suplementação nutricional dos animais com objetivo de elevar os índices reprodutivos e produtivos (GARCIA, 2006).

O estresse térmico provocado por temperaturas elevadas também é responsável por acarretar mudanças nos parâmetros fisiológicos e diminuição na eficiência reprodutiva e produtiva de búfalas leiteiras, visto que, são animais sensíveis ao calor mesmo sendo capazes de se adaptarem em ambientes mais quentes que frios (ZICARELLI *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Além do mais, o estresse térmico também prejudica a imunidade dos animais tornando-os mais susceptíveis a ocorrência de enfermidades. Foi verificado que búfalas leiteiras mantidas sem acesso a sombra e em áreas de índice de temperatura de globo negro elevadas ($>89,1$) apresentaram elevação no número de hemácias, em especial no período mais seco do ano tendo como consequência, processos de desidratação. E junto a esse processo, ocorre elevação no número de leucócitos por conta da maior liberação endógena de corticoides (SILVA *et al.*, 2011a).

O emprego de estratégias que visem melhorar as condições de ambiência em búfalas leiteiras criadas a pasto, inclui a incorporação de árvores as quais favorecem o microclima conferindo melhores condições de bem estar através do conforto térmico, visto que, o sombreamento permitido pela presença nas árvores reduz o índice de temperatura do globo negro e umidade (ITGU) comparadas as áreas diretamente expostas ao sol (SILVA *et al.*, 2011b).

E mesmo que a seleção natural permita a adaptação de búfalos as áreas de calor, os mesmos não conseguem promover sua homeostase em condições extremas de estresse térmico (Oliveira *et al.*, 2013). Com isso a produtividade leiteira é reduzida, impactando de forma negativa na produção de seus derivados, pois provoca prejuízos em níveis de proteína, gordura e lactose (LIU *et al.*, 2020; COSTA *et al.*, 2020).

Outro fator que afeta negativamente a produtividade e qualidade do leite, é a presença de mastite dentro dos rebanhos. A mesma é caracterizada pela inflamação da glândula mamária decorrente de alterações metabólicas, fisiológicas, entrada de patógenos ou trauma (OVIEDO-BOYSSO *et al.*, 2007). Em estudo com 592 búfalas em diferentes fases de lactação foram percebidas alterações físico-químicas no leite devido à presença de mastite. Onde foram notadas diferenças de produção em búfalas acometidas pela infecção de 1,3 litros/dia, evidenciando uma redução de aproximadamente 22% na produção de leite, com redução da porcentagem de gordura de 6,6% em animais sadios para 4,6% em animais com mastite, além de redução nas proporções de proteína de 4,8% para 4,0%, lactose de 5,1% para 3,9% e extrato seco desengordura de 9,9% para 8,0% em búfalas com mastite (ALMEIDA, 2014).

Por conta disso, a contagem de células somáticas (CCS) é uma ferramenta adotada para a avaliação da qualidade higiênico sanitária do leite, além de atuar como medida de padrão de qualidade, pois se relaciona com a composição, rendimento industrial e segurança alimentar (SILVA *et al.*, 2014). Dessa forma, a CCS é diretamente relacionada com o rendimento dos derivados lácteos, pois animais infectados aumentarão a quantidade de células somáticas no leite, o que provocará redução na vida de prateleira dos produtos (LAGES, 2020).

Dessa forma, a CSS indica quantitativamente o grau de inflamação da glândula mamária. Sendo que o limite de CCS de 200.000 células/ml em búfalas pode ser utilizado como critério indireto para diferenciar a qualidade do leite e a saúde do úbere (<200.000 células/ml) e mastite subclínica (>200.000 células/ml) (DHAKAL, 2006). Entretanto, os valores de CCS em búfalas são significativamente mais baixos que os reportados em vacas, indicando que o padrão de CCS em bubalinos diverge do encontrado em bovinos, porém é válido ressaltar que valores baixos de CCS não indicam obrigatoriamente ausência de infecção na glândula mamária (AMARAL, 2005).

1.4 Genética molecular - Genes candidatos na produção de leite em bubalinos

As pesquisas desenvolvidas no campo da genética molecular, auxiliam de maneira interessante nos métodos de seleção clássica de animais mais capazes para a produção e com isso, traz benefícios como redução no intervalo de gerações e consequente elevação no ganho genético que os mesmos possuem. Dessa maneira, para um rebanho leiteiro se faz importante compreender não somente as características relacionadas a produção em si, mas também conhecer e entender de que maneira as características intrínsecas a saúde, bem estar, nutrição,

ambiente e genética desse animal contribuem para uma melhora nos seus índices zootécnicos (OLIVEIRA, 2020).

Na busca dessa compreensão muitos estudos voltados a identificação de mutações em genes atualmente descritos envolvidos na produção e composição do leite em ruminantes, especialmente nos bubalinos vem sendo caracterizados. Estes visam encontrar os polimorfismos capazes de melhorar as condições de produção, verificar as estruturas de mRNAs e proteínas envolvidas nos importantes processos metabólicos, bem como, seus níveis de expressão em diferentes condições que os animais possam se encontrar.

Baseado em fornecer informações relevantes acerca de genes candidatos a produção leiteira em búfalos, muitos estudos vêm sendo realizados através de técnicas de associação ampla em todo o genoma (GWAS) com o intuito de identificar possíveis variações genéticas que afetam de maneira significativa características econômicas importantes. Dessa forma, Liu *et al.* (2018) através da aplicação da GWAS, conseguiram identificar quatro SNPs em duas regiões diferentes do genoma bubalino associações significativas com a produção de leite e porcentagem de gordura e proteína.

Du *et al.* (2019) através de uma revisão descreveram que até o presente momento cerca de 517 genes candidatos foram identificados e classificados associados as características de produção de leite em búfalas, no qual, 19 destes genes contem 47 mutações que confirma tal informação, ou seja, se mostram associados aos índices leiteiros dos animais avaliados.

Essas pesquisas desempenhadas em bubalinos só reforça o que vem sendo desenvolvido atualmente, visto que, os bubalinos são animais com ótimos desempenhos sendo, portanto, potenciais dentro dos sistemas de produção leiteira. De modo que a confirmação desses genes contendo mutações que possam melhorar as características de produção, trazendo maior eficiência produtiva gera maiores lucros para a economia como um todo.

1.4.1 Alfa-lactalbumina (*LALBA*)

Na espécie *Bubalus bubalis* o gene está localizado no cromossomo 4 e contem 3 íntrons e 4 éxons (NCBI, 2024). A alfa-lactalbumina (α -LA) é a principal proteína do soro do leite que está presente no leite de búfala correspondendo a 18% da proteína total do soro, a qual compreende aproximadamente 3,5% da proteína total presente no leite. A α -LA é quimicamente um constituinte primário da enzima lactose sintase, a lactase, que é encarregada de produzir a lactose do leite (KUHN *et al.*, 1980).

A lactose por sua vez é considerada um importante fator osmótico presente no leite, a qual é responsável pela regulação do volume de leite produzido e que de acordo com Kuhn *et al.* (1980) essa hipótese é verdadeira, sendo a quantidade de lactose sintetizada diretamente proporcional ao volume de leite que é produzido.

Em bovinos, caprinos e ovinos os estudos a nível molecular para o gene *LALBA* são mais evidentes, quando se compara com bubalinos. Principalmente em bovinos, polimorfismos no gene foram reportados estando associados a algumas características econômicas de produção de leite. Bleck e Bremel (1993), demonstraram que o SNP na posição -15 para o alelo A localizado na região 5' UTR do gene, foi associado a maiores rendimentos de leite, proteína e gordura, enquanto o alelo B α -lactalbumina (-15) estava relacionado a maiores índices de proteínas e percentual de gordura em vacas leiteiras.

Em estudo anterior Jairam *et al.* (1983) revelaram quanto a características reprodutivas que novilhas com o genótipo BB para o gene *LALBA* possuíam idade ao primeiro parto menor que as novilhas do genótipo AA sendo importante pois, a eficiência reprodutiva é um dos fatores que afeta de maneira negativa a produtividade da atividade leiteira. Esse índice reprodutivo deve ser adotado, pois é um critério de seleção para a melhoria da população, ou seja, quanto mais precoce acontecer mais cedo a fêmea irá se tornar produtiva, propiciando mais gestações ao longo de sua vida útil (BERGAMASCHI *et al.*, 2010).

Em vacas bovinas da raça holandesa polonesa (Polish Holstein-Friesian) Ostrowska *et al.* (2021) detectaram que o SNP g.-1001T > C na região promotora do gene *LALBA* influenciou as características de produção de leite. Sendo o genótipo TT associado significativamente a elevada produção diária de leite, matéria seca, produção e concentração de lactose. Ademais, o SNP afetou a expressão do gene nas células somáticas do leite que pode estar de alguma forma relacionado a mudanças na ligação dos fatores de transcrição RXR- α e VDR no promotor do *LALBA*. As vacas do genótipo TT também apresentaram menor número de células somáticas no leite, considerado um indicador do estado de saúde do úbere. Esses resultados mostram que o SNP avaliado pode ser mantido como um marcador molecular para características de produção leite nesses animais.

Em bubalinos, os estudos de associação a características de produção leiteira para o gene *LALBA* são escassos, entretanto Dayal *et al.* (2005) ao realizarem estudo em búfalas de duas raças distintas Bhadawari e Murrah encontraram os genótipos AB e BC em Bhadawari associados significativamente ($P \leq 0,05$) para produção total de leite e produção diária de leite entretanto, os genótipos AB, BB, BC, CC e CD presentes em bubalinos Murrah não apresentaram efeitos significativos sobre essas características.

Em pesquisa com búfalas da raça Nili Ravi para o gene *LALBA*, os SNPs detectados através do sequenciamento de Sanger na posição cromossômica 34310940 foram associados com a alfa-lactalbumina (α -LA). Sendo verificado também que a expressão gênica durante o período de lactação dessas búfalas foi mais elevada no período de transição (15 dias), com redução gradual a partir do meio (90 dias) e final da lactação (250 dias) (MANZOOR *et al.*, 2020). Na literatura, a redução da quantidade de ordenha realizada em búfalas leiteiras mostrou-se associada com a diminuição da produção de leite e seus constituintes como gordura, proteína e lactose (LITTLEJOHN *et al.*, 2010; PIANTONI *et al.*, 2010). E a realização de apenas uma ordenha por dia implicou na regulação do gene *LALBA*, que a partir de então exibiu regulação negativa, atuando na redução de síntese de lactose, por exemplo.

1.4.2 Receptor 1 de lipoproteína de baixa densidade oxidada (OLR1)

Na espécie *Bubalus bubalis* o gene está localizado no cromossomo 4 e contém 5 íntrons e 6 éxons (NCBI, 2024). O OLR1 é uma proteína de membrana do tipo II que pertence à família das lectinas vegetais do tipo C (CHEN *et al.*, 2011), atuando como substancial receptor de superfície da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox) (KATAOKA *et al.*, 2001). Dessa forma o gene OLR1 executa um papel indispensável da degradação da LDL-ox, bem como, na proliferação de adipócitos. Em humanos, pesquisas sobre esse gene estão voltadas para sua função em doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, lesões renais e obesidade (MANGO *et al.*, 2003; KHAIDAKOV *et al.*, 2011). Na atividade pecuária, o OLR1 surge como um gene candidato tanto a nível de produção de leite, composição nos teores de gordura e proteína, quanto a nível de produção de corte para peso vivo e características morfométricas corporais de pequenos e grandes ruminantes (KHATIB *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2013; AJAFAR *et al.*, 2022).

Khatib *et al.* (2006) através do sequenciamento de DNA encontraram em uma população de touros holandeses projetados por netas 2 SNPs no éxon 4, 5 SNPs no íntron 4 e 1 na região 3' não traduzida (3' UTR), além de quatro haplótipos intragênicos. O SNP localizado na 3' UTR (8.232 A→C) e alguns haplótipos exibiram efeitos significativos no rendimento de gordura e percentual de gordura do leite. O mesmo SNP foi avaliado quanto a expressão dos genótipos e foi constatado que a expressão do mRNA do OLR1 foi reduzida nas vacas AA em comparação com os genótipos AC e CC, sugerindo que o alelo A na sequência pode provocar a diminuição da expressão de OLR1. Associações entre os haplótipos do OLR1 e características de produção de leite ainda foram confirmadas em um experimento realizado com filhas de vacas

holandesas em uma população de gado pardo suíço italiano (KHATIB *et al.*, 2007). Além disso, Schennink *et al.* (2009) relataram uma associação significativa entre OLR1 e percentual de gordura do leite em bovinos holandeses Holstein-Friesian.

Em vacas leiteiras da raça Sahiwal foram encontrados através do sequenciamento oito SNPs presentes no éxon 6 e 3' UTR do gene OLR1, destes somente cinco (T96C, C155T, A165G, G179A e C265T) foram associados à porcentagem média de gordura no dia do teste (ATDFP) com validação do efeito da substituição desses alelos nos locis. Ademais, a análise de desequilíbrio de ligação (LD) também revelou uma associação significativa do haplótipo CCGGCC com ATDFP (MOHSIN *et al.*, 2023).

Em búfalos ainda não foram desenvolvidas quantidades relevantes de pesquisas para o gene OLR1, entretanto o mesmo mostra sua grande importância para as características de produção de leite em bovinos Sahiwal, que possuem como características intrínsecas a raça boa resistência ao clima quente, resistência a doenças tropicais além de, alta conversão alimentar (ILATSIA *et al.*, 2012), as quais são próximas com as da espécie bubalina principalmente, os que se encontram na região amazônica. Essas pesquisas revelam que esses SNPs têm potencial para serem utilizados em programas de seleção como marcadores de produtividade em ruminantes.

Partindo desse princípio, muitas pesquisas têm-se interessado em buscar informações diretamente do genoma bubalino com a finalidade de aperfeiçoar o desempenho desses a nível de produção de leite. E a descoberta de regiões polimórficas que possam interferir na expressão de genes candidatos a características de produção e qualidade de leite são instrumentos extremamente interessantes para garantir o melhoramento genético da espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) em genes envolvidos no metabolismo de proteínas e lipídios afim de associá-los com dados zootécnicos de produção de leite em um rebanho de búfalas da região amazônica.

2.2 Específicos

- ✓ Detectar Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) através do sequenciamento da região promotora e 5' UTR dos genes alfa-lactalbumina (*LALBA*) e Receptor de Lipoproteína de baixa densidade oxidada 1 (*OLR1*);
- ✓ Estimar os parâmetros de diversidade genética do rebanho em estudo;
- ✓ Identificar sítios de ligação de fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão gênica;
- ✓ Determinar a expressão do gene *LALBA* no leite de búfalas com haplótipos selecionados para produção;
- ✓ Prospectar possível associação do perfil de expressão relativa do gene *LALBA* dos haplótipos com dados de produção de leite do rebanho;
- ✓ Prospectar possível associação dos SNPs de *LALBA* e *OLR1* com os dados de produção de leite das búfalas.

REFERÊNCIAS

- ABCB. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Dados de Produção, 2023. Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br>> Acesso em: 12 setembro 2023.
- ABCB. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Carnes, 2022. Disponível em: <https://bufalo.com.br/carnes/> Acesso em: 18 julho 2023.
- AHMAD, S.; GAUCHER, I.; ROUSSEAU, F.; BEAUCHER, E.; PIOT, M. GRONGNET, J. F.; GAUCHERON, F. Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. Food Chemistry, 2008, 106, pp.11-17. Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.021
- AJAFAR, M. H.; AL-THUWAINI, T. M.; DAKHEL, H. H. Association of OLR1 gene polymorphism with live body weight and body morphometric traits in Awassi ewes: short communication. Molecular Biology Reports, May;49(5):4149-4153. 2022.
- ALICHANIDIS, E.; MOATSOU, G.; POLYCHRONIADOU, A. Composition and properties of non-cow milk and products. In Non-bovine milk and milk products. Academic Press. 2016; p. 81-116.
- ALMEIDA, C. C. Isolation and identification of antimicrobial resistant staphylococcus aureus isolated from buffalo milk samples. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, 8, 1-4. 2014.
- AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite de búfala: composição. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v 29, n.2, p 106-110, abril/jun. 2005.
- ARAUJO, T. O. M.; RANGEL, A. H. N.; SOARES, A. D.; LIMA, T. C. C.; LIMA JÚNIOR, D. M.; NOVAES, L. P. Influências das estações do ano sobre a composição do leite de búfalas mantido em tanque de resfriamento. Agropecuária Ciência no Semi Árido, v.7, n.1, jan/mar, p. 1-5, 2011.
- BERGAMASCHI, M. A. C. M.; MACHADO, R.; BARBOSA, R. T. Eficiência reprodutiva das vacas leiteiras. Circular técnica, n. 64, Embrapa São Carlos, SP Novembro, 2010.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: Situação e importância econômica. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.
- BERNARDES, O. Desafios na produção de leite de búfalas. In: Anais I Simpósio Brasileiro de Ruminantes Leiteiros (UDILEITE): Uberlândia, 2014. p. 33-72.
- BITTENCOURT, R. H. F. P. M.; CORTEZ, M. A. S.; MÁRSICO, E. T.; ROSA, R. M. S.; TAXI, C. M. A. D.; FATURI, C.; ERMITA, P. A. N. Caracterização de Requeijão Marajoara e Minas Frescal produzidos com leite de búfalas no Estado do Pará, Brasil. Revista Ciência Rural, Pará, n. 9, v. 43, p. 1687 - 1692, 2013.

BLECK, G. T.; BREMEL, R. D. Correlation of the alphas-lactalbumin (+15) polymorphism to milk production and milk composition of Holsteins. *Journal Dairy Science*, 76: 2292–2298. 1993b.

CAVALI, J.; PEREIRA, R. G. de A. Produção leiteira de búfalos. *In: Pecuária Leiteira na Amazônia*. SALMAN, A. K. D.; PFEIFER, L. F. M. (ed.). – Brasília, DF: Embrapa, 2020.

CHEN C, HU X, AHMAD MJ, NIU K, YE T, LIANG A, YANG L. Novel Insight into the Role of Squalene Epoxidase (SQLE) Gene in Determining Milk Production Traits in Buffalo. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 26;24(3):2436. Doi: 10.3390/ijms24032436. PMID: 36768756

CHEN, K.-C.; HSIEH, I.-C.; HSI, E.; WANG, Y. S.; DAI, C.-Y.; CHOU, W.-W.; JUO, S. H. H. Negative feedback regulation between microRNA let-7g and the oxLDL receptor LOX-1. *Journal of Cell Science*, 124, 4115–24. 2011.

COSENZA, G.; MACCIOTTA, N. P. P.; NUDDA, A.; COLETTA, A.; RAMUNNO, L.; PAUCIULLO, A. A novel polymorphism in the oxytocin receptor encoding gene (OXTR) affects milk fatty acid composition in Italian Mediterranean river buffalo. *J Dairy Res*. 2017 May;84(2):170-180. Doi: 10.1017/S0022029917000127

COSTA FILHO, M. H. B.; LIMA JÚNIOR, D. M. de; RANGEL, A. H. do N.; SILVA, F. J. S. da; NOVAES, L. P.; GALVÃO JÚNIOR, J. G. B.; SILVA, M. J. M. dos S.; MORENO, G. M. B. Sazonalidade e variação na qualidade do leite de búfalas no Rio Grande do Norte. *Acta Veterinária Brasília*, v. 3, n. 8, p. 201-208, 2015. Doi: 10.21708/avb.2014.8.3.4170.

COSTA, A.; MARCHI, M.; BATTISTI, S.; GUARDUCCI, M.; AMATISTE, S.; BITONTI, G.; BORGHESE, A.; BOSELLI, C. On the effect of the Temperature-Humidity Index on buffalo bulk milk composition and coagulation traits. *Frontiers in Veterinary Science*, v.7, p.577-758, 2020.

DADARIO, N.; SANTINI PIGATTO, G. A.; BAPTISTA, R. D. O processo de inovação na produção de leite de bubalinos: um destaque de caso no município de Queiroz/SP. *Revista Brazilian Journal of Biosystems Engineering*, São Paulo, n. 1, v. 12, p. 77 - 90, 2018.,

DAYAL, S.; BHATTACHARYA, T. K.; VOHRA, V.; KUMAR, P.; SHARMA, A. Genetic polymorphism of alpha-lactalbumin gene in riverine buffalo. *DNA Seq*. 16:173–179. 2005

DENG, T.; PANG, C.; MA, X.; LU, X.; DUAN, A.; ZHU, P.; LIANG, X. Four novel polymorphisms of buffalo INSIG2 gene are associated with milk production traits in Chinese buffaloes. *Molecular and Cellular Probes* 30, 294–9. 2016a.

DHAKAL, I. P. Normal somatic cell count and subclinical mastitis in Murrah buffaloes. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 53:81-86. 2006.

DU, C.; DENG, T.; ZHOU, Y.; YE, T.; ZHOU, Z.; ZHANG, S.; SHAO, B.; WEI, P.; SUN, H.; KHAN, F.A.; YANG, L.; HUA, G. Systematic analyses for candidate genes of milk production traits in water buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Anim Genet*, 2019; 50: 207-216. Doi: 10.1111/age.12739

ELIAS, A. H. N, et al.(sic) Ácido linoléico conjugado (CLA) na mussarela de búfalas. *In*: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 19. Recife, 2004.

ERNESTO, M. Criação de búfalos para produção de carne e laticínios cresce em MG. Estado de Minas Agropecuário. Disponível em: https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuario/2017/04/24/interna_agropecuario,864332/criacao-de-bufalos-para-producao-de-carne-e-laticinios-cresce-em-mg.shtml. Acesso em: 03 agosto 2023. 2017.

FERNANDES, S. A. A.; MATTOS, W. R.; MATARAZZO, S. V.; ROSETO, C. V.; MACHADO, P. H. Componentes do leite de bubalinos ao longo da lactação no Estado de São Paulo. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora*, n.346/347, v.60, p. 71-78, 2005.

FERREIRA, R. G.; PAULA, I. L.; COSTA, J. C.; PERRONE, I. T.; CARVALHO, A. F.; STEPHANI, R. Leite hipoalergênico zero lactose de búfala, cabra e ovelha. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 7, e54211729958, 2022. Doi: 10.33448/rsd-v11i7.29958

FILHO, W. R. L. L.; MOTA, A. V.; MENDONÇA, R. C. A.; DOMINGUES, F. N.; RÊGO, A. C.; FATURI, C. Buffalo milk production system in the Arari region of the Marajó archipelago, Pará. *Revista de Ciências Agrárias- Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*. v. 65, 2022.

FOX, P. F. Et al. *Fundamentals of cheese Science*. New York: Aspen, 2000. 587p.

GARCIA, A. R. Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*). *Revista de Ciências Agrárias*, nº 45, jan./jun.2006. Suplemento.

Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 – [2024 02 04]. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Lactalbumin+alpha+%5B+Bubalus+bubalis+\(water+buffalo\)+%5D](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Lactalbumin+alpha+%5B+Bubalus+bubalis+(water+buffalo)+%5D)

Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 – [2024 02 04]. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=OLR1+%5B+Bubalus+bubalis+\(water+buffalo\)+%5D](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=OLR1+%5B+Bubalus+bubalis+(water+buffalo)+%5D)

GONÇALVES, M. C. G.; MALPASS, G. R. P. M.; OKURA, M. H.; GRANATO, A. C. Avaliação do shelf life para produtos lácteos nos Estados Unidos da América, Europa e Brasil. *Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação, Uberaba - MG*, v. 4, n. 3, p. 267–283, 2019.

ILATSIA, E. D.; ROESSLER, R.; KAH, A. K.; PIEPHO, H. P.; ZARATE, V. Production objectives and breeding goals of sahiwal cattle keepers in Kenya and implications for a breeding programme. *Tropical Animal Health Production*, 44(3):519–530. 2012.

JAIRAM, B. T.; NAIR, P. G. Genetic polymorphism of milk protein and economic character in dairy animals. *Indian Journal of Animal Science*, 53:1-8. 1983.

KATAOKA, H.; KUME, N.; MIYAMOTO, S.; MINAMI, M.; MORIMOTO, M.; HAYASHIDA, K.; HASHIMOTO, N.; KITA, T. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21, 955–60. 2001.

KHAIDAKOV, M.; MITRA, S.; KANG, B. Y.; WANG, X.; KADLUBAR, S.; NOVELLI, G.; RAJ, V.; WINTERS, M.; CARTER, W. C.; MEHTA, J. L. Oxidized LDL receptor 1 (OLR1) as a possible link between obesity, dyslipidemia and cancer. *PLoS One* 6, e20277. 2011.

KHATIB, H.; LEONARD, S. D.; SCHUTZKUS, V.; LUO, W.; CHANG, Y. M. Association of the OLR1 gene with milk composition in Holstein dairy cattle. *Journal Dairy Science*, May;89(5):1753-60. 2006.

KHATIB, H.; ROSA, G. J.; WEIGEL, K.; SCHIAVINI, F.; SANTUS, E.; BAGNATO, A. Additional support for an association between OLR1 and milk fat traits in cattle. *Animal Genetics*, 38:308–310. 2007.

KUHN, N. J.; CARRICK, D. T.; WILDE, C. J. Lactose synthesis: Possibilities of regulation. *Journal Dairy Science*, 63:328-336. 1980.

LI, J.; LIANG, A.; LI, Z.; DU, C.; HUA, G.; SALZANO, A.; CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B.; YANG, L. An association analysis between PRL genotype and milk production traits in Italian Mediterranean river buffalo. *Journal of Dairy Research*, 84, 430–3. 2017.

LITTLEJOHN, M. D.; WALKER, C. G.; WARD, H. E.; LEHNERT, K. B.; SNELL, R. G.; VERKERK, G. A.; SPELMAN, R. J.; CLARK, D. A.; DAVIS, S. R. Effects of reduced frequency of milk removal on gene expression in the bovine mammary gland. *Physiol Genomics*, 41(1):21-32. 2010.

LIU, J. J.; LIANG, A. X.; CAMPANILE, G.; PLASTOW, G.; ZHANG, C.; WANG, Z.; SALZANO, A.; GASPARRINI, B.; CASSANDRO, M.; YANG, L. G. Genome-wide association studies to identify quantitative trait loci affecting milk production traits in water buffalo. *J Dairy Sci.* 2018 Jan;101(1):433-444. doi: 10.3168/jds.2017-13246

LIU, P.; GUO, L.; MAO, H.; GU, Z. Serum proteomics analysis reveals the thermal fitness of crossbred dairy buffalo to chronic heat stress. *Journal of Thermal Biology*, v.89, p.102547, 2020.

LOCK, A. L.; GARNSWORTHY, P. C. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and 9-desaturase activity in dairy cows. *Livestock Production Science*, v. 79, p. 47-59, 2003.

LYSTER, R.; GREGORY, B. D.; ECKER, J. R. Next is now: new technologies for sequencing of genomes transcriptomes and beyond. *Plant Biology, Berlin*, v. 12, p. 107- 118, 2009.

MACEDO, M. P.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, A. A.; AMARAL, J. B.; SOUZA, J. C.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, J. V. Composição físico-química e produção de leite de búfalas da raça mediterrâneo no oeste do Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Zootecnia (suplemento)*, v. 30, n. 3, p. 1084-1088, 2001.

- MARQUES, L. C.; MATOS, A. S.; COSTA, J. S.; SILVA, C. S.; CAMARGO, R. N. C.; MCMANUS, C.; PERIPOLLI, V.; ARAÚJO, C. V.; LAUREANO, M. M. M.; SALES, R. L.; MARQUES, J. R. F.; Productive characteristics in dairy buffalo (*Bubalus bubalis*) in the Eastern Amazon. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72, 947-954. 2020.
- MALHADO, C. H. M.; RAMOS, A. A.; CARNEIRO, P. L. S.; SOUZA, J. C.; PICCININ, A. Parâmetros e tendências da produção de leite em bubalinos da raça Murrah no Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, n.2, p.376-379, 2007.
- MANGO R.; CLEMENTI, F.; BORGIANI, P.; FORLEO, G. B.; FEDERICI, M.; GIARDINA, E.; GARZA, L.; FAHDI, I. E.; LAURO, R.; MEHTA, J. L.; NOVELLI, G.; ROMEO, F. Association of single nucleotide polymorphisms in the oxidised LDL receptor 1 (OLR1) gene in patients with acute myocardial infarction. *Journal of Medical Genetics*, 40. 933–6. 2003.
- MANZOOR, S.; NADEEM, A.; JAVED, M. Polymorphism association and expression analysis of alpha-lactalbumin (LALBA) gene during lactation in Nili Ravi buffalo. *Tropical Animal Health Production*, 52, 265–271, 2020.
- MANZOOR, S.; NADEEM, A.; MARYAM, J.; HASHMI, A. S.; IMRAN, M.; BABAR, M. E. Osteopontin gene polymorphism association with milk traits and its expression analysis in milk of riverine buffalo. *Tropical Animal Health Production*, 50(2):275-281, 2018.
- MARES GUIA, A. P. O.; VEIGA, J. B.; LUDOVINO, R. M. R.; SIMÃO NETO, M.; TOURRANO, J. F. Caracterização dos sistemas de produção da agricultura familiar de Paragominas-PA: a pecuária e propostas de desenvolvimento. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. 55p.- (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 5).
- MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SILVA, A. P. T. B.; MELLO, M. R. B. Desenvolvimento folicular inicial em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2013. 37, 328-333
- MESQUITA, A. J.; TANEZINI, C. A.; FONTES, I. M. Qualidade físico-química e microbiológica do leite cru bubalino. Goiânia: UFG/CEGRAF, 77p. 2002.
- MIHAIU, M. A.; et al. Researches regarding leptin's influence on the fat and protein percent in buffalo milk, e.q. Scientific papers in veterinary medicine XLIII, Timișoara. 2010.
- MOHSIN A. M.; TAVSIEF, A.; ISHWAR, D. G.; ANKIT, M.; ARUN, P. S.; MANVENDRA, S.; ARIF, P.; VINEETH, M. R. Association of polymorphisms in exon 6 and 3'-untranslated region of the OLR1 gene with milk production traits in Sahiwal cattle. *Journal of Applied Animal Research*, 51:1, 156-165, 2023.
- MOTOLO, G. S.; FRANCO, J. R.; LOSSOLLI, N. A. B.; JUNIOR, G. DE N.; DANTAS, A. Produção leiteira de bubalinos e suas particularidades em comparação aos de bovinos. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, 2024. 6(3), 1147–1157. Doi: 10.36557/2674-8169.2024v6n3p1147-1157
- MOURA-CARVALHO, L. O. D.; LOURENÇO JUNIOR, J. B. Produção leiteira de bubalinos como opção para a Amazônia. In: Seminário de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 1., Belém. In: Anais: Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 61-69. 2001.

OLIVEIRA, J. P. F.; RANGEL, A. H. N.; BARRETO, M. L. J.; ARAÚJO, V. M.; JÚNIOR, D. M. L.; NOVAES, L. P.; AURELIANO, I. P. L. Temperamento de búfalas em sala de ordenha sobre índices produtivos e adaptabilidade ao ambiente: uma revisão. *Journal Animal Behaviour Biometeorology*, v.1, n.1, p.21-30. 2013.

OLIVEIRA, L. S. M. Búfalas produzem naturalmente leite A2. 39p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2020.

OSTROWSKA, M.; ZWIERZCHOWSKI, L.; BRZOZOWSKA, P.; KAWECKA-GROCHOCKA, E.; ŻELAZOWSKA, B.; BAGNICK, E. The effect of single-nucleotide polymorphism in the promoter region of bovine alpha-lactalbumin (LALBA) gene on LALBA expression in milk cells and milk traits of cows. *Journal of Animal Science*, V. 99, N. 7, 2021.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; BRAVO-PATÍÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, 54(4), 399–409. 2007.

PARK, Y. W.; HAENLEIN, G. F. W.; WENDORFF, W. L. Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals. [S.l.]: Blackwell Publishing, 2017.

PAUCIULLO, A.; COSENZA, G.; STERI, R.; COLETTA, A.; LA, B. A.; DI, B. D.; MACCIOTTA, N. P.; RAMUNNO, L. A single nucleotide polymorphism in the promoter region of river buffalo stearoyl CoA desaturase gene (SCD) is associated with milk yield. *Journal of Dairy Research*, 79, 429–35. 2012b.

PIANTONI, P.; WANG, P.; DRACKLEY, J. K.; HURLEY, W. L.; LOOR, J. J. Expression of metabolic, tissue remodeling, oxidative stress, and inflammatory pathways in mammary tissue during involution in lactating dairy cows. *Bioinformatics Biol Insights*, Sep 20;4:85-97. 2010.

PIGNATA, M. C. A.; FERNANDES, S. A. de A.; FERRÃO, S. P. B.; FALEIRO, A. S.; CONCEIÇÃO, D. G. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. *Revista caatinga*, v. 4, n. 27, p. 226-233, 2014.

QUINZEIRO NETO, T.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; GARCIA, A. R.; SANTOS, J.C.; SANTOS, M. A. S.; NERES, L. S. A bubalinocultura em áreas de reserva extrativista na Amazônia: O caso da Resex Verde Para Sempre, Porto de Moz, estado do Pará. *Amazônia: Ciência e Desenvolvimento*, 9, 115-136. 2014.

RANGEL, A. H. N.; ARAÚJO, V. M.; BEZERRA, K. V.; BARRETO, M. L. J.; MEDEIROS, H. R.; LIMA JÚNIOR, D. M. Avaliação da qualidade do leite cru com base na contagem de células somáticas em rebanhos bovinos comerciais do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Archives of Veterinary Science*, v.8, n. 1, p. 40-45. 2013.

RICCI, G. D; DOMINGUES, P. F. O leite de búfala. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do Conselho Regional de Medicina Veterinária, São Paulo*, SP, v. 10, n. 1, p. 14-19, 2012.

RODRIGUES, A.E. et al. 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.

ROSA, B. R. T.; FERREIRA, M. M. G.; AVANTE, M. L. FILHO, D. Z.; MARTINS, I. S. Introdução de búfalos no Brasil e sua aptidão leiteira. Publicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça/FAMED, n. 8, 2007.

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

SCHEID, A. L. Características Funcionais, Produtivas e de Tipo em Bovinos da Raça Holandesa no Brasil - uma Abordagem Multivariada. Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agro veterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, SC. 2020.75 p.

SCHENNINK, A.; BOVENHUIS, H.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K. M.; VAN ARENDONK, J. A.; VISKER, M. H. P. W. Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. Animal Genetics, 40:909–916. 2009.

SILVA, J. A. R.; ALENCAR, A. A.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; VIANA, R. B.; SANTOS, N. F. A.; GARCIA, A. R. Perfil hematológico de búfalas da raça Murrah, criadas ao sol e à sombra, em clima tropical da Amazônia Oriental. Acta Amazônica, v.41, p.425-430, 2011a.

SILVA, J. A. R.; ARAÚJO, A. A.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; SANTOS, N. F. A.; GARCIA, A. R.; NAHÚM, B. S. Conforto térmico de búfalas em sistema silvipastoril na Amazônia Oriental. Pesq Agropec Bras, v.46, p.1364-1371, 2011b.

SILVA, G.; RIBEIRO, L. F. Os Bubalinos no Brasil e a Produção De Leite. Revista GeTeC, v. 10, n. 27, 2021.

SILVA, V. N. et al. Correlação Entre a Contagem De Células Somáticas E Composição Química No Leite Cru Resfriado Em Propriedades Do Rio Grande Do Norte. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 69, n. 3, p. 165, 2014.

SOARES, A. D.; RANGEL, A. H. N.; NOVAES, L. P.; JUNIOR, D. M. L.; BEZERRA, K. C. Composição do leite de búfala em diferentes ordens de parto. ACSA –Agropecuária Científica no Semiárido, v. 9, n. 4, p. 53-60, out-dez, 2013.

TONHATI, H.; MUÑOZ, M. F. C.; 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, 29(6):2051-2056, 2000. (Suplemento 1).

TONHATI, H.; SANCHEZ, G. M.; SENO, L. O.; BORQUIS, R. R. A. Qualidade do leite de búfalas e correlações entre a produção e seus principais constituintes. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v.346-7, n.60, p.61-64, 2005.

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

VERDURICO, L. C.; GANDRA, J. R.; FREITAS JUNIOR, J. E.; BARLETTA, R. V.; VENTURELLI, B. C.; MINGOTI, R. D.; VENDRAMINI, T. H.; RENNO, F. P. Evaluation of the Milk Fatty Acid Profile from Mediterranean Buffalo Cows in the First Eight Weeks of Lactation. *Journal of Buffalo Science*, 2012 .1 177-182

VILELA, J. A., SANTINI, G. A. A Cadeia Produtiva de Leite de Búfalas no EDR de Marília (SP): Uma análise do segmento de Produção Leiteira. p. 1-19, 2010. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/15/760.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2017.

WANG, X.; LI, T.; ZHAO, H. B.; KHATIB, H. Short communication: a mutation in the 3' untranslated region diminishes microRNA binding and alters expression of the OLR1 gene. *Journal Dairy Science*, Oct;96(10):6525-8. 2013.

YE, T.; DENG, T.; HOSSEINI, S. M.; RAZA, S. H. A.; DU, C.; CHEN, C.; ZHANG, X.; HU, X.; YANG, L. Association analysis between FASN genotype and milk traits in Mediterranean buffalo and its expression among different buffalo tissues. *Tropical Animal Health Production*, 53, 366, 2021.

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

ZOPPOLLATTO, M. Produção de Leite de Búfala: atualidades e desafios. São Paulo *In: PESSOA, R.; BERNARDES, O.; ASSUMPCÃO, J. C.; ROSSATO, C.; GHASPAR, J. Boletim do Búfalo. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB)*. São Paulo, n. 03, p. 9-10, 2019.

ZOTOS, A.; BAMPIDIS, V. A. Milk fat quality of greek buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 33, p. 181-186, 2014. DOI: 0.1016/j.jfca.2013.12.004.

3 Article

3.1 Novel polymorphisms in the Alpha-Lactalbumin (*Lalba*) gene and analysis of gene expression in dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Amazon

Cintia Luana Pinheiro Santos¹, Elem Cristina Macedo Barra de Sousa¹, Rafaelle Casseb Guimarães¹, Juliana Vasconcelos Figueiredo¹, Roberta de Araújo Silva¹, Elizabeth Machado Barbosa², Priscila Di Paula Bessa Santana³, Ednaldo da Silva Filho¹

¹ Animal Health and Production Institute, Federal Rural University of the Amazon, Belém-PA, Brazil

² Department of the Collegiate Degree in Education, Federal University of Amapá, Mazagão-AP, Brazil

³ Social-Environmental and Water Resources Institute, Federal Rural University of the Amazon, Belém, Brazil

luanasantos6972@gmail.com, www.orcid.org/0000-0003-3339-8185. Corresponding author
elem.c.m.b@gmail.com, www.orcid.org/0000-0002-5799-8954
rafaellecassebg@gmail.com <https://orcid.org/0000-0002-9341-5103>
julianavasconcelosmedvet@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8480-4441>
robertaraujovet@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6681-5806>
liza_barbosa@hotmail.com, www.orcid.org/0000-0001-5413-2138
ppbsantana@gmail.com <https://orcid.org/0000-0002-9227-488x>
silva.filho@ufra.edu.br, www.orcid.org/0000-0002-8009-3504

Abstract

The *Bubalus bubalis* species plays a notable economic, social, and environmental role on the planet. Buffalo milk is the second most produced and has high nutritional values in its composition. However, to maximize production, it is necessary to know the genetic factors inherent to the species and how, combined with good management practices, they can influence productivity. Thus, the research aimed to find new single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *Lalba* gene to associate them with milk production data, as well as to analyze gene expression in the somatic cells of buffalo milk. For this purpose, blood samples were collected from 104 females of the species belonging to a property in Bujaru/PA. DNA extractions were performed using the phenolic method, followed by Polymerase Chain Reaction (PCR), purification of PCR products and Sanger sequencing for genotyping and investigation of new SNPs in the promoter region and 5' UTR of the *Lalba* gene. Subsequently, RNA from milk epithelial cells was extracted to determine the expression profile of *Lalba* in 7 haplotypes selected in the population for average milk production. Ten new punctual SNPs were found in the regulatory region of the *Lalba* gene of only 83 buffaloes, of which 7 are of the transition type, 2 of the transversion type and a indel (TAAA) observed in 7% of the population, however none of the SNPs found had a significant association with the average milk production (PL) of the property. Seven of the ten SNPs presented wild-type nucleotide allele frequencies greater than 0.5, with 90% of those detected presenting Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). SNP -42 presented a strong binding site for the transcription factor hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3), which may act in the modulation of gene expression in these buffaloes. Real-time PCR analysis showed that the selected haplotypes presented distinct levels of *Lalba* mRNA expression in milk somatic cells, with haplotypes 4 and 2 exhibiting the highest expression levels and being statistically significant when compared to the others. The lowest expression levels were observed in haplotypes 3 and 7, both statistically similar to each other. Although the study showed that none of the SNPs influenced milk production, it was possible to demonstrate that patterns of greater expression were exhibited in two distinct haplotypes, evaluated in somatic milk cells, and are therefore desirable haplotypes to be fixed in the population. Based on what was found, further studies focused on the

relationship between point mutations and expression levels should be carried out to verify whether these variants can be proven by the milk production phenotypes of the animals.

Keywords: Milk production, Molecular markers, Ruminants, Selection, Set of SNPs

Article Highlights

- 1- The study was able to demonstrate that the coding region of the *Lalba* gene in dairy buffaloes raised in the Amazon region is polymorphic, and it was possible to detect the presence of ten SNPs;
- 2- The combination of SNPs was able to generate seven different haplotypes and all were expressed in the somatic cells of the milk, demonstrating that they present satisfactory levels of mRNA of the *Lalba* gene in buffaloes. Of these, two were highly expressed and significant, and could be selected and fixed in this population, as well as in other dairy buffaloes;
- 3- The haplotypes with high levels of *Lalba* expression demonstrate that greater quantities of α -lactalbumin (milk serum protein) are being deposited, ensuring greater increases in protein and, consequently, greater yield. And the condition of milk with higher yield levels is important for the dairy industry as a whole, but strictly determining for derivatives from the Amazon region.

Introduction

The *Bubalus bubalis* species is of Asian origin and is known for its longevity, hardiness, and adaptability in various regions of the world with distinct soil and climate characteristics, thus inhabiting areas where cattle would be unable to be raised (flooded areas). These animals have high feed conversion rates capable of generating products of high nutritional quality, such as milk, through a diet with low nutritional attributes (1,2).

Due to the species' ability to produce milk, its breeding in Brazil began to be developed in the 1980s and 1990s, along with this, there was a growth in industrial units dedicated to the production of buffalo milk derivatives (3). As the activity progressed, the composition of milk could be described. And when compared to that of other ruminants, the composition of milk stands out about the levels of protein, fat, lactose, mineral residue (calcium and phosphorus) and total solids. As a consequence, the existence of these characteristics allows for high industrial yield in the manufacture of derivatives, which can exceed approximately 40-50% compared to bovine milk (4). In addition, buffalo milk is more digestible for people with lactose intolerance (5).

However, even though the species displays its full potential for the activity, its production remains behind that of bovine milk. Therefore, the search for improvements in buffalo milk production is demonstrated by the increase in research aimed at detecting variations at the deoxyribonucleic acid (DNA) level, which are capable of explaining the differences perceived in milk production. Among the technologies used in the search for candidate genes, the use of chips with a high density of SNP markers and genome-wide association studies (GWAS) were those that revealed the most genes of interest for milk production in buffaloes (6-8).

Among the genes revealed, the *Lalba* gene deserves special mention. It encodes whey protein (α -LA), which is essential for the synthesis of lactose in the mammary gland, which in turn is an important osmotic factor that plays a critical role in regulating the volume produced. In buffalo milk, α -LA is present in all phases of lactation, especially in the initial phase (9). α -LA was also shown to be associated with milk caseins, so that its expression requires the others, with caseins and serum proteins representing the largest amounts of the protein fraction in milk in buffaloes, with 88% and 12% of the composition, respectively (10). And because it contains approximately 1% more protein than cow's milk, buffalo milk provides a relatively higher production of dairy products, increasing the final yield in the industry by around 5% (11).

Based on the functions that the gene performs, studies focused on the search for SNPs in the *Lalba* gene are more visible in dairy cattle. Thus, a SNP was found in the Dutch breed at position g.-1001 (T>C), in which animals with the TT genotype were able to increase daily milk production, dry matter, production and concentration of lactose in the milk, in addition to presenting low somatic cell count (SCC) and appearing healthy ($P \leq 0.05$) (12). However, even though buffaloes present

better levels of constituents in milk, studies on variations of the *Lalba* gene in the species are still few. However, in buffaloes of the Bhadawari breed, the AB and BC genotypes were found to be significantly associated ($P \leq 0.05$) with daily and total milk production (13). And in another breed, Nilli Ravi, five SNPs were found, but only the SNP at chromosomal position 34310940 (*Lalba2*) was associated with milk protein ($P \leq 0.05$) (14).

The studies highlighted above demonstrate that the *Lalba* gene in buffaloes is polymorphic. Because of this, researchers in the Amazon region are increasingly using sequencing tools in different populations of the species (15-17), aiming to prove the existence of candidate genes associated with data that represent the reproductive and productive performance of dairy animals (zootechnical indexes), responsible for ensuring an improvement in the efficiency and productivity of the herd, consequently generating higher quality derived products for the market. Therefore, the present research aimed to detect new possible SNPs, as well as determine the mRNA expression patterns of the *Lalba* gene in order to associate them with milk production in a herd of crossbred buffaloes from the Amazon region.

Material and methods

Ethical aspects

All procedures performed in this research were conducted following the animal welfare standards described by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) of Brazil and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal Rural University of the Amazon (2820150222/2022/CEUA/UFRA).

Animals and sample collections

A total of 104 crossbred buffaloes of the Murrah and Mediterranean breeds were used, with an average age of 36 months, weighing between 350 and 500 kg and presenting a complete lactation curve of 300 days. All buffaloes during the experiment were healthy, without incidence of mastitis and belonged to a property located in the municipality of Bujaru, Belém, Pará, Brazil ($1^{\circ}37'40''S$, $48^{\circ}13'21''W$). They were in a semi-intensive system with Kikuyu grass (*Brachiaria humidicola*) and Tifton 85 (*Cynodon* spp) pasture and received 1 kg of balanced lactation ration in the trough at the time of milking.

For subsequent genetic evaluations, blood samples (5 mL) were collected from the animals by vacuum puncture of the jugular vein in sterile tubes containing anticoagulant (EDTA) and were stored in isothermal boxes containing commercial ice (Gelotech, Bauru, SP, BR).

For the evaluation of gene expression, 42 buffaloes with an average milk production of 6 L/day verified in 300 days of lactation, were selected. Milk samples (10 mL) were collected manually from the selected buffaloes from a single milking session performed on the property. Before collection, the teats were cleaned and disinfected by pre-dipping, which consists of immersing the buffaloes' teats in an antiseptic solution to eliminate possible environmental bacteria. Afterwards, the milk was placed in sterile 15 mL Falcon tubes free of DNase, RNase and non-pyrogenic, and 2 mL of RNAlater (Invitrogen, USA) were added to stabilize and protect the mRNA in the samples. The samples were kept in isothermal boxes containing commercial ice (Gelotech, Bauru, SP, BR). The blood and milk samples were then transported to the Laboratory of Serology and Molecular Biology of the Federal Rural University of the Amazon – UFRA and stored in freezers with a controlled temperature of $-80^{\circ}C$.

DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA from the 104 blood samples was extracted from 300 μL using the phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) method according to the protocol of Sambrook et al. (18). For this purpose, the samples were homogenized in 300 μL of homogenization buffer and 300 μL of lysis buffer, then 15 μL of proteinase K (10 mg/mL) were added and incubated at $56^{\circ}C$ overnight. Subsequently, DNA was purified by extraction with 600 μL of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) and precipitated with 100 μL of sodium acetate (3 M, pH 4.8), isopropyl alcohol (500 μL), and 70%

ethanol (500 μ L). The pellet was resuspended in 40 μ L of TE buffer. Subsequently, DNA integrity was verified by electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, Fremont, CA, USA).

The investigation of genetic variation was performed through PCR of the *Lalba* gene (ID: 102410146) in its promoter and 5' untranslated region (5' UTR). The following primer pair F 5' ACC TTT CCC AAA AAG GTT GG 3' and R 5' ACC ACA CTG CTC ACC TCC TT 3' used in the research was designed through Primer3plus based on the reference sequence deposited in GenBank, it amplifies a fragment of 833 base pairs (bp). The reactions were performed for a final volume of 25 μ L, being 2 μ L of DNA (50 ng), 12.5 μ L Taq DNA Polymerase 2x Master Mix (Ampliqon, Odense, Denmark), 1.0 μ L of each primer - forward and reverse - (10 pmol/ μ L) and 8.5 μ L of ultra-pure water. All reactions were performed in a Thermal Cycler 2720 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), with the following amplification protocol: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles with denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, extension at 72 °C for 50 s and final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were analyzed on 0.8% agarose gels stained with GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, Fremont, CA, USA).

DNA Purification and Sequencing

The PCR products from 83 blood samples were purified using the PCR Product Purification Column Kit (Ludwig Biotec LTDA, Alvorada, RS, BR) and visualized on 0.8% agarose gels stained with GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, Fremont, CA, USA). The purified products were sequenced using the Sanger method, selected because it is the gold standard capable of generating high-quality sequences. The reaction was performed using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Invitrogen, California, USA) in a final volume of 10 μ L in an ABI 3500 Genetic Analyzer automated sequencer (Applied Biosystems). The sequences obtained were edited in the Finch TV software version 1.4.0 (Geospiza Research Team, USA), compared with the reference sequence for buffaloes inserted in GenBank in the BLAST system, and finally aligned in BioEdit 7.2 using the ClustalW tool, which improves the sensitivity of the alignment through the adjustment of multiple nucleotide sequences.

RNA Extraction

First, the milk fat was separated and the mRNA from the milk samples was isolated. For this, 1000 μ L of milk deposited in 15 mL tubes with RNAlater stored in -80 freezers were removed and centrifuged at 12000 rpm at 4°C for 8 minutes. The supernatant fat was carefully removed with a spatula. Then, the remaining material was transferred to new sterile 2.0 mL Eppendorf tubes where 700 μ L of Trizol® (Invitrogen, USA), was added. Subsequently, the samples were stored at -80 °C for 1 hour to enhance the extraction process. They were then thawed at room temperature and the extraction protocol followed according to the manufacturer's recommendations. The samples were quantified in a BioDrop μ LITE spectrophotometer (BioDrop, Cambridge, England) using the absorbance ratio A260nm/A280nm. Samples with a ratio between 1.7 and 1.9 were considered suitable for RT-qPCR.

Gene expression (RT-qPCR)

The gene expression profile investigation was performed from the 42 buffaloes in exon 2 of the *Lalba* gene. For this, the primer pairs described in Table 1 were designed through Primer3Plus based on the reference sequences deposited in GenBank. To properly evaluate the efficiency of the Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) reactions, they were performed in triplicate for the target gene *Lalba*, as well as for the endogenous gene Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), which has stable expression levels and is therefore considered a maintenance gene capable of normalizing the target genes.

Table 1- Primer pairs designed in Primer3plus according to the reference genes deposited in GenBank (ID) for gene expression analysis in dairy buffaloes.

Genes	Primers (5' - 3')	Éxon	ID Genbank
LALBA	F: CCA GTG GTT ATG ACA CAC AAGC R: GAG GGT TCT GGT CGT CTT TG	2	102410146
GAPDH	F: ACC CAG AAG ACG GTG GATG R: CCG TTG AGC TCA GGG ATGA	7	102404028

The amplification reaction protocol was performed for a final volume of 10 µL according to the recommendations of the manufacturer of the RealQ Plus and RealQ Fast kit (Ampliqon, Odense, Denmark). Relative expression values were determined by the equation $2^{-\Delta Ct}$, where ΔCt is the ratio between the Ct of the target gene and the Ct of the endogenous gene (19).

Statistical analyses

Genetic diversity data such as allele and genotypic frequencies, Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) and FIS were obtained using PopGene v. 1.32 (20). Expression patterns were analyzed using SAS OnDemand, assuming a normal distribution. Mean milk production data were analyzed using simple descriptive statistics in which Tukey test was used for association with polymorphism data as well as the gene expression profile of haplotypes, with a significance level of 0.05. Transcription factor domains in the promoter region were identified using Nsite v. 5 software (21).

Results

The alignment performed on all the sequences obtained revealed the presence of 10 SNPs, seven of which were transition-type and two of which were transversion-type. In addition, the presence of an insertion with the nucleotide sequence TAAA between positions -552 and -555 was also detected in 92.8% of the samples (Table 2).

Table 2- Summary of single nucleotide alterations (SNPs) in the Lalba gene in buffaloes from the Bujaru-Pa region compared to *Bubalus bubalis* (GenBank ID: 102410146).

UTR = untranslated region; bp: base pairs

The analysis of population genetic diversity detected that only six SNPs presented the frequency of the wild-type allele greater than 0.5, equivalent to 60% of the total. These alleles of the SNPs in

Mutation in the PCR fragment	Genomic position (bp) based on the reference	<i>Bubalus bubalis</i>	Bujaru-Pa buffaloes	Type of variation
-42 (A>G)	89119342	A	G	Transition
-60 (T>C)	89119324	T	C	Transition
-292 (G>A)	89119092	G	A	Transition
-339 (C>T)	89119045	C	T	Transition
-444 (T>G)	89118940	T	G	Transversion
-445 (C>T)	89118941	C	T	Transition
-501 (T>G)	89118883	T	G	Transversion
-555 (TAAA)	89118828- 89118847	-	TAAA	InDel
-591 (C>T)	89118797	C	T	Transition
-720 (C>T)	89118668	C	T	Transition

positions -339 (97.6%), -60 (92.5%), and -720 (91.5%) were those that exhibited high frequencies

in the population that exceeded 90%. Regarding the frequency of the mutant allele, SNPs -42, -444, -501, and -591 were the exceptions, as they were the only ones that exhibited the frequency of the mutant allele (G) greater than 0.5, being 68.1%, 95.1%, 95.1%, and 97.5%, respectively. Furthermore, the insertion mutation was detected in 77 buffaloes evaluated between positions -555 to -552, which contributed 4 new nucleotides (TAAA) to the population, also at a high frequency of 96.3%. Six of the 83 buffaloes are heterozygous for this SNP, that is, characterized as InDel and no buffalo in the present study presented the deletion, as verified in the reference sequence for the species deposited in the GenBank database. All values for the effective number of alleles in the population for all SNPs evaluated were above 1.

The SNPs -42, -292, -445, and -720 presented lower observed heterozygosity rates (H_o) than expected (H_e), according to the HWE proportions, which is evidenced by the positive F_{IS} values, suggesting an excess of homozygotes, with the inbreeding process occurring for these. The only SNPs that exhibited the presence of homozygotes for the mutant allele were -42, -292, -445, -501, -591 and -720.

On the other hand, for loci -60, -339, -444, -501, -591 and the insertion block together, the H_o rates were higher than those of H_e , data confirmed by negative F_{IS} values, thus suggesting an excess of heterozygotes and possible selection of them in the population. The values for the Shannon diversity index detected in the study for the 10 SNPs found are considered low, that is, close to zero. Locus -591 presented the lowest value of 0.037. This analysis of the SNPs found suggests the presence of low diversity. However, loci -42, -292, and -445 were those that presented the highest values of 0.626, 0.601, and 0.601 respectively.

Regarding the proportions of HWE, of all the SNPs found in the present study, nine are under equilibrium conditions ($P > 0.05$), which are in the following positions -42 (A>G), -60 (T>C), -292 (G>A), -339 (C>T), -444 (T>G), -445 (C>T), -501 (T>G), -555 (TAAA) and -591 (C>T). The SNP in position -720 (C>T) is deviating from the HWE ($P < 0.05$), Table 3.

From the analysis of the binding to transcription factors performed by the aforementioned software, it was possible to see that of the ten SNPs found, only one, at position -42 (TCATAAATA), has a strong binding site for the transcription factor hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3) in its promoter region. However, the same analysis also found five other transcription factors, namely, Myocyte enhancer factor 2 (MEF2), Specificity protein 1 and specificity protein 3 (SP1; SP3), Sterol regulatory element-binding protein (SREBP), and Zinc finger proteins and Myc-associated zinc finger protein (MAZ/Sp1). However, these are not associated with any of the nine SNPs, but are binding sites for the regulatory region of the *Lalba* gene and are therefore important to mention.

Table 3- Description of the positions of all SNPs found in the promoter region and 5' UTR of the *Lalba* gene and their respective information on the genetic diversity of the dairy buffalo population.

Gene	Promoter region and 5' UTR of <i>Lalba</i>					Ho	He	Ne*	I*	F_{IS}	HWE (P-value)
	Frequencies										
	Genotypes			Alleles							
-42 A > G	AA 0.13 (11)	AG 0.37 (31)	GG 0.49 (41)	A (0.319)	G (0.681)	0.373	0.437	1.768	0.626	0.140	0.180
-60 T > C	TT 0.90 (75)	TC 0.09 (8)	CC 0 (0)	T (0.952)	C (0.048)	0.096	0.092	1.101	0.193	-0.050	0.667
-292 G > A	GG 0.53 (44)	GA 0.36 (30)	AA 0.11 (9)	G (0.711)	A (0.289)	0.361	0.413	1.698	0.601	0.120	0.246
-339 C > T	CC 0.95 (79)	CT 0.04 (4)	TT 0 (0)	C (0.976)	T (0,024)	0.048	0.047	1.049	0.113	-0.024	0.845
-444 T > G	GG 0.90 (75)	TG 0.09 (8)	TT 0 (0)	T (0.048)	G (0.951)	0.096	0.092	1.101	0.193	-0.050	0.667
-445 C > T	CC 0.53 (44)	CT 0.36 (30)	TT 0.11 (9)	C (0.711)	T (0.289)	0.361	0.413	1.698	0.601	0.120	0.246
-501 T > G	TT 0 (0)	TG 0.09 (8)	GG 0.90 (75)	T (0.048)	G (0.951)	0.096	0.092	1.101	0.193	-0.050	0.667
-555 > TAAA	IN 0,92 (77)	INDEL 0,07 (6)	DEL 0 (0)	IN (0.963)	DEL (0.036)	0.072	0.070	1.074	0.155	-0.037	0.755
-591 C > T	CC 0 (0)	CT 0.04 (4)	TT 0.95 (79)	C (0.024)	T (0.975)	0.048	0.047	1.049	0.113	-0.024	0.845
-720 C > T	CC 0.89 (74)	CT 0.04 (2)	TT 0.08 (7)	C (0.936)	T (0.096)	0.024	0.155	1.182	0.289	0.844	0.000

Ho: Observed heterozygosity, He: Expected heterozygosity, Ne*: Effective number of alleles, I*: Shannon diversity index, F_{IS} : Inbreeding coefficient, HWE: Hardy Weinberg equilibrium (P>0.05)

The association of the SNPs found with the average milk production (L/day) of the buffaloes evaluated is described in Table 4. The genotypic comparisons of all the SNPs found in the study with the average milk production did not show any statistical difference ($P>0.05$).

Therefore, for SNPs at positions -60, -339, -720 and for Indel (-555), it was possible to observe that all heterozygotes of the same exhibited greater milk production compared to their wild homozygotes. Highlighting the heterozygote (CT) of SNP -720, which presented the highest milk production observed among all other SNPs. In addition, when compared to the production exhibited by its wild homozygote (CC), there was an increase in production of more than 2 liters of milk for the heterozygote, being 7.44 L/day; the homozygote (TT) also followed this increase, as it exhibited 7.01 L/day. Based on these findings, we can infer that the presence of mutant alleles in these SNPs may be contributing positively to the increase in milk production, having the so-called additive effect.

This deduction can be better observed and explained in SNPs -444, -501, and -591 for which it was not possible to find any buffalo belonging to the respective wild homozygous genotypes. However, concerning the mutant homozygotes, all demonstrated an increase of more than 0.5 liters in milk production, when compared to their heterozygotes. SNPs -42, -292 and -445 were the only ones that presented the three genotypes in the population and of these, all the wild homozygous genotypes exhibited higher average milk production per day.

Table 4 - Effect of SNPs in the *Lalba* gene on average milk production (L/day) observed in 300 days of lactation in different genotypes.

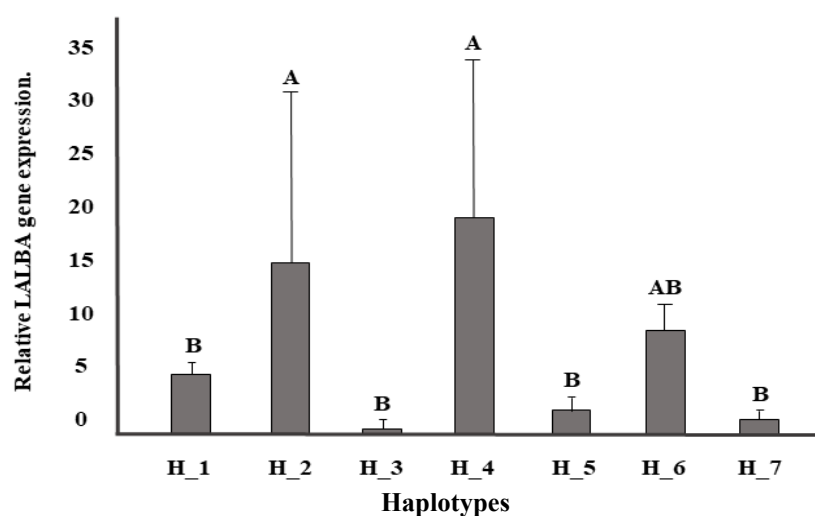
SNPs	Average milk production/day (L/day) (means $\pm$ SD)			Probability
	Genotypes			
-42	AA	AG	GG	0.983
	5.70 $\pm$ 1.77	5.55 $\pm$ 1.81	5.4 $\pm$ 1.83	
-60	TT	TC	CC	0.623
	5.46 $\pm$ 1.80	5.84 $\pm$ 1.73	0	
-292	GG	GA	AA	0.490
	5.80 $\pm$ 1.71	5.09 $\pm$ 1.74	5.39 $\pm$ 2.28	
-339	CC	CT	TT	0.772
	5.48 $\pm$ 1.79	5.86 $\pm$ 0.88	0	
-444	TT	TG	GG	0.461
	0	4.87 $\pm$ 1.63	5.57 $\pm$ 1.79	
-445	CC	CT	TT	0.490
	5.80 $\pm$ 1.71	5.09 $\pm$ 1.74	5.39 $\pm$ 2.28	
-501	TT	TG	GG	0.461
	0	4.87 $\pm$ 1.63	5.57 $\pm$ 1.79	
-555	IN	INDEL	DEL	0.809
	5.48 $\pm$ 1.80	5.80 $\pm$ 1.63	0	
-591	CC	CT	TT	0.170
	0	3.81 $\pm$ 1.18	5.58 $\pm$ 1.76	
-720	CC	CT	TT	0.249
	5.37 $\pm$ 1.78	7.44 $\pm$ 0	7.01 $\pm$ 0.05	

All haplotypes evaluated showed expression of the *Lalba* gene, as well as the selected endogenous gene GAPDH in the somatic cells of milk. Haplotypes three (ATGCGCGINTC), four (GTCGACGCTGINTC) and two (AGTGCGCGINTC) presented the lowest (0.632 ± 0.263) and highest (18.986 ± 16.264 ; 15.386 ± 12.956) expression levels, respectively. The last two mentioned were statistically significant ($P \leq 0.05$), when compared to haplotypes one, three, five, and seven. However, haplotype six was the only one that presented intermediate levels of expression, being

statistically similar to those with the highest and lowest expression, which exhibited an expression profile of (9.706 ± 5.199) value closer to the haplotypes with the highest levels of mRNA expression of the *Lalba* gene (Figure 1).

The gene expression profiles obtained from the seven haplotypes were compared with the average daily milk production data of the buffaloes evaluated in the study. However, as for the ten new SNPs found, there was also no statistically significant difference with the average milk production ($P > 0.05$).

Figure 1- Relative gene expression of the *Lalba* gene mRNA in seven haplotypes of dairy buffaloes from the Amazon region. Different letters above the bars indicate significant pairwise comparisons according to the Tukey test ($P \leq 0.05$).



Discussion

The present study was able to demonstrate that the *Lalba* gene in dairy buffaloes has specific genetic variations in its coding region. Based on this result, it was possible to confirm what has been reported in the literature for the polymorphic capacity of the *Lalba* gene, which was considered to have high genetic variability in production animals (12, 14, 22, 23). Therefore, there is evidence that nucleotide substitution mutations in regulatory and non-coding regions of genes influence the definition of complex characteristics in milk production.

In ruminants, milk production characteristics are mediated by the presence of quantitative loci traits (QLTs), which are spread throughout the genome, acting as central regions in which there may be an association between the genetic makeup and the animal's phenotype. In the meantime, these characteristics are shown to be dependent on the identification of several candidate genes, as well as their polymorphic variants (24). And the search for so-called promising genes is commonly used due to the ease of understanding certain metabolic pathways and physiological processes and also because they are close to QLTs (14).

In this study, it was possible to perceive the variety of SNPs that can be found in buffaloes, since ten new SNPs were detected in the regulatory region of the *Lalba* gene, with the one at position -42 (A>G) presenting a binding site for the transcription factor hepatocyte nuclear factor 3 (HNF-3). HNF-3 is a factor that plays a crucial role in the regulation of metabolism and tissue differentiation, mainly in the pancreas and liver (25). It was observed in the research by Shi et al. (26) that the SNP at the chromosomal position g.146704699 (G>A) of the AGPAT3 gene in dairy cattle, more precisely the A allele, created a transcription binding site (TFBS) for FOXA1 (Forkhead box protein A1, also known as hepatocyte nuclear factor 3-alpha (HNF-3-alpha). In addition, it showed a significant effect ($P \leq 0.05$) on three short-chain fatty acids (C6:0: Caproic fatty acid, C8:0: Caprylic fatty acid, and C10:0: Capric fatty acid) present in the milk of Holstein cows.

The allele and genotypic frequencies of wild-type alleles in most SNPs were high, which supports the degree of consanguinity observed in some SNPs through the positive F_{IS} values obtained in the present study. However, even with these SNPs suggesting inbreeding, 90% of those evaluated in the study are under HWE conditions due to the proximity in the H_e and H_o values. Furthermore, this fact can also be explained by the assumption that inbreeding does not necessarily eliminate all alleles from a population, but rather reorganizes them when it is present. Significant differences in H_e and H_o were observed only for the SNP (-720 C>T) which presented deviation in HWE ($P \geq 0.05$) so that the population may be subdivided by the presence of significant inbreeding or by the displacement of genes even from another population (27, 28).

In a study carried out by Unal et al. (29) with seventeen populations of Turkish water buffaloes, it was found that all twenty microsatellite loci tested were highly informative and polymorphic. However, the average F_{IS} value obtained in the study was 0.091 with all loci in HWE deviation. In the present study, the average F_{IS} obtained was 0.098, that is, similar to what was described in the previous study, but with divergence regarding HWE where of the ten SNPs found, nine are under HWE and only one is in deviation. However, in the population studied, only four SNPs are under an inbreeding process (positive F_{IS}), characterizing a reduction in diversity based, for example, on the Wahlund effect, which consists of the reduction of heterozygotes in the population (30).

In population genetic studies on dairy buffaloes carried out in the Amazon region, other researchers also found positive F_{IS} values (0.0294, 0.0329 and 0.0741), however, these were lower than those found in the present study. Thus, these findings may suggest that the buffalo herd in the region for certain mutations presents a considerable degree of consanguinity within the populations (31-33).

The leptin gene is strongly related to milk production and protein levels in buffaloes (34). Based on this, an investigation of the genetic variability of the SNP (LEP-1620) was carried out in Mediterranean, Murrah and their crossbred buffaloes in two distinct breeding systems characteristics of the Amazon region (upland and floodplain). In these populations, distinct F_{IS} values were found, being negative (-0.125, -0.171 and -0.142) for Mediterranean and Murrah from upland and Mediterranean from floodplain and positive (0.057) for the crossbreds raised in floodplain system with all racial groups in HWE ($P \geq 0.05$) (35).

Association studies with milk production traits for the *Lalba* gene in buffaloes are still scarce, however one of the first studies aimed at elucidating the effect of a SNP in exon 1 of the gene in two distinct buffalo breeds, Bhadawari and Murrah, was able to demonstrate that the AB and BC genotypes present in Bhadawari individuals were significantly associated ($P \leq 0.05$) with total milk production and daily milk production, but the AB, BB, BC, CC and CD genotypes present in Murrah did not show significant effects ($P \geq 0.05$) on these traits (13). Another non-significant SNP, the α -LA2516 SNP, located in exon 4 of the gene, was found to have no relationship with protein percentage, milk production and quantity of somatic cells in milk ($P \geq 0.05$) in Chinese Holstein cows (36).

Authors such as Zhang et al. (37) and Yong-Qiang et al. (38) also detected SNPs in the *Lalba* regulatory region (5'UTR and introns) that did not present a significant effect on performance and milk production traits in cattle (37, 38). The SNPs without effects on milk production mentioned above corroborate those found in the present study, in which it was not possible to observe a significant association regarding the average milk production (L/day). However, without observing a significant effect in the association, it was possible to notice that some SNPs and their genotypes stood out, as they showed an increase in milk production in certain buffaloes (Table 4). The lack of significance in the associations with the milk performance of the animals may be due to the environmental, epigenetic effect or the intrinsic differences that the studied breeds have, which in the case of buffaloes are still little investigated (14).

However, more recent studies have demonstrated that there are significant effects between associations of certain types of mutations such as SNPs, copy number variants (CNVs) and even microsatellites in both river and swamp buffalo (39, 29). Regarding environmental and epigenetic effects, variations based on CNVs contribute to better environmental adaptation in buffaloes across the continent where they are raised. Thus, it was reported that a CNV was observed in the promoter

region 1647 bp upstream of *Lalba*, and this is overlapping with two different transposons (RTE-BovB and Bov-Ta3). But the interesting thing about this finding is that this CNV was common (CN=2) in 95.08% of river buffaloes, but was presented as a deletion (CN=0) in 82.50% of swamp buffaloes, which may have contributed to the higher milk production of river buffaloes compared to swamp buffaloes (39).

SNPs located in the regulatory region can interfere with the binding of transcription factors, thus modulating the gene expression process through the inhibition or activation of transcription, which can generate different levels of reproductive and productive efficiencies that impact milk production (40). Therefore, the isolation of epithelial cells derived from milk somatic cells (MECs) is being used as a suggestion for non-invasive collection methods to obtain the analysis of expression of milk production genes. Higher amounts of mRNA of protein metabolism genes were observed in MECs of the Murrah breed compared to the Sahiwal breed. The expressions of casein and serum protein genes (*Lalba*) were significantly ($P \leq 0.05$) higher in MSCs purified during the early stage of lactation compared to those purified from other stages (peak, middle and late) (41). In the present study, another non-invasive alternative was used to obtain *Lalba* mRNA, which was obtained from milk somatic cells (MSCs). This proved to be efficient, since different levels of *Lalba* expression were observed in all haplotypes. Based on this, it can be suggested that the haplotypes that expressed higher levels of mRNA of the studied gene were probably from buffaloes that were probably in the early stages of the lactation period, and those that expressed lower levels were during the later stages.

In the study carried out by Chen et al. (42), the expression of *Lalba* in buffaloes at the end of lactation was low in MSCs, however, significantly higher ($P \leq 0.05$) in milk fat globules (MFG), also indicating that MFG can be used as another collection alternative to obtain transcripts, since the total RNA present in MFG derives from mammary epithelial cells.

Furthermore, in a study carried out based on transcriptome analyses of four dairy buffaloes Arora et al. (9) were able to demonstrate that genes involved in milk production were highly expressed during all stages of lactation, namely CSN2, CSN1S1, CSN3, LALBA, SPP1 and TPT1. The *Lalba* gene stood out, as it exhibited high levels of expression at the beginning of lactation. In the present study, it can be deduced that haplotypes four and two were highly expressed and significant ($P \leq 0.05$) and that these buffaloes were possibly in the early stages of lactation. Therefore, they can be considered candidates for greater synthesis of mRNA of the *Lalba* gene in milk and consequently greater production of the α -lactalbumin protein in buffaloes. Given that the increased expression of this gene is relevant for the synthesis of milk proteins, since α -LA in general makes up about 12% of whey proteins (10). Furthermore, α -LA is responsible for regulating lactose synthesis in mammals, with lactose being the main carbohydrate present in milk. Therefore, the *Lalba* gene is considered valuable for the metabolic pathway of lactose production in buffalo milk (43, 44).

Conclusion

The study was able to demonstrate that the *Lalba* gene is polymorphic in dairy buffaloes raised in the Amazon region, highlighting the InDel mutation that can act as important information for genetic characterization, that is, an interesting molecular marker of the population, which can guarantee an increase in the genetic variability of the gene in the species, as well as an increase in milk production. And even without causing a significant effect on milk production, they may have contributed to the high and significant expression of *Lalba* mRNA in haplotypes four and two.

However, it is necessary to carry out additional investigations on the presence of SNPs that are capable of influencing the production characteristics and composition of buffalo milk, as well as their expression levels, aiming to fix these mutations in large populations. Therefore, future research should focus on seeking proof of these possible positive associations that may improve buffalo breeds, especially those raised in the Amazon region, with the aim of validating these variants at field level, that is, directly demonstrating to producers' practical results of animals that are genetically superior in the production of milk and its derivatives.

Conflict of interest

This manuscript's authors declare no conflict of interest regarding the writing process or data analysis.

Acknowledgments

Gratitude to the team of the Molecular Biology laboratory of the Federal Rural University of Amazon and the financial support of this research by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel Foundation (CAPES).

References

1. Cavali J, Pereira RGA. Buffalo milk production. *In*: Salman AKD, Pfeifer LFM. (Ed.). Dairy farming in the Amazon. Brasília, DF: Embrapa, 2020;17:391-399. [[available at](#)]
2. Filho WRL, Mota AV, Mendonça RCA, Domingues FN, Rêgo AC, Faturi C. Buffalo milk production system in the Arari region of the Marajó archipelago, Pará. *Revista de ciências agrárias. Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*. 2022;65:1-9. [[available at](#)]
3. Bernardes O. Buffalo farming in Brazil: situation and economic importance. *Brazilian Journal of Animal Reproduction*, 2007;31:293-298.
4. Andrade KD, Rangel, NA, Araújo VM, Lima Júnior DM, Oliveira NA. Effect of season on milk quality. *Revista Verde*, 2011;6(3):33-37.
5. Hedkar CD, Kalyankar SD, Deosarkar SS. Buffalo milk. *In* Encyclopedia of Food and Health. Caballero B, Finglas PM, Toldrá F. ed. Academic Press, Oxford. 2016:522–528. [[available at](#)]
6. Pauciullo A, Cosenza G, Steri R, Coletta A, Jemma L, Feligini M, Di Berardino D, Macciotta NP, Ramunno L. An association analysis between OXT genotype and milk yield and flow in Italian Mediterranean river buffalo. *Journal of Dairy Research*. 2012; 79:150-156. [Doi: 10.1017/s0022029911000914](#)
7. Deng TX, Pang CY, Lu XR, Zhu P, Duan AQ, Liang XW. Associations between polymorphisms of the STAT1 gene and milk production traits in water buffaloes. *Journal of Animal Science*. 2016a.94:927-935. [Doi: 10.2527/jas.2015-0139](#)
8. Li J, Liang A, Li Z, Du C, Hua G, Salzano A, Campanile G, Gasparrini B, Yang L. An association analysis between PRL genotype and milk production traits in Italian Mediterranean river buffalo. *Journal of Dairy Research*. 2017; 84:430-433. [Doi:10.1017/S0022029917000693](#)
9. Arora R, Sharma A, Sharma U, Girdhar Y, Kaur M, Kapoor P, Ahlawat S, Vijn RK. Buffalo milk transcriptome: A comparative analysis of early, mid and late lactation. *Sci Rep*. 2019 Apr 12;9(1):5993. [Doi: 10.1038/s41598-019-42513-2](#)
10. Alichanidis E, Moatsou G, Polychroniadou A. Composition and properties of non-cow milk and products. *In* Non-bovine milk and milk products. Academic Press. 2016; 81-116. [Doi: 10.1016/B978-0-12-803361-6.00005-3](#)
11. Zicarelli L, Potena A, De Filippo C, Di Palo R, Campanile G. Comparison of buffalo with different cheesemaking yields. *Proceedings of the 1st National Congress on Buffalo Breeding*, 3–5 October, Eboli, 2001;241–246
12. Ostrowska M, Zwierzchowski L, Brzozowska P, Kawecka-Grochowska E, Żelazowska B, Bagnicka E. The effect of single-nucleotide polymorphism in the promoter region of bovine alphasalactalbumin (LALBA) gene on LALBA expression in milk cells and milk traits of cows. *J Anim Sci*. 2021.1;99(7): skab169. [Doi: 10.1093/jas/skab169](#)
13. Dayal S, Bhattacharya TK, Vohra V, Kumar P, Sharma A. Genetic polymorphism of alphasalactalbumin gene in riverine buffalo. *DNA Seq*. 2005;16(3):173-9. [Doi: 10.1080/10425170500088205](#)
14. Manzoor S, Nadeem A, Javed M. Polymorphism association and expression analysis of alphasalactalbumin (LALBA) gene during lactation in Nili Ravi buffalo. *Trop Anim Health Prod*. 2020;52(1):265-271. [Doi: 10.1007/s11250-019-02010-0](#)

15. Paredes LJ, Santos CL, Pereira WL, Gurreiro SL, Guimaraes RC, Barbosa EM, Favacho HG, Hamoy IG, Filho ED. Molecular characterization of the 3'-UTR sequence of the interferon-gamma gene and its expression profile in the ocular conjunctiva of amazon buffaloes', Iraqi Journal of Veterinary Sciences, 2023;37(4):885-892. [Doi: 10.33899/ijvs.2023.137835.2738](https://doi.org/10.33899/ijvs.2023.137835.2738)
16. Barbosa EM, Souza BB, Guimarães RC, Silva LKN, Azevedo JSN, Gonçalves EC, Ribeiro HFL, Rolim Filho ST, Silva Filho E. Novel polymorphism in exon 1 of the melatonin receptor gene unassociated with reproductive characteristics of buffaloes in the Amazon Region. Genetics and Molecular Research 2016;15(2). [Doi:10.4238/gmr.15028309](https://doi.org/10.4238/gmr.15028309)
17. Barbosa EM, Souza BB, Guimarães RC, Silva LKN, Azevedo JSN, Gonçalves EC, Ribeiro HFL, Rolim Filho ST, Silva Filho E. Polymorphisms in the melatonin receptor gene promoter and their associations with fertility characteristics in buffalo herd in Eastern Amazon. Genetics and Molecular Research 2017;16(2). [Doi: 10.4238/gmr16029610](https://doi.org/10.4238/gmr16029610)
18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.y., cold spring harbor laboratory press. 1989. 1659 p.
19. Livak KL, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta Ct}$ method. Methods. 2001; 25:402-408. [Doi: 10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262)
20. Yeh FC, Boyle TJB Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Belg J Bot 129:157. 1997
21. Solovyev VV, Shahmuradov IA, Salamov AA. Identification of promoter regions and regulatory sites. Methods Mol Biol. 2010; 674:57-83. [Doi: 10.1007/978-1-60761-854-6_5](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-854-6_5)
22. Lopdell TJ. Using QTL to Identify Genes and Pathways Underlying the Regulation and Production of Milk Components in Cattle. Animals (Basel). 2023;2;13(5):911. [Doi: 10.3390/ani13050911](https://doi.org/10.3390/ani13050911)
23. García-gámez E, Gutiérrez Gil B, Sahana G, Sánchez JP, Bayón Y, Arranz JJ. GWAS analysis for milk production traits in dairy sheep and genetic support for a QTN influencing milk protein percentage in the LALBA gene PLoS One. 2012;7(10): e47782. [Doi: 10.1371/journal.pone.0047782](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047782)
24. Rahmatalla SA, Arends D, Ahmed AS, Reissmann M, Brockmann GA. Whey protein polymorphisms in Sudanese goat breeds. Trop Anim Health Prod. 2020;52(3):1211-1222. [Doi: 10.1007/s11250-019-02119-2](https://doi.org/10.1007/s11250-019-02119-2)
25. Kaestner KH. The hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3 or FOXA) family in metabolism. Trends Endocrinol Metab. 2000 Sep;11(7):281-5. [Doi: 10.1016/s1043-2760\(00\)00271-x](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(00)00271-x)
26. Shi L, Wu X, Yang Y, Ma Z, Lv X, Liu L, Li Y, Zhao F, Han B, Sun D. A post-GWAS confirming the genetic effects and functional polymorphisms of AGPAT3 gene on milk fatty acids in dairy cattle. J Anim Sci Biotechnol. 2021;1;12(1):24. [Doi: 10.1186/s40104-020-00540-4](https://doi.org/10.1186/s40104-020-00540-4)
27. Hartl DL, Clark AG. Principles of Population Genetics. 4 ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. 2006;672.
28. Mcmanus C, Paiva S, Corrêa PS, Seixas L, Melo CB. Statistics for population genetics, Brasília, DF: Technical Series – Genetics, 2011. 50p. (INCT: Genetic Health Information of Brazilian Livestock). [\[available at\]](#)
29. Ünal, E.Ö.; Işık, R.; Şen, A.; Geyik Kuş, E.; Soysal, M. İ. Evaluation of Genetic Diversity and Structure of Turkish Water Buffalo Population by Using 20 Microsatellite Markers. Animals, 2021;11:1067. [Doi:10.3390/ani11041067](https://doi.org/10.3390/ani11041067)
30. Garnier-géré P, Chikhi L. Population Subdivision, Hardy–Weinberg Equilibrium and the Wahlund Effect. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). 2013. [Doi: 10.1002/9780470015902.a0005446.pub3](https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0005446.pub3)
31. Silveira KR. Population structure of dairy buffaloes using genomic data. Dissertation (master's degree in animal science) Faculty of Agricultural Sciences, Federal University of Grande Dourados. 2019.

32. Marques JRF, Martínez AM, Costa MR, Albuquerque MSM, Quiroz J, Vega pla JL, Delgado JV. Genetic Diversity of Brazilian Buffaloes *Bubalus Bubalis* Using DNA Microsatellites Arch Zootec. 2011;60:1213-1221. [[available at](#)]
33. Ángel-Marín PA, Cardona H, Moreno-Ochoa M, Cerón-Muñoz M. Analysis of genetic diversity in Colombian buffalo herds. Rev Colomb Cienc Pecu, 2010;23:411-421. [[available at](#)]
34. Zetouni L, de Camargo GM, da Silva Fonseca PD, Gil FM, Lugo NA, Aspilcueta-Borquis RR, Cervini M, Tonhati H. Effects of a single nucleotide polymorphism in the leptin gene on the productive traits of dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*). Mol Biol Rep. 2013;40(8):5159-63. [Doi: 10.1007/s11033-013-2618-z](#)
35. Silva LK, Barbosa EM, Silva SCB, Campelo JEG, Gonçalves EC, Silva CS, Marques JRF, Silva Filho E. Polymorphism of the leptin gene in buffalo breed groups from eastern Amazon. Vet Ital. 2021;31;57(4):257-263. [Doi: 10.12834/VetIt.1739.9163.2](#)
36. Zhou JP, Dong CH. Association between a polymorphism of the α -lactalbumin gene and milk production traits in Chinese Holstein cows. Genet. Mol. Res. 2013; 12(3):3375–3382. [Doi: 10.4238/2013.September.4.3](#)
37. Zhang JD, Sun JE, Womack Y, Zhang Y, Wang Y, Zhang Y. Polymorphism Identification, RH Mapping and Association of α - Lactalbumin Gene with Milk Performance Traits in Chinese Holstein. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2007;20(9): 1327–1333. [[available at](#)]
38. Wickramasinghe S, Rincon G, Islas-Trejo A, Medrano JF. Transcriptional profiling of bovine milk using RNA sequencing. BMC Genomics. 2012;25;13:45. [Doi: 10.1186/1471-2164-13-45](#)
39. Yang L, Han J, Deng T, Li F, Han X, Xia H, Quan F, Hua G, Yang L, Zhou Y. Comparative analyses of copy number variations between swamp buffaloes and river buffaloes. Anim Genet. 2023; 54(2):199-206. [Doi: 10.1111/age.13288](#)
40. Castellanos M, Mothi N, Muñoz V. Eukaryotic transcription factors can track and control their target genes using DNA antennas. Nat Commun. 2020;28;11(1):540. [Doi: 10.1038/s41467-01914217-8](#)
41. Sharma A, Shandilya UK, Sodhi M, Jatav P, Mohanty A, Jain P, Verma P, Kataria RS, Kumari P, Mukesh M. Milk-derived mammary epithelial cells as non-invasive source to define stage-specific abundance of milk protein and fat synthesis transcripts in native Sahiwal cows and Murrah buffaloes. 3 Biotech. 2019;9(3):106. [Doi: 10.1007/s13205-019-1642-7](#)
42. Chen Q, Wu Y, Zhang M, Xu W, Guo X, Yan X, Deng H, Jiang Q, Yang X, Lan G, Guo Y, Qin G, Jiang H. Milk fat globule is an alternative to mammary epithelial cells for gene expression analysis in buffalo. J Dairy Res. 2016;83(2):202-8. [Doi: 10.1017/S0022029916000133](#)
43. Miglior F, Sewalem A, Jamrozik J, Lefebvre DM, Moore RK. Analysis of milk urea nitrogen and lactose and their effect on longevity in Canadian dairy cattle. Journal of Dairy Science. 2006;89:4886–4894. [Doi: 10.3168/jds. S0022-0302\(06\)72537-1](#)
44. Qasba PK, Kumar S. Molecular divergence of lysozymes and alpha-lactalbumin. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1997;32(4):255–306. [Doi: 10.3109/10409239709082574](#)



4 Article

4.1 Identification of Novel SNPs in the regulatory region of the Oxidized Low-density lipoprotein Receptor 1 (*OLRI*) gene in dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*)



Cintia Luana Pinheiro Santos^{*1}, Elem Cristina Macedo Barra Sousa¹, Juliana Vasconcelos Figueiredo¹, Rafaelle Casseb Guimarães¹, Roberta Araújo Silva¹, Elizabeth Machado Barbosa², Priscila Di Paula Bessa Santana³, Ednaldo Silva Filho¹

¹ Animal Health and Production Institute, Molecular Biology Laboratory, Federal Rural University of the Amazon, Belém, Brazil.

² Department of the Collegiate Degree in Education, Federal University of Amapá, Mazagão, Brazil.

³ Social-Environmental and Water Resources Institute, Federal Rural University of the Amazon, Belém, Brazil.

Abstract

Buffaloes are animals capable of transforming foods with low nutritional attributes into products with high nutrient composition, including fats and proteins. Because of this, they are known as economically important ruminants for producing dairy products, since their milk is more profitable due to the high fat content present. The investigation of candidate genes in milk production revealed that the *OLRI* gene has the potential to influence production characteristics due to the role it plays in lipid and glucose metabolism. Because of this, the research aimed to find new polymorphisms in the *OLRI* gene to associate them with milk production. Eighty-five females from a property located in Bujaru/PA were used. DNA extractions were performed by the phenolic method, followed by PCR, purification, and sequencing. Four new SNPs were found in the studied population. None of the SNPs showed a significant association with average milk production, nor did they present binding sites for transcription factors. Two SNPs were transitional, and two transversion types had high wild-type nucleotide allele frequencies above 0.90, 75% under Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) conditions. The SNPs -641 A>T, -672 A>T, and -681 T>C presented negative F_{IS} , which suggests the possibility of being selected within the population to ensure possible increases in milk production, since, for the SNP -672 A>T, it heterozygotes exhibited higher levels of average milk production compared to the homozygotes. Thus, the presence of new alleles through the observed point mutations may contribute positively to the increase in production

*Corresponding authors: Cintia Luana Pinheiro Santos, E-mail: luanasantos6972@gmail.com, Tel.: +55 91 98853-9413

(Received 01 February 2025, accepted 15 March 2025)

DOI: 10.21608/ejvs.2025.356961.2629

©National Information and Documentation Center (NIDOC)

observed in animals that have these genotypes. The present study was the first to associate SNPs with zootechnical indices of milk production in buffaloes in the *OLRI* gene. However, studies focusing on the relationship between the SNPs present in the gene as well as other adjacent ones involved in milk production must be carried out in the species to validate the existing association.

Keywords: Fat, Milk production, Point mutations, Ruminants.

Introduction

The *Bubalus bubalis* species is of Asian origin and occupies a significant position in the global agricultural scenario, especially in Asia, South America, and Africa [1]. They contribute 11% of the total milk produced in the world, being the second most consumed dairy product, as it has superior qualities of components such as fats, proteins, lactose, vitamins, and minerals when compared to cow's milk [2-3]. Brazil has the largest buffalo herd in the Western world, currently with more than 1.6 million heads distributed throughout all regions of the country where they are raised, whether for meat or milk production. When it comes to the distribution of buffaloes by region, the North showed a large contribution in the total number of animals with 1,158,626 head, representing approximately 69.3% of the national buffalo farming, with emphasis on the state of Pará, which has the largest herd in Latin America with more than 650 thousand head, followed by Amapá with more than 300 thousand animals [4].

Due to its nutritional, physical-chemical, and sensory characteristics, the production of buffalo milk has gained greater visibility and is therefore seen as an agricultural activity of great financial, social, and Buffalo milk is an extremely versatile product, which goes beyond its use as a beverage. Its thicker texture, higher fat, and total solids content make it an ideal component for the production of a variety of fat-based dairy products [7]. Furthermore, the progressive process of awareness about the health benefits associated with buffalo milk further validates its appeal to consumers. Research

showed that buffalo milk has lower cholesterol levels compared to cow's milk, which makes it a great choice for individuals looking for healthier foods to prevent cardiovascular diseases [8]. In addition, buffalo milk also has many bioactive compounds and antioxidants that confer several properties capable of promoting health both in immune support and in the prevention of certain diseases [9]. However, the composition and production of buffalo milk are not fixed and can be influenced by nutritional, environmental, and even genetic factors. To this end, it is important to adopt a more targeted approach capable of minimizing these factors by making management more homogeneous and selecting animals with a known genetic architecture that can contribute to higher production [10]. With recent advances in the use of DNA sequence genotyping technologies, it has been possible to facilitate investigations into the genetic basis of milk production traits in buffaloes. Previous research has identified candidate genes responsible for these traits in buffaloes, including the oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (*OLRI*) gene [11]. Thus, in livestock activity, *OLRI* emerges as a candidate gene both at the level of milk production, composition and content of milk fat and protein, as well as at the level of cutting production for live weight and body morphometric characteristics of small and large ruminants [11-16]. In *Bubalus bubalis*, the gene is located on chromosome 4, containing 5 introns and 6 exons. Therefore, it is a type II cell surface membrane protein, which plays an important role in the degradation of oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL), as well as in

adipocyte proliferation [17]. *OLRI* also influences lipid metabolism in the liver and mammary glands [18,19]. In buffaloes, studies aimed at detecting SNPs in the *OLRI* gene are scarce. However, some researchers evaluated the presence of the SNP at position g8.232 (A>C) already described in dairy cattle in its 3' UTR region. They demonstrated that the presence of SNPs by PCR-RFLP generated monomorphic patterns. However, other samples were sequenced through cloning and after comparing the buffalo sequences with the published bovine sequence, variations were detected in nine nucleotide positions (85, 91, 116, 129, 151, 168, 171, 217, and 240). In contrast, for the study carried out in the intron 1 region of buffaloes of the Jafarabadi and Surti breeds, three SNPs were detected at positions 423 (T>C), 843 (T>C) and 866 (T>A), of which, Although the author mentions that both breeds had a milk fat content above 7%, they did not carry out studies on the association of the characteristic [20, 21]. Therefore, it is worth highlighting that the presence of these mutations in candidate genes may have potential implications for molecular marker-assisted selection (MAS) programs that aim to increasingly improve milk production characteristics in buffaloes in the Amazon region.

Given that, although significant results are much more commonly described in cattle, few are developed in the state, especially concerning buffaloes. Therefore, the objective of the study was to identify Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the regulatory region of the *OLRI* gene and investigate their probable associations with milk production in buffaloes in the Amazon region.

Material and methods

The Animal Use Ethics Committee (CEUA) approved the study of the Federal Rural University of the Amazon (2820150222/2022/CEUA/UFRA). A total of 85 crossbred buffaloes of the Murrah and Mediterranean breeds, with an average daily

milk production of 6 liters, were used. All were on average 36 months old, weighed between 350 and 500 kg, and had a complete lactation curve of 300 days. All buffaloes during the experiment were healthy, with no incidence of mastitis, and belonged to a property located in the municipality of Bujaru, Belém, Pará, Brazil (1°37'40"S, 48°13'21"W). The region does not have well-defined seasons, and the study was conducted during periods with higher rainfall. All animals evaluated were under a semi-intensive system with Kikuyu grass (*Brachiaria humidicola*) and Tifton 85 (*Cynodon spp*) pasture and received 1 kg of balanced lactation ration in the trough at the time of milking.

For subsequent genetic evaluations, five ml of blood was collected from the animals by vacuum puncture of the jugular vein and stored in tubes containing anticoagulant (EDTA).

The samples were stored in a thermal box at a maximum temperature of 4°C and taken to the Laboratory of Serology and Molecular Biology of the Federal Rural University of the Amazon– UFRA.

DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR)

It was performed by the phenol-chloroform method [22] and stored at -20°C. The samples used were quantified in a BioDrop µLITE spectrophotometer (BioDrop). Afterward, they were diluted to a concentration of 50 ng/µL and presented a purity level of 1.8. The investigation of genetic variation based on SNPs was performed by PCR of the *OLRI* gene (ID: 102408426) in its promoter region and 5' UTR. The following primer pair F 5' GCT AAA GAC ATT CCC CTC GAT 3' and R 5' CCT TTT GCT GTC TTA CCA TTT G 3' used in the research was designed through *Primer3plus* based on the reference sequence deposited in Genbank, it amplifies a fragment of 750 bp. The reactions were performed for a final volume of 25 µL, being 2 µL of DNA, 12.5 µL Taq DNA Polymerase

2x Master Mix (Ampliqon, Odense, Denmark), 0.5 µL of each primer - forward and reverse - (10 pmol/µL) and 9.5 µL of ultra-pure water. All reactions were performed in a Thermal Cycler 2720 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), with the following amplification protocol: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles with denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 62 °C for 30 s, extension at 72 °C for 50 s and final extension at 72 °C for 5 min. The PCR products were analyzed on a 0.8% agarose gel, a concentration that allowed better visualization of the amplified fragment (Figure 1).

DNA Purification and Sequencing

The PCR products were purified using the Product Purification Kit on a Column (Ludwig Biotec LTDA, Alvorada, RS, BR) and visualized on 0.8% agarose gels. Sanger sequencing was performed on both forward and reverse sequences of all samples using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Invitrogen California/USA), in a final volume of 10 µL. All sequencing was performed on an ABI 3500 Genetic Analyzer automated sequencer (Applied Biosystems). The sequences obtained were edited using the Finch TV v. 1.4.0 software (Geospiza Research Team, USA), and then using the BLAST system, the sequences were compared with the reference sequence for *Bubalus bubalis* deposited in GenBank. Finally, the BioEdit v. 7.2 software was used to verify the consensus sequences of each sample to perform their complete alignment. For this, the ClustalW tool available in the program was used.

Statistical analyses

Genetic diversity data such as allele and genotype frequencies, HWE, and F_{IS} were obtained using PopGene [23]. Mean milk production data were analysed using simple descriptive statistics in which Tukey's test was used for association with SNPs data, with a significance level of 0.05. Transcription factor domains in the promoter

region were identified using Nsite v. 5 software [24].

Results

From the sequence data obtained, it was possible to identify the presence of four SNPs in the promoter region and 5' UTR of the *OLRI* gene in dairy buffaloes. Of these, two were transitional and two were transversion (Table 1). Their polymorphic positions are demonstrated by the chromatograms shown in Figures 2 to 5.

Based on the genetic diversity analysis performed, it was detected that all mutations presented a wild-type allele frequency greater than 0.5. Therefore, 100% of the wild-type variants present in the mutations -280 (A>G), -641 (A>T), -672 (A>T), and -681 (T>C) presented high allele frequencies exceeding 95%. As for the mutant alleles, all presented frequencies lower than 0.05 and are therefore considered rare alleles in the population. For all SNPs evaluated, the values for the effective number of alleles (N_e) in the population were above 1.

The SNP at position -280 (A>G) was the only one that presented an observed heterozygosity rate (H_o) lower than the expected heterozygosity (H_e), according to the HWE proportions, which is shown by the positive F_{IS} value found for this SNP. This information suggests an excess of homozygotes, in which this SNP may be undergoing inbreeding processes. This is the only one that exhibited the presence of a buffalo representing the mutant homozygous genotype SNP -280 (animal GG) and is therefore considered rare in the population. However, for the other loci detected, the H_o rates were higher than the H_e rates, as proven by the negative F_{IS} values observed, so a greater presence of heterozygotes and possible selection of them in the population can be suggested. The values for the Shannon diversity index detected in the study for the four SNPs found are considered low.

The mutation at position -280 (A>G) presented the lowest value of 0.088, suggesting the presence of low genetic variability at this locus. However, the mutation at position -681 (T>C) presented the highest value of 0.152, from which it can be indicated that this SNP presents greater diversity within the population. Regarding the HWE proportions, three of the four SNPs found at positions -641 (A>T), -672 (A>T), and -681 (T>C) are under HWE conditions ($P>0.05$). The only SNP deviating from HWE is at position -280 (A>G). All information regarding the genetic diversity assessments is shown in Table 2.

The analysis performed to determine the presence of possible transcription factor binding sites revealed that none of the four SNPs detected presented such sites in the promoter region and 5' UTR of the *OLRI* gene in the dairy buffaloes investigated.

The association of the four SNPs found with the average milk production (L/day) of the buffaloes evaluated is described in Table 3. None of the genotypes of the SNPs found in the study showed statistically no difference with the average milk production ($P>0.05$). However, even though it was not possible to observe a significant effect in the association, it was possible to notice that some SNPs stood out because they showed higher milk production in certain genotypes.

For the SNP at position -672 (A>T), it was possible to observe that the heterozygous individuals showed a higher average milk production compared to their wild homozygous individuals. Presenting average milk production greater than 7.0 L/day, this being the highest production value observed among the four SNPs found in the present study. Another SNP that deserved notoriety was -280 (A>G), whose mutant homozygote (GG) showed milk production of almost 1 liter more than its wild homozygote. Based on these findings, it can be inferred that the presence of alleles, i.e., new variants in these SNPs, may be contributing positively to the increase in milk production in these animals, thus presenting the so-called additive effect.

SNP -280 (A>G) was the only one that exhibited the presence of the mutant genotype and, although there was only one animal representing it, it produced more milk than the representatives of the wild genotype. Therefore, it is important to highlight this, since the G allele may be beginning to be inserted in this population.

Discussion

The *OLRI* gene acts on many complex biological processes, among which the degradation of ox-LDL stands out, which, if internalized, affects lipid metabolism and, as a consequence, impairs glucose metabolism in the liver and mammary glands [26]. In production animals, previous research has reported the influence of polymorphisms in the *OLRI* gene associated with traits of economic interest in dairy and beef cattle farming, as well as those related to reproduction in small ruminants [15, 27-29].

The first studies of SNPs in the *OLRI* gene were developed in dairy cattle by Khatib et al. [11], who found the SNP A8232C in the 3' UTR region associated with the expression of the *OLRI* gene and linked to significant effects on milk fat production and fat percentage in Holstein cattle. In a second similar study, but with Italian Brown Swiss cattle, Khatib et al. [12] also found the previously mentioned SNP significantly associated with milk fat percentage, as well as a significant association of two haplotypes and somatic cell count (SCS), with the CGC haplotype presenting higher numbers of SCS in milk compared to the CAA haplotype. In the previous study, such an association had not been found.

The research conducted with Polish Holstein cattle also revealed that the SNP A8232C in the 3' UTR region was significantly associated with the percentage of fat in milk and that it resides within the supposed binding site for the Sp1/GC transcription factor.

The authors suggested that the change from the C to A allele may cause the elimination of the binding site found around the SNP position [30]. In the present research, no SNPs were presenting a site for binding to transcription factors; however, the promoter region and 5' UTR of the *OLRI* gene in buffaloes had not yet been investigated, and although it was not associated with any transcription factor in the animals evaluated, this does not mean that it cannot exist in other animals from different regions. Based on this information, further research directed at this association should be carried out in the species, as the presence of transcription factors that have a site linked to certain mutations such as SNPs can significantly affect the expression of the gene's protein, either by increasing, reducing or even stopping its transcription. In a study carried out in dairy cattle from India to the Sahiwal breed, a significant association ($P < 0.01$) was demonstrated between the CC genotype (homozygous wild type) of the C337A SNP located in the 3' UTR of the *OLRI* gene and the average fat percentage on the test day (ATDFP). In addition, there was also a significant difference between the genotypes ($P < 0.05$) of the T96C, C155T, A165G, G179A, and C265T SNPs for the same characteristic evaluated. The C337A mutation was also associated with lactational fat yield (LFY) ($P < 0.01$). In the same study, linkage disequilibrium (LD) analysis was performed for all seven SNPs found, which revealed two types of haplotypes (CGC and TAT) in Sahiwal cattle, with only the CCGGCC combination being significantly associated with ATDFP [31].

In buffaloes, studies related to the presence of SNPs in the gene are scarce, especially for the Amazon region. The SNPs already described in buffaloes were found in the 3' UTR region, which has been widely studied in cattle, as well as in intron 1. Of these, nine SNPs were found in the 3' UTR of the *OLRI* gene in buffaloes of the Mehsana breed (a cross between the Murrah and Surti buffalo breeds), which were not associated with

zootechnical indices of milk production [20]. Regarding intron 1, three SNPs were reported in buffaloes of the Jafarabadi and Surti breeds from the Gujarat region of India, being the first study to detect SNPs in the intronic region of the *OLRI* gene in buffaloes [21]. Another subsequent study also revealed the presence of five SNPs in intron 1 of buffaloes of the Mehsana and Banni breeds, which are specialized in milk production in the region and have a milk fat content $> 8\%$. However, as in the previous studies, no association analyses were performed between the polymorphisms and their milk production characteristics [32]. Although it was not possible to find a significant association between the SNPs and the average milk production in the present study, this was the first to perform such an association, which makes it a pilot study so that others can be carried out with the perspective of finding positive effects of mutations that may improve the production and composition of buffalo milk in the region (fat content), as is seen in cattle.

The mutations investigated in the *OLRI* gene in beef-producing cattle are directed to carcass quality traits. In a study carried out with Qinchuan cattle, three polymorphisms located in the 3' UTR region at positions G10563T, T10588C and C10647T were found, of which the frequencies of wild alleles and genotypes were high above 50% with the three SNPs under the HWE ($P > 0.05$), in addition to being within the range of moderate genetic diversity ($0.25 < \text{polymorphism information content} < 0.5$). However, only SNPs T10588C and C10647T were significantly associated with backfat thickness and intramuscular fat content of cattle [33]. In Simmental cattle that the genetic marker located in the 3' UTR was significantly associated with final weight, hot carcass weight, chilled carcass weight, percentage yield and total weight gain [34]. Based on the findings, both show that the *OLRI* gene can act as a genetic marker capable of influencing carcass quality traits, in addition to being suggested

as useful markers for future genetic investigations aimed at improving beef cattle, believing that such studies can be extended to beef buffaloes.

The current research demonstrated that the *OLRI* gene is polymorphic in dairy buffaloes from the region. However, the five SNPs found were not significantly associated with average daily milk production, corroborating previous studies carried out in dairy cattle where no significant association was observed between the marker already described in the 3' UTR region of the *OLRI* gene and the characteristics of milk production and composition [13, 34, 35]. As well as those already reported in dairy buffaloes of other breeds cited in this manuscript.

Regarding the genetic diversity parameters evaluated in the research, the values of allele frequencies, as well as wild genotypes, were high, exceeding 90% for all SNPs detected. With only SNP -280 presenting a high degree of consanguinity observed by the positive F_{IS} and deviating from the HWE ($P < 0.05$), the presence of inbreeding at this locus may be subdividing the population, causing the effect of displacement of alleles even from another population [36]. The values of the frequencies of the wild alleles of the five SNPs detected in the study were 0.98, 0.97, 0.98, 0.97 and 0.96, much higher than those found in previous research with dairy cattle who reported frequencies of 0.54, 0.57, 0.58 and 0.483 for the C allele (wild) of the SNP A8232C in the 3' UTR region of the *OLRI* gene [11, 30, 15, 14]. Based on these findings, it is suggested that the same SNPs be investigated individually in other buffalo populations, to verify whether there is any relationship between them and the improvement in milk production rates.

Conclusion

In dairy buffaloes, this study was the first to associate point mutations detected in the *OLRI* gene with milk production. It was possible to demonstrate that the regulatory region of the gene is polymorphic in animals

adapted and raised in the Amazon region. Although no significant association was found with the average daily milk production per animal, it is worth noting that heterozygotes of SNP -672 (A>T) exhibited higher milk production, which may be related to the presence of new allelic variants in these SNPs. Therefore, additional research should be carried out in larger populations including additional parameters such as reproduction, production, and milk composition of buffaloes adapted to the breeding region, to validate the combination of the SNPs described in this study with the possible increase in the volume of milk produced, as well as its fat content, given that the *OLRI* gene may influence this parameter.

Acknowledgments

Gratitude to the team of the Molecular Biology laboratory of the Federal Rural University of Amazon.

Declaration of Conflict of Interest

This manuscript's authors declare no conflict of interest regarding the writing process or data analysis.

Ethical of approval

Ethical approval was obtained by the ethical committee of the Federal Rural University of the Amazon, Belém, Brazil (Approval No. 2820150222/2022/CEUA/UFRA)

Figure 1. Amplification pattern of the *OLR1* gene in the investigated dairy buffaloes.

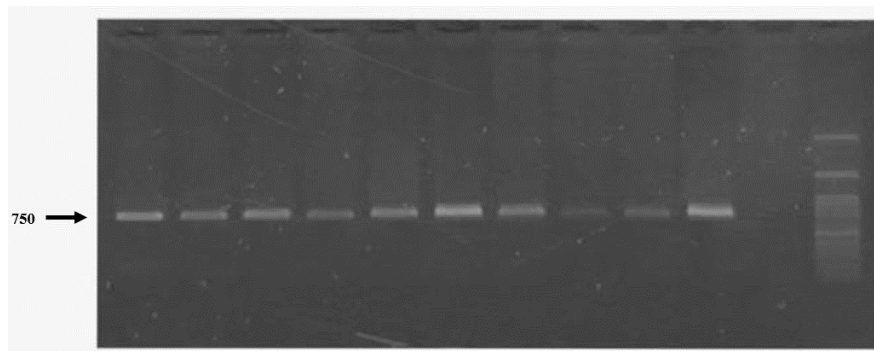


Figure 2. Chromatogram and ClustalW alignment showing variation at position -280 (A>G) of the *OLR1* gene in dairy buffaloes from the Amazon region.

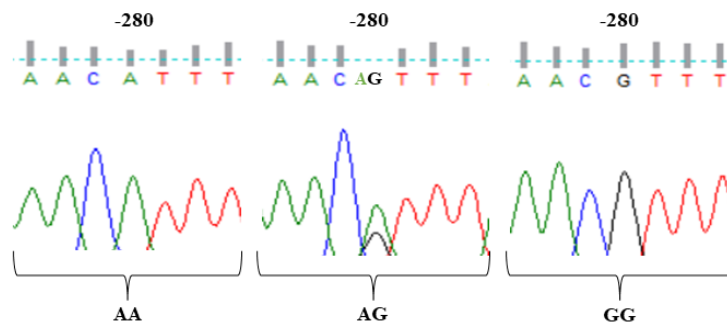


Figure 3. Chromatogram and ClustalW alignment showing variation at position -641 (A>T) of the *OLR1* gene in dairy buffaloes from the Amazon region.

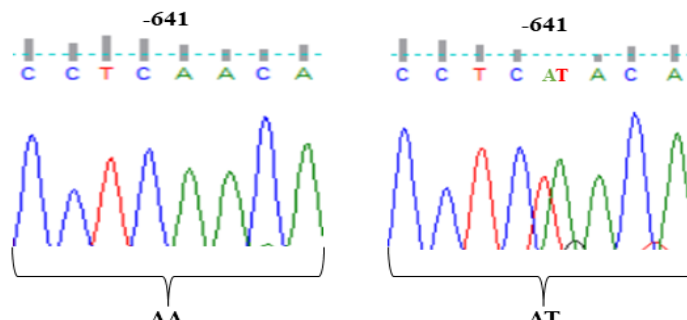


Figure 4. Chromatogram and ClustalW alignment showing variation at position -672 (A>T) of the *OLR1* gene in dairy buffaloes from the Amazon region.

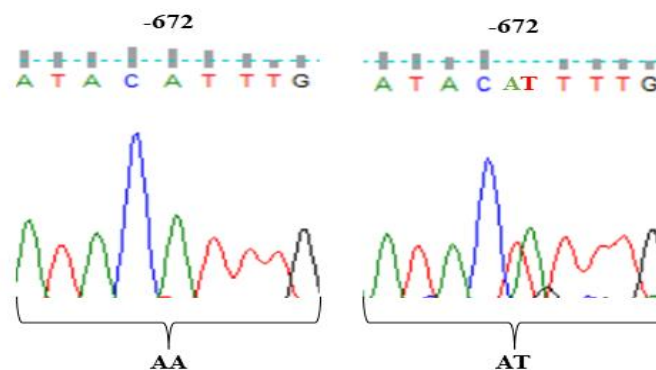
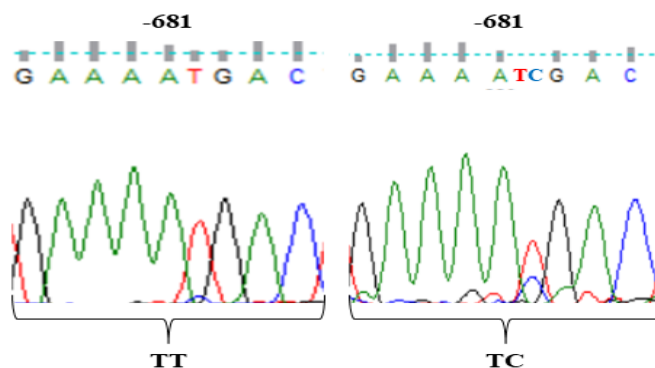


Figure 5. Chromatogram and ClustalW alignment showing variation at position -681 (T>C) of the *OLR1* gene in dairy buffaloes from the Amazon region.**TABLE 1.** Summary of single nucleotide alterations (SNPs) in the *OLR1* gene in buffaloes from the Bujaru-Pa region compared to the reference sequence of *Bubalus bubalis* (GenBank ID: 102408426)

Mutation in the PCR fragment	Genomic position (bp) based on the reference	<i>Bubalus bubalis</i>	Bujaru-Pa buffaloes	Type of variation
-280 (A>G)	20067071	A	G	Transition
-641 (A>T)	20066709	A	T	Transversion
-672 (A>T)	20066679	A	T	Transversion
-681 (T>C)	20066670	T	C	Transition

pb: base pairs

TABLE 2. SNP positions and respective descriptions of genetic diversity in the promoter region and 5' UTR of the *OLR1* gene in dairy buffaloes.

Gene	Promoter region and 5' UTR of <i>OLR1</i>					Ho	He	Ne*	I*	<i>F</i> _{IS}	HWE
	Frequencies										
	Genotypes			Alleles							
Locus											
-280 (A>G)	AA 0,97 (83)	AG 0,01 (1)	GG 0,01 (1)	A (0,982)	G (0,017)	0.011	0.034	1.035	0.088	0.660	0.000
-641 (A>T)	AA 0,95 (81)	AT 0,04 (4)	TT 0	A (0,976)	T (0,023)	0.047	0.046	1.048	0.111	-0.024	0.847
-672 (A>T)	AA 0,95 (81)	AT 0,04 (4)	TT 0	A (0,976)	T (0,023)	0.047	0.046	1.048	0.111	-0.024	0.847
-681 (T>C)	TT 0,92 (79)	TC 0,07 (6)	CC 0	T (0,964)	C (0,035)	0.070	0.068	1.073	0.152	-0.036	0.758

Ho: Observed heterozygosity, He: Expected heterozygosity, Ne*: Effective number of alleles, I*: Shannon diversity index, F_{IS} : Inbreeding coefficient, HWE: Hardy Weinberg equilibrium ($P>0.05$).

TABLE 3. Association of novel polymorphisms detected in the regulatory region of the OLR1 gene with buffaloes' average milk production (L/day).

SNPs	Milk production (L/day) (means $\pm$ SD)			Probability
	Genotypes			
-280 (A>G)	AA 5.53 $\pm$ 1.85	AG 0	GG 6.49 $\pm$ 0.0	0.616
-641 (A>T)	AA 5.61 $\pm$ 1.81	AT 5.0 $\pm$ 2.49	TT 0	0.592
-672 (A>T)	AA 5.51 $\pm$ 1.83	AT 7.47 $\pm$ 0.0	TT 0	0.300
-681 (T>C)	TT 5.58 $\pm$ 1.80	TC 5.16 $\pm$ 3.23	CC 0	0.758

References

- Mou, M.A., Deb, G.K., Hridoy, M.F.A., Alam, M.A., Barai, H.R., Haque, M.A. and Bhuiyan, M.S.A. Detection of Polymorphisms in FASN, DGAT1, and PPARGC1A Genes and Their Association with Milk Yield and Composition Traits in River Buffalo of Bangladesh. *Animals*, 14, 1945. (2024). Doi: 10.3390/ani14131945
- Cavali, J. and Pereira, R.G.A. Produção leiteira de búfalos. In: Salman AKD, Pfeifer LFM. (Ed.). *Pecuária leiteira na Amazônia*. Brasília, DF: Embrapa, Cap. 17, pp. 391-399 (2020).
- Hosseini, S.M., Tingzhu, Y., Pasandideh, M., Liang, A., Hua, G., Schreurs, N.M., Abbas Raza, S.H., Salzano, A., Campanile, G., Gasparrini, B. and Yang, L. Genetic Association of PPARGC1A Gene Single Nucleotide Polymorphism with Milk Production Traits in Italian Mediterranean Buffalo. *BioMed Research International*, 18(1) 3653157. (2021). Doi:10.1155/2021/3653157
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM). Rebanho de bubalinos (búfalos). Belém: IBGE. (2023).
- Deng, T., Liang, A., Liang, S., Ma, X., Lu, X., Duan, A., Pang, C., Hua, G., Liu, S., Campanile, G., Salzano, A., Gasparrini, B., Neglia, G., Liang, X. and Yang, L. Integrative Analysis of Transcriptome and GWAS Data to Identify the Hub Genes Associated with Milk Yield Trait in Buffalo. *Front Genet.* Feb 5; 10:36. (2019). Doi: 10.3389/fgene.2019.00036
- Filho, W.R.L.L., Mota, A.V., Mendonça, R.C.A., Domingues, F.N., Rêgo, A.C. and Faturi, C. Buffalo milk production system in the Arari region of the Marajó archipelago, Pará. *Revista de ciências agrárias. Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Science*. 65:1-9. (2022).
- Zhang, Y., Colli, L. and Barker, J.S.F. Asian water buffalo: domestication, history and genetics. *Anim Genet*.

- Mar;51(2):177-191. (2020). Doi: 10.1111/age.12911
8. Manzoor, S., Nadeem, A., Maryam, J., Hashmi, A.S., Imran, M. and Babar, M.E. Osteopontin gene polymorphism association with milk traits and its expression analysis in milk of riverine buffalo. *Trop Anim Health Prod.* Feb;50(2):275-281. (2018). Doi: 10.1007/s11250-017-1426-1
9. Stobiecka, M., Król, J. and Brodziak, A. Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products. *Animals.* 12(3):245. (2022) Doi: 10.3390/ani12030245
10. Haque, M.A., Alam, M.Z., Iqbal, A., Lee, Y.M., Dang, C.G. and Kim, J.J. Evaluation of accuracies of genomic predictions for body conformation traits in Korean Holstein. *Anim Biosci.* Apr;37(4):555-566. (2024). Doi: 10.5713/ab.23.0237
11. Khatib, H., Leonard, S., Schutzkus, V., Luo, W. and Chang, Y. Association of the OLR1 gene with milk composition in Holstein dairy cattle. *J Dairy Sci.* 89:1753–1760. (2006). Doi:10.3168/jds.S00220302(06)72243-3
12. Khatib, H., Rosa, K., Weigal, F., Schiavini, F., Snatus, E. and Bagnato, A. Additional support for an association between OLR1 and milk fat traits in cattle. *Ani Genet.* 38:308–310. (2007). Doi: 10.1111/j.1365-2052.2007.01584.x.
13. Schennink, A., Bovenhuis, H., Leon-Kloosterziel, K.M., Van Arendonk, J.A. and Visker, M.H. Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. *Ani Genet.* 40 (6):909–916. (2009). Doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01940.x.
14. Soltani-Ghombavani, M., Ansari-Mahyari, S. and Ali-Edriss, M. Association of a polymorphism in the 3' untranslated region of the OLR1 gene with milk fat and protein in dairy cows. *Archiv Tierzucht.* 56 (32):328–334. (2013). Doi: 10.7482/0003-9438-56-032
15. Wang, X., Penagaricano, F., Tal-Stein, R., Lipkin, E. and Khatib, H. Association of an OLR1 polymorphism with milk production traits in the Israeli Holstein population. *J Dairy Sci.* Mar;95(3):1565-7. (2012). Doi: 10.3168/jds.2011-5012
16. Ajafar, M.H., Al-Thuwaini, T.M. and Dakhel, H.H. Association of OLR1 gene polymorphism with live body weight and body morphometric traits in Awassi ewes: short communication. *Mol Biol Rep.* May;49(5):4149-4153. (2022). Doi: 10.1007/s11033-022-07481-3
17. Kowalewska-Łuczak, E.U. and Czerniawska-Piątkowska, E. Polymorphism in the OLR1 gene and functional traits of Dairy cattle. *Veterinarski Arhiv.* 88(2): 171-17. (2018). Doi: 10.24099/vet.arhiv.170228
18. Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T. and Masaki, T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature.* Mar 6;386(6620):73-7. (1997). Doi: 10.1038/386073a0
19. Ringseis, R., Dathe, C., Muschick, A., Brandsch, C. and Eder, K. Oxidized fat reduces milk triacylglycerol concentrations by inhibiting gene expression of lipoprotein lipase and fatty acid transporters in the mammary gland of rats. *J Nutr.* Sep;137(9):2056-61. (2007). Doi: 10.1093/jn/137.9.2056
20. Manisha, D., Rank, D.N., Vataliya, P.H. and Joshi, C.G. Oxidized low density lipoprotein receptor 1 (OLR1) gene polymorphism in Mehsana buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Buffalo Bulletin.* 32:4. (2013).
21. Nadeem, S., Jawale, C.V., Bhong, C.D., Kurkute, A.S., Patel, T.B., Rank, D.N.

- and Joshi, C.G. SNP exploration in the oxidised low density lipoprotein receptor 1 (OLR1) gene in *Bubalus bubalis*. *Buffalo Bulletin*. 30.4. (2011).
22. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.y., cold spring harbor laboratory press, 1659 p. (1989).
23. Yeh, F.C. and Boyle, T.J.B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belg J Bot*. 129:157-163. (1997).
24. Solovyev, V.V., Shahmuradov, I.A. and Salamov, A.A. Identification of promoter regions and regulatory sites. *Methods Mol Biol*. 674:57-83. (2010). Doi: 10.1007/978-1-60761-854-6_5
25. Chen, M., Qiu, H., Lin, X., Nam, D., Ogbu-Nwobodo, L., Archibald, H., Joslin, A., Wun, T., Sawamura, T. and Green R. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in sickle cell disease vasculopathy. *Blood Cells Mol Dis*. 60:44-8. (2016). Doi: 10.1016/j.bcmd.2016.06.005
26. Gui, L., Raza, S.H.A. and Jia, J. Analysis of the oxidized low density lipoprotein receptor 1 gene as a potential marker for carcass quality traits in Qinchuan cattle Asian-Australas. *J Anim Sci*. 32:58-62. (2019). Doi: 10.5713/ajas.18.0079
27. Ardicli, S., Dincel, D., Samli, H., Senturk, N., Karalar, B., Unlu, S. and Balci, F. Association of polymorphisms in lipid and energy metabolism-related genes with fattening performance in Simmental cattle. *Ani Biotechnology*, 34(8), 3428–3440. (2022). Doi: 10.1080/10495398.2022.2152557
28. Mohammed, M.M., Al-Thuwaini, T.M. and Al-Shuhaib, M.B.S. A novel p.K116Q SNP in the OLR1 gene and its relation to fecundity in Awassi ewes. *Theriogenology*. May; 184:185-190. (2022). Doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.03.014
29. Komisarek, J. and Dorynek, Z. Effect of ABCG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *J Appl Genet*. 50(2):125-32. (2009) Doi: 10.1007/BF03195663
30. Mir, M.A., Ahmad, T., Gupta, I.D., Magotra, A., Singh, A.P., Singh, M. and Muzhupilezhikethu Raveendran, V. Association of polymorphisms in exon 6 and 3'-untranslated region of the OLR1 gene with milk production traits in Sahiwal cattle. *J Applied Ani Res*, 51(1), 156–165. (2023). Doi: 10.1080/09712119.2023.2167822
31. Jawale, C.V., Shabir, N., Bhong, C.D., Tripathi, A.K., Hiren, P., Rank, D.N. and Joshi, C.G. Characterization of SNPs in Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor 1 (OLR1) gene in Mehsana and Banni breeds of buffalo. *Biomed Research*. 25(3): 303-306. (2014).
32. Ardicli, S., Soyudal, B., Samli, H., Dincel, D. and Balci, F. Effect of STAT1, OLR1, CSN1S1, CSN1S2, and DGAT1 genes on milk yield and composition traits of Holstein breed. *Rev Bras Zootec*. 47. (2018). Doi: 10.1590/rbz4720170247
33. Rychtářová, J., Sztankóová, Z., Kyselová, J., Zink, V., Štípková, M., Vacek, M. and Štolc, L. Effect of DGAT1, BTN1A1, OLR1, and STAT1 genes on milk production and reproduction traits in the Czech Fleckvieh breed. *Czech J. Anim. Sci*. 59(2):45-53. (2014). Doi: 10.17221/7228-CJAS
34. Mcmanus, C., Paiva, S., Corrêa, P.S., Seixas, L. and Melo, C.B. Estatísticas para descrever genética de populações, Brasília, DF: Série Técnica – Genética, 50p. (2011). (INCT: Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira).

5 CONCLUSÕES GERAIS

As ferramentas da biologia molecular empregadas na busca por polimorfismos na presente pesquisa foram eficientes, visto que, puderam demonstrar que as regiões reguladoras de ambos os genes envolvidos nas características de produção de leite em bubalinos são polimórficas, ou seja, apresentam variações nas sequências de DNA entre indivíduos da mesma população e espécie. Os quais, podem conferir variabilidade genética na mesma.

No que concerne ao gene *LALBA*, este que faz parte do metabolismo proteico do leite, o estudo foi capaz de demonstrar que mesmo não havendo associações significativas dos polimorfismos encontrados com a produção de leite das búfalas avaliadas, houveram diferenças significativas de expressão do mRNA do gene entre os sete haplótipos avaliados, demonstrando que as células somáticas (MSCs) presentes no leite bubalino, são capazes de serem utilizadas em estudos de expressão gênica, que buscam métodos não invasivos para sua avaliação.

Em relação ao gene *OLRI* o presente estudo foi o primeiro a realizar associação de mutações de base única com a produção de leite em búfalas leiteiras. E mesmo que nenhuma significância possa ter sido observada é válido destacar que duas mutações o Indel -646 (TAAA) e SNP -672 (A>T), podem ser passíveis de seleção nessa, como em outras populações bubalinas. Uma vez que os heterozigotos exibiram maiores produções de leite. Assim, o gene *OLRI* por mostrar-se polimórfico na espécie deve ser mais investigado quanto a sua influência na produção e componentes do leite.

Por fim, nosso estudo conseguiu demonstrar que os genes do metabolismo leiteiro avaliados nas búfalas da região amazônica possuem variabilidade. Devido a isso, tanto os genótipos quanto os haplótipos descritos podem ser utilizados como possíveis marcadores moleculares, sendo, portanto, inseridos nos programas de melhoramento genético. Entretanto, os mesmos devem ser testados em populações bubalinas maiores para conseguir validar o aumento da produção de leite e consequentemente a melhora na produtividade da propriedade, pois ao selecionar animais melhorados pode-se reduzir os custos de produção da fazenda, garantindo ótimos índices de produção de leite com bons lucros para o produtor, seja no leite in natura ou na fabricação de derivados lácteos.

ANEXO

Certificado de aprovação do CEUA/UFRA.



**Comissão de Ética no
Uso de Animais CEUA/UFRA**



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Identificação e validação in vitro de marcadores moleculares de termotolerância em populações bubalinas de leite (*Bubalus bubalis*) na Amazônia", protocolada sob o CEUA nº 2820150222 (10.000479), sob a responsabilidade de **Priscila Di Paula Bessa Santana** e equipe; *Elem Cristina Macêdo Barra de Sousa* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural da Amazônia (CEUA/UFRA) na reunião de 25/05/2022.

We certify that the proposal "In vitro identification and validation of molecular markers of thermotolerance in dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Amazon", utilizing 85 Buffalos (85 females), protocol number CEUA 2820150222 (10.000479), under the responsibility of **Priscila Di Paula Bessa Santana** and team; *Elem Cristina Macêdo Barra de Sousa* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal Rural University of Amazonia (CEUA/UFRA) in the meeting of 05/25/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2022** a **12/2023**

Área: **Biotecnologia Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bubalinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **1 a 5 anos**

N: **85**

Linhagem: ***Bubalus bubalis***

Peso: **500 a 2000 kg**

Local do experimento: **Fazenda Experimental da Buhrás no município de Bujaru, Pará - Coleta do material biológico. Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular da Ufra/ISPA - Análise Molecular. Laboratório de Fertilização In Vitro do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Cultura de Células.**

Belém, 22 de junho de 2022

Prof. Dra. Natalia Guarino Souza Barbosa
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dra. Ernestina Ribeiro dos Santos Neta
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural da Amazônia