

**ARIOSTO AFONSO DA SILVA**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DA ALFA-S1-  
CASEÍNA: UM PARADIGMA PARA MELHORAR A QUALIDADE  
E O USO DO LEITE DE CABRA NA ALIMENTAÇÃO HUMANA**

**RECIFE-PE  
2006**

ARIOSTO AFONSO DA SILVA

**ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DA ALFA-S1-  
CASEÍNA: UM PARADIGMA PARA MELHORAR A QUALIDADE  
E O USO DO LEITE DE CABRA NA ALIMENTAÇÃO HUMANA**

Dissertação de Mestrado,  
apresentado ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Veterinária  
da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, como requisito para  
a obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: Dr. JOSÉ AUGUSTO BASTOS AFONSO  
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MANOEL ADRIÃO GOMES FILHO

RECIFE-PE  
2006

Ficha catalográfica  
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

S586p Silva, Ariosto Afonso da  
Polimorfismo genético da alfa-S1-caseína: um  
paradigma para melhorar a qualidade e o uso do leite  
de cabra na alimentação humana/ Ariosto Afonso da Silva. -- 2006.  
29 f. : il.

Orientador: José Augusto Bastos Afonso.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
Departamento de Medicina Veterinária.  
Inclui bibliografia.

CDD 636.390 892 6

1. Moxotó
2. SRD
3. Alpina americana
4. Alfa-S1-caseína
5. PCR-RFLP
6. Leite de cabra
  - I. Afonso, José Augusto Bastos
  - II. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

Dissertação elaborada e defendida por:

ARIOSTO AFONSO DA SILVA

Aprovada pela banca examinadora:

EXAMINADORES:

---

Dr. José Augusto Bastos Afonso - Orientador

---

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho - Examinador

---

Prof. Dr. Márcia Bezerra da Silva – Examinadora

---

Dr. Carla Lopes de Mendonça - Examinadora

RECIFE-PE  
2006

Dedico

Aos meus pais Severino e Nazinha Afonso “in memoriam” que souberam priorizar a educação dos filhos acima de tudo.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus primeiramente que vem diligenciando o meu caminho e que sem o Seu consentimento eu não teria chegado aqui ou em outras conquistas da minha vida.
- Ao Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho, pela seriedade que desempenha seus trabalhos e pelo companheirismo profissional, estimulando-me a fazer este Mestrado. Minha história de professor teria sido diferente se não fosse esta oportunidade concedida. Ao caro colega minha gratidão.
- À Universidade Federal Rural de Pernambuco e à Coordenação de Pós-Graduação, do Mestrado em Ciência Veterinária.
- Ao meu orientador Dr. José Augusto B. Afonso que soube compartilhar nos momentos difíceis deste trabalho, sempre prestativo ajudando-me a superar as minhas limitações.
- À Profa. Dra. Áurea Wischral, pelo apoio e realização deste trabalho.
- Ao corpo docente do Mestrado.
- À jovem Ana Catarina de Araújo do setor do COMUT que com muita eficiência atendeu minhas solicitações.
- À amiga e bibliotecária Suely Manzi que com muita presteza organizou a bibliografia desta Dissertação.
- Ao colega e Prof. Dr. Anísio Francisco pelos envios de publicações.
- Ao pediatra Antônio Correia Vasconcelos pelos informes sobre o leite de cabra na dieta de criança alérgica.
- Aos meus colegas do curso de Mestrado.
- Ao aluno de Medicina Veterinária e bolsista do PIBIC, Madriano Christilis pela colaboração técnica no laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada - FAMA, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal.
- Aos meus filhos Ariosto e Alexandre, que torceram por mim e compreenderem as horas em que eu estava ausente em função de meus afazeres.
- À Rosângela Lucena, professora do Departamento de Química, amiga e companheira, pelas sugestões valiosas e por ter sido a alavanca propulsora de minha volta à sala de aula na qualidade de mestrando.

“Quando alguém julgar ter alcançado o saber, é porque não sabe onde está o verdadeiro conhecimento” (I Coríntios 8:2).

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>1. Objetivo Geral.....</b>	<b>14</b>
<b>2. Objetivo Específico.....</b>	<b>14</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>1. Local de realização.....</b>	<b>22</b>
<b>2. Animais.....</b>	<b>22</b>
<b>3. Coleta de Amostras.....</b>	<b>22</b>
<b>4. Exames Laboratoriais.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Processamento das amostras de sangue.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2. Extração de DNA de leucócitos.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3. Reação em cadeia de polimerase - PCR....</b>	<b>24</b>
<b>4.4. PCR-RFLP (Reação em cadeia de polimerase –         Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrrição.....</b>	<b>25</b>
<b>4.5. Análise estatística.....</b>	<b>25</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>1. Reação em cadeia de polimerase – PCR.....</b>	<b>26</b>
<b>2. Reação em cadeia de polimerização – Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP).....</b>	<b>26</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>32</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

### FIGURAS

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 2% corada com Brometo de Etídio dos fragmentos amplificados da alfa-S-1-caseína com primers específicos.....p. 26

Figura 2 – Genotipagem em caprinos da alfa S-1-caseína, usando a reação em cadeia de polimerase (PCR) seguido pela ação da enzima de digestão Xmn I. O Gene (CSN1S1) está localizado entre os nucleotídeos 208 e 420 de parte do oitavo e do nono intro.....p. 27

### TABELA

Tabela 1 – Valores de freqüência dos alelos encontrados nas raças alpina Americana, Moxotó e SRD.....p. 27

## RESUMO

O Nordeste brasileiro em especial o semi-árido tem sido uma área de vocação pecuária, especialmente, para a exploração dos ruminantes domésticos entre eles os caprinos. Há muitas décadas que o leite de cabra vem sendo indicado como fonte de proteína na dieta de crianças, quando estas apresentam reações alérgicas ao leite bovino. Dentre as proteínas chamadas de caseínas, a alfa-S1-caseína foi a primeira proteína comprovada com base no polimorfismo genético. Objetivando realizar a genotipagem do leite provenientes de criações de cabras do sertão, agreste e zona da mata pernambucana, através da técnica de PCR-RFLP, estudou-se o polimorfismo do gene da alfa-S1-caseína. Utilizando 60 caprinos das raças Moxotó, Alpina Americana e Mestiço. Fez-se a extração do DNA por meio do protocolo de clorofórmio e fenol e o gene da alfa-S1-caseína foi amplificado pela técnica da PCR. Em seguida foi utilizada a enzima de restrição Xmn I para obter a frequência alelica das raças estudadas. Foi verificado a presença do gene tipo C/D, para os animais da raça Alpina Americana, o gene tipo B/D, para a raça Moxotó e Mestiço, concluindo-se que existem variações genéticas para a alfa-S1-caseína do leite das raças caprinas estudadas na região.

Palavras chaves: Leite, Caprinos, alfa-S1-caseína, PCR-RFLP.

## ABSTRACT

In the Northeast of Brazil, in the semi-arid region, exists a breeding vocation area of cattle, especially exploring domestic ruminants including caprines. In the last decades the milk of goats has been indicated as a protein source to the diet of children with allergic reactions to the bovine milk. Among the proteins known casein, alpha-S1-casein was the first truly proved on basis of the genetic polymorphism. Aiming characterizes the herds of milk goats of the backcountry, rural and forest zone from Pernambuco State, the PCR-RFLP technique was used and it was studied the polymorphism of the gene of  $\alpha$ -s1-casein. Using 60 goats of the breeds Moxotó, Alpine American and half-breed, the DNA was extracted by chloroform and phenol protocol and the gene of the  $\alpha$ -s1-casein was amplified by PCR's technique. Followed it the restriction enzyme Xmn I was used to obtain the frequency allelic of the studied breeds. It was verified the presence of the gene type D, for the American Alpine animals and the gene type B/D for the Moxotó and half-breed breeds. It was concluded that there are genetics variations for the  $\alpha$ -s1-casein from the milk of the caprice breeds in the region.

Key words: milk, caprine, alpha-S1-casein, PCR-RFLP.

## INTRODUÇÃO

No mundo, tem-se dado muita importância aos estudos de recursos genéticos em animais domésticos, no entanto, estes ainda são pouco caracterizados, principalmente em relação às populações nativas e mestiças que desempenham um papel socioeconômico muito importante para as populações que habitam as regiões de clima semi-árido e que dependem destes animais para sua subsistência (HERSON, 1992).

O leite de cabra é conhecido, no meio científico, pela sua importância na alimentação das crianças e das pessoas idosas (McCULLOUGH, 2003). Ele é recomendado por médicos e nutricionistas para ser consumido por pessoas alérgicas ao leite de vaca, ou pela falta deste ou do leite materno (ELSAYED et al., 2004). Há muitas décadas que o leite de cabra vem sendo indicado na dieta de crianças alérgicas ao leite bovino, o que afeta cerca de 3% das crianças recém-nascidas (NOUAILLE et al., 2005).

A composição do leite de cabra varia de acordo com a raça e condições ambientais. A sua constituição protéica possui cinco proteínas principais:  $\beta$ -lactoalbumina,  $\alpha$ -lactoalbumina, k-caseína,  $\beta$ -caseínas e  $\alpha$ -caseínas. No leite de vaca, a fração protéica  $\alpha$ -caseína é considerada a causadora de alergia (ALVES e PINHEIRO, 2005).

O leite apresenta polimorfismo genético nas suas frações protéicas, que é a existência de alelos múltiplos de um gene presentes em uma população, normalmente expresso com diferentes fenótipos. A alfa-S1-caseína foi a primeira proteína comprovada fundamentando-se no polimorfismo genético. Na cabra, o gene CSN1S1, por ser o mais polimórfico, representa o modelo

responsável pela maior parte das variedades observadas da alfa-S1-caseína (RAMUNNO et al., 2004 e 2005).

A caprinocultura pela expressão sócio-econômica que representa para a população da região Nordeste, tem a necessidade da implantação de biotecnologias com a finalidade de melhorar a produtividade dos seus rebanhos. O estudo do polimorfismo genético do leite de animais criados nas condições zoosanitária e de bioclimatologia na nossa região permitirá uma melhor correlação com as raças de produção e o conhecimento da composição do leite de cabras de diferentes raças. Uma vez que no Brasil não existem publicações relacionadas ao tema proposto. Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo caracterizar o genótipo da alfa-S-1-caseína em cabras do Estado de Pernambuco das raças Moxotó, Mestiço e Alpina Americana.

## **OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Caracterizar o genótipo da alfa-S1-caseína em cabras do Estado de Pernambuco das raças Moxotó, Mestiço e Alpina Americana.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Amplificar o gene da alfa-S1-caseína com oligonucleotídeos iniciadores específicos através da PCR (reação em cadeia de polimerase).
- b) Clivar o produto da amplificação com a enzima de restrição Xmn I.
- c) Identificar os possíveis alelos A, B, C, D, E, F e O da alfa-S1-caseína nas raças analisadas.

## REVISÃO DE LITERATURA

A exploração da caprinocultura vem desde os primórdios da civilização e foi decisiva para estabelecer o homem em diversas áreas geográficas por fornecer leite, carne e pele. No Brasil, os primeiros caprinos foram trazidos pelos colonizadores portugueses e, ao longo dos anos, desenvolveram mecanismos de adaptação às condições climáticas, características de cada região. Estes animais apresentam características de rusticidade, resistência às doenças e uma capacidade digestiva que utiliza as forragens disponíveis no meio em que são criados para a produção de carne e leite (SOUZA NETO, 1987).

O Nordeste brasileiro, em especial o semi-árido, durante séculos, tem sido uma área de vocação pecuária, principalmente para a exploração dos ruminantes domésticos. Sendo ruminantes de pequeno porte, os caprinos apresentam significativas vantagens em relação à bovinocultura, principalmente no que diz respeito à área ocupada e manejo. A rusticidade desses animais, bem como a facilidade de adaptação às condições ambientais e outros fatores, contribuem para tornar essa atividade relevante, nas pequenas e médias propriedades rurais do semi-árido (CARDOSO, 2002).

Nunes (1987) destaca que os custos financeiros de uma vaca equivalem ao de 8 a 20 caprinos, em função da facilidade de manejo, devido ao pequeno porte destes animais vem despertando nos produtores grande interesse em ampliar a produção de seus rebanhos, objetivando tornar a atividade mais lucrativa.

No Nordeste, o desenvolvimento da caprinocultura é severamente afetado por inúmeros fatores, entre eles, a alta incidência de problemas

sanitários e nutricionais. A criação de caprinos nas regiões semi-áridas brasileiras é caracterizada por práticas de manejo inadequadas, com relação principalmente aos aspectos sanitários, o que interfere sobremaneira na produtividade do rebanho (SIMPLÍCIO et al., 1981; AZEVEDO, 1982).

Gilberto Freyre (1937), em seu livro “Nordeste”, descreve sobre a importância da caprinocultura na região do semi-árido, que favorecida pela adaptação destes animais à vegetação da caatinga, serve como fonte de renda e alimentação para a população (Bandeira et al., 2004).

Na década de 30 e início da década de 40, os principais caprinos vistos no Nordeste eram da raça Moxotó, encontrados no Estado de Pernambuco, com maior frequência no Vale do Rio Moxotó de onde se originou o nome da raça, e no norte do Brasil, na Ilha de Marajó, no Pará. Nesta época ainda eram criados em menor escala os mestiços das raças Toggemburg e Nubiana (DOMINGUES, 1942).

Já a Alpina Americana é uma raça especializada na produção de leite, muito apreciada nos Estados Unidos e Canadá, de onde foram feitas algumas importações por criadores brasileiros (RIBEIRO, 2006). Esta raça encontra-se mais concentrada na região da zona da mata do Estado de Pernambuco. Atualmente, ela é uma das preferidas pelos criadores, como produtoras de leite para consumo humano e fabricação de queijos, iogurtes e outros derivados.

Os animais Mestiços proporcionam a formação de rebanhos mestiços mais produtivos em comparação às nativas, pois as crias reúnem o potencial genético do pai e a rusticidade da mãe. Estes animais encontram-se distribuídos por todo o Estado de Pernambuco, desde a região de Brejo até o

Sertão. Normalmente, estes animais são criados de maneira mais confinada, para fornecimento de leite à família (RIBEIRO, 2004).

Atualmente a população efetiva nacional de caprinos é aproximadamente de 9.573.439, onde a região Nordeste representa 93,4% desse montante. Em Pernambuco, a quantidade de leite *in natura* ou resfriado e industrializado é variável, no mês de setembro do ano de 2005 apresentou-se em torno de 9.950 litros (IBGE, 2005).

A caprinocultura sempre foi uma das melhores opções de exploração animal para a humanidade. Com a introdução de novas raças, a biotecnologia tem oferecido oportunidade de conhecer o polimorfismo genético de cada ecótipo e sua correlação com a produção de carne e o conhecimento da composição protéica do leite. Com isto, a agroindústria da caprinocultura vem aumentando sua produtividade melhorando a qualidade do leite e seus derivados para consumo humano (NG-KWAI-HAMG, 1998).

A boa digestibilidade do leite de cabra é conferida pela presença de ácidos graxos de cadeia média (8 a 12 carbonos) na sua constituição. Estes ácidos graxos são facilmente hidrolisados pelas enzimas pancreáticas e, após serem absorvidos no intestino delgado, são conduzidos à veia porta. Este processo digestivo também facilita a absorção de vitaminas hidrossolúveis (McCULLOUGH, 2003).

A concentração de macrominerais no leite de cabra é duas a três vezes superior à do leite humano. Com relação ao leite de vaca, apresenta níveis superiores de cálcio, fósforo, potássio, cloro e magnésio. Daí seu valor terapêutico na dieta de pessoas idosas como tratamento de osteoporose

(GUEGUEN, 1997). Em sua composição, também está o selênio (700 µg/100ml de leite), conhecido pela sua atividade antioxidante (PINA et al., 2003).

López-Aliaga et al. (2005), trabalhando com ratos, demonstraram uma eficiente propriedade terapêutica do leite de cabra. Assim, animais que se alimentaram deste leite, apresentaram um aumento de colesterol na secreção biliar, e uma concomitante queda do colesterol plasmático. Além disso, o consumo do leite de cabra faz diminuir a concentração de triglicérides do plasma, sendo uma medida profilática anti-aterogênica e apresenta menor risco às doenças coronarianas.

Tanto no leite da vaca como da cabra, o teor protéico de caseína tem valor aproximado de 80%, ou seja, superior ao do leite humano onde a caseína representa 40% das lactoproteínas (MARTIN, 1999). Os 20% restantes das lactoproteínas do leite da vaca é constituído de  $\alpha$ -lactoglobulina e  $\beta$ -lactoglobulina (NOUAILLE et al., 2005).

O leite caprino tem ainda como fator positivo, a ausência de histamina, considerada um forte agente alergênico. Ela age sobre receptores específicos (receptores H) localizados, sobretudo nos músculos bronquiais, induzindo contrações dos mesmos e dificultando a função respiratória. Ela se encontra no leite de vaca num percentual de 50µg/100ml (METAIS et al., 1998).

Roncada et al. (2002) descreveram que o leite de cabra contendo alfa-S1-caseína procedente de alelos intermediários, são mais utilizados para as pessoas alérgicas. Também Haenlein (2004) atribui o menor percentual de alfa-S1-caseína como fator determinante à hipoalergenicidade.

McCullough (2003) observou que em 300 casos de crianças na fase infantil, com alergia à albumina do leite de vaca (quadro asmático), 270 ficaram

livres deste sintoma depois que se alimentaram com leite de cabra durante 6 semanas. Geralmente, estes processos alergênicos surgem uma semana após a criança ingerir o leite de vaca (ELSAYED et al., 2004).

Wal (2001) atribui os fatores alergênicos às caseínas (lactoproteínas) do leite de vaca. Nouaille et al. (2005) consideraram a  $\beta$ -lactoglobulina como dominante alergênico e que não é somente a beta caseína do leite de vaca que induz alta resposta de IgE, isto também ocorre com a beta caseína do leite humano. A  $\beta$ -lactoglobulina está ausente no leite humano, todavia está presente no leite de cabra numa concentração inferior ao leite de vaca (PINA et al., 2003). Munoz Martin et al., (2004) também consideraram as caseínas do leite de vaca como os principais alergênicos.

Manfredi et al., (1993) observaram as variantes de alelos A, B, C, D, E, F e O que foram classificadas de acordo com a relação da síntese de proteínas. Os alelos A, B, C estão associados a uma taxa de síntese protéica elevada. O alelo E, está associado a uma taxa de síntese intermediária, F e D com uma taxa de síntese fraca e O com uma taxa de síntese nula.

As sete variantes descritas nas cabras Alpinas e Saanen francesas por Boulanger et al. (1984), com base nas diferentes mobilidades eletroforéticas, foram classificadas dentro dos quatros grupos de acordo com a média de síntese protéica associada a cada um deles: O 1º grupo foi formado de alelos fortes A, B, C nos quais foi encontrada uma média de 3.6g da alfa-1-caseína por kg de leite. O 2º grupo foi formado por um só grupo intermediário, E, associado a uma média de 1.6g por kg de leite. O 3º grupo constituído por alelos fracos, D e F, teve uma média de 0.6 Kg. O 4º grupo considerado como

grupo de alelo nulo (O), é o que determina a ausência desta caseína no leite (GROSCLAUDE et al., 1987).

Uma inconveniência dos genótipos fortes e intermediários tem sido observada com relação ao sabor do queijo. Queijos feitos com leite procedente destes genótipos têm menos aroma típico do que procedentes de genótipo fraco, devido aos diferentes ácidos graxos. Contudo, tem sido discutido se isto é realmente um efeito do gene CSN1S1 ou a consequência da lipólise dos ácidos graxos durante a maturação do queijo (DELACROIX et al., 1996; DELACROIX, 1998). Os efeitos deste polimorfismo foram estudados também na Itália (PIZZILO et al., 1999), no rebanho da Espanha (ANALLA et al., 2000) e em rebanho misto nos EUA (CLARK e SHERBON, 2000).

Além do sabor que os alelos fortes produzem no queijo de cabra, Clark e Sherbon (2000) comprovaram propriedades de rápida coagulação e formação de micelas mais consistentes; estes estudos foram realizados anteriormente por Ambrosoli et al. (1988) e Barbieri et al. (1995) que mostraram esta característica. Ainda, os alelos fortes, promovem queijos ricos em proteínas e gorduras (VASSAL, L. et al, 1994).

Os efeitos deste polimorfismo sobre a composição do leite, estruturas das micelas, propriedades coagulantes e produção de queijo têm sido muito estudados no rebanho francês onde constatou-se que não existe diferença entre os genótipos com respeito à produção de leite, tem-se comprovado os efeitos do polimorfismo genético da alfa-S1-caseína sobre as características físico-químicas do leite de cabra, os alelos AA induzem maior síntese de alfa-S1-caseína conferindo a fabricação de queijos superior aos obtidos com outros tipos de leite. O leite procedente de genótipos fortes apresentam propriedades

de fácil coagulação, sólida coalhada, queijo mais firme, etc., melhores do que o leite obtido nos genótipos intermediários, e estes apresentam por sua vez, melhores propriedades de que os genótipos fracos (MAHÉ et al., 1993; REMEUF, 1993; BARBIERI et al., 1995; RICORDEAU et al., 1996; MARTIN et al., 1999; RICORDEAU et al., 2000).

Na seleção de caprinos leiteiros, em décadas passadas, pesava muito o fator “quantidade de leite”. Atualmente a seleção feita pelo polimorfismo genético (BEVILAQUA et al. 2002) tem auxiliado na agroindústria onde esta seleção visa mais a qualidade do leite. Em vista disto trabalhos efetuados por Grosclaude et al. (1987), Jordana et al. (1996) e Veress et al. (2004) confirmam que o melhor queijo procede de leite associado com a alfa-S1-caseína e os alelos fortes A, B e C.

O interesse pelo polimorfismo genético da alfa-S1-caseína não é somente em termos imunológicos e dietéticos. Na agroindústria, tem-se valorizado o efeito deste polimorfismo sobre o leite e seus derivados. Houve um significativo impacto econômico sobre a qualidade do leite de cabra depois que seus componentes foram determinados, e a alfa-S1-caseína participa como uma principal proteína (VERESS et al., 2004).

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1- Local de realização

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada - FAMA, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

### 2- Animais

Foram utilizadas 60 amostras de sangue obtidas de caprinos, fêmeas adultas, clinicamente sadias, criadas em sistema extensivo, divididos em 3 grupos de 20 animais, Mestiço, Moxotó e Alpina Americana provenientes das regiões do Agreste do Médio Capibaribe, Sertão do Moxotó e Zona da Mata Norte, representadas pelos municípios de João Alfredo, Ibimirim e São Lourenço da Mata, respectivamente.

### 3- Coleta das amostras

Para a coleta de sangue foram utilizados tubos *vacutainer* (EDTA)<sup>1</sup>, onde as amostras foram acondicionadas imediatamente em recipiente contendo gelo.

### 4- Exames laboratoriais

#### a) Processamento das amostras de sangue

Para a obtenção dos leucócitos, estes, foram separados do plasma através de centrifugação<sup>2</sup> (825 g por 10 min), em seguida, com o auxílio de uma pipeta<sup>3</sup> o plasma foi desprezado. Nos tubos em que se encontravam as

---

<sup>1</sup> Vacuum II – Indústria Brasileira

<sup>2</sup> Centrifuga SIGMA

<sup>3</sup> Pipetman Gilson

hemácias e leucócitos, foi adicionada solução salina (0,9% em NaCl<sup>4</sup>), fechados, onde eram homogeneizados, inclinando-os levemente para cima e para baixo. Em seguida, foram centrifugados por cinco minutos a 3000rpm e descartando o sobrenadante. Esta operação foi repetida por três vezes ou até as células (eritrócitos e leucócitos) estarem bem lavadas. Em seguida com o auxílio de uma pipeta foram feitas as coletas da camada das células, para serem acondicionadas em tubos devidamente identificados e armazenados em *freezer*<sup>5</sup>.

### **b) Extração de DNA de leucócitos**

A extração do DNA leucocitário foi realizada através do método modificado (MANIATIS et al., 1989). Em um tubo *ependorf*<sup>6</sup> de 1,5 mL devidamente identificado, foi adicionado para uma amostra contendo: 100µl da amostra de leucócito, 100µl de TE (Tris<sup>7</sup> 10 mM – EDTA<sup>8</sup> 1mM pH 8,0) e 100µl de fenol<sup>9</sup> equilibrado pH 8,0. A amostra foi homogeneizada a por 1 min em um vortex<sup>10</sup>, centrifugou<sup>11</sup> a 17968g por 5 min a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi transferido para outro tubo devidamente identificado e adicionou-se 100µl de fenol-clorofórmio<sup>12</sup> (1:1), a amostra foi mixada por 1 min e centrifugada a 17958g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo *ependorf* devidamente identificado onde foi adicionado 100µl de clorofórmio, mixado por 1 min e centrifugado a 17968 g por 5 min. Novamente em outro tubo *ependorf* devidamente identificado, foi adicionado 10µl de acetato de amônio<sup>13</sup> 3M, 100µl do sobrenadante do tubo anterior (onde encontra-se os DNAs) e 100µl de isopropanol<sup>14</sup>. A mistura foi mixada por 1 min e incubou por no mínimo 60 min no *freezer*, em seguida, centrifugada a 17968g por 15 min, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado com 500µl de etanol<sup>15</sup> 70% na centrífuga a uma

---

<sup>4</sup> Cloreto de Sódio – Laboratório Merck

<sup>5</sup> Freeze - Consul

<sup>6</sup> SSI – Scientific Specialties Inc.

<sup>7</sup> Tris – Invitrogen life technologies

<sup>8</sup> EDTA – Sigma Chemical Co.

<sup>9</sup> Phenol – Laboratório Merck

<sup>10</sup> Vórtex – Marca Phoenix

<sup>11</sup> Centrifuga SIGMA 2K15

<sup>12</sup> Clorofórmio – Laboratório Merck

<sup>13</sup> Acetato de Amonio P.A. - Cromato Produtos Químico LTDA

<sup>14</sup> Isopropanol – Laboratório Merck

<sup>15</sup> Ethanol – Laboratório Merck

rotação de 17968g durante 5 min a 4°C. Retirado o etanol 70% e o *pellet* deixado em temperatura ambiente foi resuspendido em 50µl de TE (Tris-EDTA pH 8,0).

O DNA extraído foi analisado em gel de agarose<sup>16</sup> a 0,8%, com marcador de peso molecular fago-λ, corado com brometo de etídeo, para análise em luz ultravioleta e fotografado<sup>17</sup> para verificação de sua qualidade.

### c) Reação em cadeia da polimerase - PCR

Os genes da alfa-S1-caseína foram amplificados segundo Ramunno et al. (2000), em um termociclador<sup>18</sup>, utilizando-se a enzima Taq DNA polimerase<sup>19</sup> e os pares de primers<sup>20</sup> “sense”: 5’ TTCTAAAAGTCTCAGAGGCAG 3’ e “anti-sense”: 5’ GGGTTGATAGCCTTGTATGT 3’.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL. Estas reações continha 2,5µL de 10X PCR<sup>21</sup>, 1,75 µL de 50mM de MgCl<sub>2</sub><sup>22</sup>, 1µL do oligonucleotídeo “sense”, 1µL do oligonucleotídeo “ante-sense”, 2,5µL de dNTPs<sup>23</sup>, 15 µL de água milliQ<sup>24</sup>, 0,8 U Taq DNA polimerase, 30ng de DNA.

A reação foi incubada num termociclador da Eppendorf que executou uma programação de desnaturação inicial de 97°C por 2 min, 60°C por 45 seg, 72°C por 2 min e 30 seg. Em seguida 30 ciclos de 94°C por 45 seg, 60°C por 45 seg, 72°C por 2 min e 30 seg com um aumento progressivo de 4 seg por cada ciclo na extensão; com uma extensão final de 72°C por 10 min no final do ciclo. O DNA amplificado foi analisado em gel de agarose 2%, com marcador de peso molecular DNA-Ladder 50bp, corado com brometo de etídeo<sup>25</sup>, visualizado em luz ultravioleta<sup>26</sup> e fotografado para constatar sua amplificação.

<sup>16</sup> Agarose – Invitrogen life Technologies

<sup>17</sup> ZoomBrowser-Canon – PowerShot S70 – Digital Câmara

<sup>18</sup> Termociclador – Eppendorf Mastercycler personal

<sup>19</sup> Taq DNA polimerase – Invitrogen life Technologies

<sup>20</sup> Primers - Invitrogen life Technologies

<sup>21</sup> Tampão - Invitrogen life Technologies

<sup>22</sup> MgCL<sub>2</sub> - Invitrogen life Technologies

<sup>23</sup> dNTP - Invitrogen life Technologies

<sup>24</sup> Água milliQ – Sistema Elga de purificação

<sup>25</sup> Brometo de Etídeo – Invitrogen – Life Technologies

<sup>26</sup> Aparelho luz ultra-violeta – Vilber Loumart

#### **d) PCR-RFLP (Reações em cadeia de polimerase – Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição)**

A reação de clivagem do DNA com a enzima de restrição foi realizada com um volume final de 15 $\mu$ L. Para cada reação, foi preparado uma mistura (mix) contendo 8,5 $\mu$ L de água milliQ, 1,5 $\mu$ L de tampão da enzima<sup>27</sup>, 0.8U da enzima XmnI<sup>28</sup>, mixada em vórtex para homogeneizar a amostra. Adicionou-se 10 $\mu$ L do mix em um tubo para PCR contendo 5 $\mu$ L do DNA amplificado (produto de PCR) por 4 horas a 37°C em condições de tamponamento, em seguida a digestão, foi realizada a inativação da enzima à 65°C por 20 min. Após a digestão enzimática, o DNA digerido foi analisado em gel de agarose a 2%, com marcador de peso molecular DNA-Ladder 50bp, corado com Sayber Green<sup>29</sup>, visualizado em luz ultravioleta e fotografado, para verificação dos alelos da alfa-S1-caseína.

#### **e) Análise estatística.**

O modelo estatístico deste trabalho foi descritivo, onde utilizamos a frequência das bandas alélicas encontradas, sob a forma de percentis (%), para se estabelecer a ocorrência dos alelos encontrados em cada raça dos caprinos estudados no trabalho (CURI, 1997).

---

<sup>27</sup> Tampão de enzima – New England - Biolabs

<sup>28</sup> Enzima restrição - New England - Biolabs

<sup>29</sup> Sayber Green – Invitrogen – Life Technologies

## RESULTADOS

### 1. Reação em cadeia pela polimerase – PCR.

As amplificações dos alelos CSN1S1<sup>F</sup> da alfa-S1-caseína, dos animais estudados (caprino Mestiço, Alpina Americana e Moxotó) neste experimento, com os oligonucleotídeos específicos “sense”: 5’ TTCTAAAAGTCTCAGAGGCAG 3’ e “anti-sense”: 5’ GGGTTGATAGCCTTGTATGT 3’, apresentaram o mesmo padrão de amplificação com 230 pb (Figura 1).

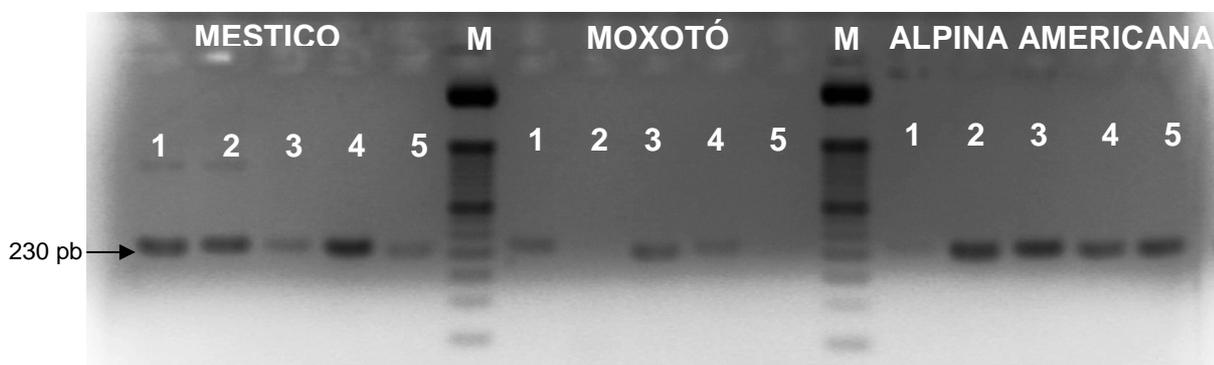


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 2% corada com Brometo de Etídio dos fragmentos amplificados dos DNAs.

Amostras:

Mestiço: 1, 2, 3, 4, 5

Moxotó: 1, 2, 3, 4, 5

Alpina Americana: 1, 2, 3, 4, 5

Marcador DNA-Ladder 50bp: M

### 2. Reação em cadeia pela polimerase – polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP).

Os fragmentos amplificados dos DNAs foram digeridos com a enzima de restrição Xmn I, a uma temperatura de 37°C durante 4 horas.

O resultado da digestão enzimática para os animais Mestiço e Moxotó apresentaram o mesmo padrão de pares de base, entretanto a Alpina Americana apresentou um único padrão diferente (Figura 2 e Tabela 1).

Tabela 1: Frequência alélica nas raças Alpina Americana, Moxotó e Mestiço.

Raças	N <sup>o</sup> de animais	Alelos
Alpina americana	20	C/D (100%)
Moxotó	20	B/D (100%)
Mestiço	20	B/D (100%)

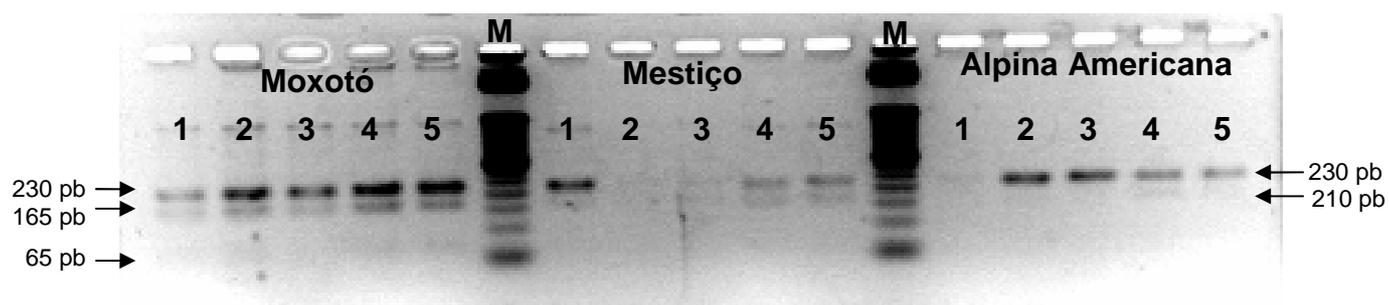


Figura 2: Genotipagem em caprinos da alfa-S1-caseína, usando a reação em cadeia pela polimerase seguido pela ação da enzima de digestão Xmn I.

Alelo B = 65pb + 165 pb

Alelo C = 210 pb

Alelo D = 230 pb

Marcador DNA-Ladder 50bp: M

## DISCUSSÃO

Por meio da técnica utilizada no presente estudo (PCR-RFLP), os genes da alfa-S1-caseína (CSN1S1) foram amplificados com oligonucleotídeos específicos e os fragmentos gerados (60, 160 e 230pb) estão próximos dos observados por Ramuno et al. (2000).

Houve um significativo impacto econômico sobre a qualidade do leite de cabra depois que foram identificados os alelos (YAHYAOUI et al., 2000; RAMUNO et al., 2001; VERESS et al., 2004; SANCHEZ et al. 2005) que induzem a síntese dos componentes protéicos tais como alfa-S1-caseína, kapa-caseína e beta-lactoglobulina.

Os resultados obtidos neste experimento são similares aos genótipos encontrados nos rebanhos da raça Alpina Francesa e Saanem, em estudos realizados na Itália (MARLETTA et al., 2000; MEGGIOLARO et al., 2000; FELIGINI et al., 2005) na Noruega (VEGARUD, et al., 1999), no rebanho da Espanha (JORDANA et al., 1996; ANALLA et al., 2000) e em rebanho misto nos Estados Unidos (CLARCK e SHERBON, 2000).

Foi observado em nosso experimento que o alelo D aparece com maior frequência em todos os animais estudados, sendo que os animais Mestiço e Moxotó apresentam adicionalmente o alelo B e a raça Alpina Americana, o alelo C. Estes achados discordam dos estudos de Boulanger et al. (1984), em cabras das raças Alpinas, Saanen e cruzadas (Alpina e Saanen), que encontraram uma predominância do alelo B (forte) sobre o alelo A (forte). Todavia, em nosso experimento, há uma equivalência entre os alelos B e D (fraco) entre os animais das raças Moxotó e Mestiço.

Por outro lado Grosclaude et al. (1994) demonstraram que os alelos E (intermediário) e F (fraco) prevalecem nos animais Saanen e Alpina na França e na Itália, e os alelos A e B aparecem com menor frequência.

A presença do alelo fraco (D) em 100% dos animais, difere do descrito por Grosclaude et al. (1994) que encontraram diferença de 20% entre as proteínas do leite ( $\alpha$ -s1-caseína) obtidos do genótipo forte e fraco.

Comparando os nossos resultados com os de Jordana et al., 1996, observaram-se que com os genótipos nas raças Moxotó e Mestiço do rebanho, do sertão do Moxotó e do Agreste do Médio Capibaribe, se identificaram com os da raça Canária da Espanha na quais os alelos fortes A e B foram mais frequentes.

Os animais nativos Moxotó apresentaram somente os alelos B e D, o mesmo aconteceu com os animais Mestiços, por outro lado, Ricordeau et al. (1999), analisando os alelos da alfa-S1-caseína de cabrinos nativos (Aldudes, Arette Lourdios, Aspe Pau-Aquitaine, Soulor, Bigorre, Nistos Ariège, Chèvres e Boucs) das montanhas dos Pirineus, comprovou que o alelo E foi o mais dominante entre estes animais, com percentual de 51% a 63% em comparação aos alelos A, B, F e O (nulo), onde os alelos A e B estiveram abaixo de 30%. Contudo, o mesmo autor quando analisou a raça nativa francesa Poitevine observou que o alelo predominante foi o B (Ricordeau, et al. 1996 e 2000). Nota-se que existe um polimorfismo maior da  $\alpha$ -s1-caseína nos animais nativos dos Pirineus do que os encontrados dos animais nativos da raça Moxotó do Sertão de Pernambuco.

Nos animais deste estudo, observou-se a ausência do alelo E, o que foi encontrado por Marletta et al. (1999) na raça nativa Girgentana da Sicília e pelo

mesmo autor em animais nativos Argentata na Itália (MARLETTA et al., 2000), que também encontraram uma maior frequência do alelo F (fraco). Da mesma maneira nos animais da raça Moxotó foi encontrado o alelo fraco, porém neste caso foi o D.

Na raça Alpina os alelos identificados foram C e D contrastando com os resultados de Clark e Sherbon (2000), que encontraram polimorfismo da alfa-s1-caseína em animais das raças Alpina, Saanen e Toggenburg e Nubiana identificando os alelos A, B, E e F, onde os alelos E e F foram os predominantes para as raças Alpina e Saanen e o A para Nubiana.

A maior presença de um alelo fraco (D) neste estudo na raça Alpina Americana, corrobora com os resultados de outros autores que observaram o alelo fraco (F) em caprinos na Itália (61,5%) (MEGGIOLARO et al., 2000), e em cabras Vinje e Aas da Noruega, onde demonstraram a presença de alelos fracos em mais de 70% desse rebanho (VEGARUD, et al. (1999).

A presença do alelo fraco nos animais da raça Alpina Americana também já tinha sido observado por Veress et al. (2004) analisando o polimorfismo alfa-S1-caseína das cabras leiteiras Húngaras, Alpina e Saanen, comprovando uma maior frequência dos alelos E (34%) e F (41%) na raça Alpina. No entanto, como já foi mencionado anteriormente, nos animais desse experimento não foi encontrado o alelo intermediário (E).

## CONCLUSÃO

Analisando o polimorfismo da  $\alpha$ -s1-caseína das raças Moxotó, Mestiço e Alpina Americana, através dos resultados obtidos, nas condições em que foi realizada a presente pesquisa nos permitiu chegar as seguintes conclusões:

- 1) A digestão com a enzima Xmn I dos fragmentos amplificados dos DNAs caracterizou o polimorfismo genético característico de cada uma das raças estudadas.
- 2) A presença dos alelos forte e fraco nas raças Moxotó, Mestiço e Alpina Americana, podem conferir um melhor aproveitamento do seu leite para a produção de derivados lácteos.
- 3) Considerando que o alelo D (fraco) é um agente indutor de síntese protéica da  $\alpha$ -s1-caseína em todas as raças estudadas, o seu leite seria o mais indicado para o consumo de pessoas alérgicas.
- 4) A existência do alelo B nas raças Moxotó e Mestiço e do alelo C na Alpina Americana, caracteriza a diferença genotípica entre elas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. **A importância do leite de cabra na nutrição humana**. São Paulo : [Embrapa], 2005. Disponível em: <[http://www.capritec.com.br/artigos\\_embrapa\\_020829a.htm](http://www.capritec.com.br/artigos_embrapa_020829a.htm)>. Acesso em: 23 jan. 2006.

AMBROSOLI, R.; DI STASIO, L.; MAZZOCCO, P. Contento f  $\alpha_1$ -casein and coagulation properties in goat milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill., n. 71, p.24-28, 1988.

ANALLA, M.; ÂNGULO-HERAS, C.; SERRADILLA, J. M. Comparaison de l'effet dès allèles de la caséine  $\alpha_{s1}$  sur lê taux protéique du lait entre deux races caprines et dux milieux. In: ANPA-EAAP-CIHEAM-FAO INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LIVESTOCK PRODUCTION AND CLIMATIC UNCERTAINTY IN THE MEDITERRANEAN, 1998, Agadir (Marocco). **Proceedings ...[s.l]: [s.n]**, 2000. p.247-250. (Publication, 94).

AZEVEDO, C.F. **Criação de caprinos e ovinos no Nordeste**. Natal : EMPARN, 1982. 65 p. (*Boletim técnico*, n.12).

BANDEIRA, D. A. et al. Aspectos gerais da caprino-ovinocultura no Brasil e seus reflexos produtivo e reprodutivo. In: SANTOS, M.H.B. dos; Oliveira, M.A. de ; LIMA, P.F. de (Eds.). **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo : Varela, 2004. p.1-8.

BARBIERI, M.E. et al. Influence du locus de la caséine alpha S1 sur les performances laitières et les parameters génétiques des chèvres de race alpine. **Genetique Selection Evolution**, Versailles, v. 27, n.1, p. 437-450, 1995.

Bevilacqua, C. Et al. Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new alfaS1-casein variant found in the goat species.

**European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.269, p. 1293-1303, Feb. 2002.

BOULANGER, A.; GROSCLAUDE, F.; MAHE, M. F. Polymorphisme des caseínes  $\alpha$ -S1 et  $\alpha$ -S2 de la chevre (*Capra hircus*). **Genetique Selection Evolution**, Versailles, v.16, n.2, p.157-175, 1984.

CARDOSO, J. R. A. **A importância da caprinovinocultura em assentamentos rurais de Mossoró**. 2002. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2002. Disponível em: <<http://romerocardoso.sites.uol.com.br>>. Acesso em: 28 dez. 2005.

CLARK, S.; SHERBON, J. W. Genetic variantes of  $\alpha_{s1}$ -CN in goat milk: breed distribution and association with milk composition and coagulation properties of goat milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 38: p. 123-134, 2000.

CURI, P. R. **Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas**. Botucatu : Tipomic, 1997. 263 p.

DELACROIX-BUCHET. A influence of casein polymorphism on cheese quality. **Revista Argentina de Lactologia**, Buenos Aires, v. 17, p.51-67, 1998.

\_\_\_ et al. Influence des variants AA et FF de la caséine  $\alpha_{s1}$  caprine sur le rendement fromager et les caracteristiques sensorielles des fromages. **Lait**, Les Ulis, v. 76, p.217-241, 1996.

DOMINGUES, O. **À margem da zootecnia: estudos e ensaios**. 1.ed. Rio de Janeiro : Alba, 1942. 384 p.

ELSAYED, S.; HILL, D. J.; DO, T. V. Evaluation of the allergenicity and antigenicity of bovine-milk  $\alpha_{s1}$ -casein using extensively purified synthetic

peptides. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 60, p.486-493, 2004.

FELIGINI, M. et al. Caprine alfaS1-casein polymorphism: characterisation of A, B, E and F variants by means of various biochemical and molecular techniques. **Food Technology**, Chicago, v.43, n.2, p. 123-132, 2005.

FREYRE, G. **Nordeste**: aspectos da influência da cana sobre a vida e a paisagem no Nordeste do Brasil. 5. ed. Rio de Janeiro : J. Olympio ; Recife : FUNDARPE, 1985. 203 p. (Coleção Documentos Brasileiros; v. 4)

GROSCLAUDE, F. et al. Du gène au fromage: le polymorphisme de la caséine  $\alpha$ -s<sub>1</sub> caprine, ses effets, son évolution. **Revista de Produção Animal**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 3-19, 1994.

\_\_\_\_\_ et al. A mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat  $\alpha$ s1-casein. **Genetique Selection Evolution**, Versailles, v.19, n.4, p.399-412, 1987.

GUEGUEN, L. Bioavailability of calcium supplementments. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.65, n 6, p. 1898-1899, 1997.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.51, p.155-163, 2004.

HERSON, E. L. Instuconservation of livestock and poultry. **FAO-UNEP. Animal Production and Health Paper**, p. 99-112, 1992.

IBGE. **Abate de animais, produção de leite, couro e ovos**. Brasília, (s. n.), 2005. Disponível em: <[www.ibge.gov.br/](http://www.ibge.gov.br/)>. Acesso em: 23 jan. 2006.

JORDANA, J. et al. Gene frequencies of caprine  $\alpha$ 1-casein polymorphism in Spanish goat breeds. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 20, p.215-221, 1996.

LÓPEZ-ALIAGA, I. et al. Goat milk feeding causes an increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats. **Journal Dairy Science**, Champaign, Ill., v. 88, p. 1024-1030, 2005.

MAHÉ, M.F. et al. Effet des variants de la caséine  $\alpha$ 1 sur les performances laitières: analyse intradescendance de boucs de race Alpine. **Genetique Selection Evolution**, Versailles, v. 26, p. 151-157, 1994.

McCULLOUGH, F. S. W. Nutritional evaluation of goat's milk. **British Food Journal**, Bradford, v. 105, n. 4/5, 2003.

MANFREDI, E. et al. Effects des variants de la caséine  $\alpha$ S1 sur les performances laitières de chèvres. **Lait**, Les Ulis, v.73, p.567-572, 1993.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F; SAMBROOK, J. (Eds.) **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 v.

MARLETTA, D. et al. Analisi genomica ai loci delle caseine  $\alpha$ 1 e  $\beta$  nella razza caprina Girgentana. In: CONGRESSO S.I.S. VET., 53., 1999, Montecatini Terme. **Proceedings...** Mtecatini Terme : (s. n.) , 1999. p-395-396.

\_\_\_\_\_ et al. The argentata dellétna goat population: analysis of the polymorphism of  $\alpha$ 1- and  $\beta$ -caseins. **Zootécnica e Nutrizione Animale**, Rome, v.26, n. 3, p. 153-156, 2000.

MARTIN, P. **La composition protéique du lait de chèvre: ses particularités**. Actes du colloque: le lait de chèvre, un atout pour la santé. Paris : Institut National de la Recherche Agronomique, 1997. p. 27-50. (INRA Editions, n. 81).

\_\_\_\_; OLLIVIER-BOUSQUET, M.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of caseins: a tool to investigate casein micelle organization. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, p. 163-171, 1999.

MEGGIOLARO, D. et al. Preliminary study on alphas1-casein polymorphism in Val di Livoro goats. **Zootécnica e Nutrizione Animale**, Rome, 26, n.3. p.149-152, 2000.

MÉTAIS, P. et. Exploration biochimique du tissu conjonctif et de l'inflammation. In: \_\_\_\_\_. **Biochimie clinique: biochimie fonctionnelle**. Paris : Simep, 1988. t.3, p. 212-259.

MUNOZ MARTIN, T. Selective allergy to sheep's and goat's milk proteins. **Allergol et Immunopatho**, Madrid, v. 32, n.1, p. 39-42, 2004.

NOUAILLE, S. et al. Improvement of bovine B-lactoglobulin production and secretion by *Lactococcus lactis*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.38, p. 353-359, 2005.

NG-KWAI-HANG, K.F. Genetic polymorphism of milk proteins: Relationships with production traits, milk composition **Canadian Journal of Animal Science, and technological properties**. Ottawa, v.78, p.131-147, 1998. Suppl.

NUNES, J. F: Cabras podem render muito mais leite no Nordeste. **Dirigente Rural**, São Paulo, v. 26, n. 10, p.37-40, out. 1987.

PINA, D. I.; CARNICE, R. T.; ZANDUETA, M. C. Empleo de leche de cabra em pacientes com alergia a lãs proteínas de la leche de vaca. **Anales de Pediatría**, Barcelona, v. 59, n. 2, p.138-142, 2005.

PIZZILLO, M. et al. Effect of breed, casein polymorphism and feeding system on casein number of individual goat milk. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, Parma, v. 47, p. 305-315, 1996.

RAMUNNO, L. Et al. Characterization of two new alleles at the goat CSN1S2 locus. **Animal Genetics**, Oxford, v. 32, p.264-268, 2001.

\_\_\_\_\_. Comparative analysis of gene sequence of goat CSN1S1 F and N alleles and characterization of CSN1S1 transcript variants in mammary gland. **Gene**, Amsterdam, v. 345, p. 289-299, 2005.

\_\_\_\_\_. The goat alfaS1-casein gene: gene structure and promoter analysis. **Gene**, Amsterdam, v. 334, p. 105-111, 2004.

\_\_\_\_\_. Identification of the goat CSN1S1 allele by means of PCR\_FRLP method. **Animal Genetics**, Oxford, p 31, p.333-346, 2000.

REMEUF, F. Influence du polymorphisme génétique de la caséine alpha S1 caprine sur lês caractéristiques physico-chimiques et technologiques du lait. **Lait**, Les Ulis, v. 73, p. 549-557, 1993.

RIBEIRO, F. L. **A importância das cabras mestiças na produção de leite.**

Bahia : (s.n.), 2004. Disponível em:  
<[http://www.accoba.com.br/ap\\_info\\_dc.asp?idInfo=324&idCategoria=1](http://www.accoba.com.br/ap_info_dc.asp?idInfo=324&idCategoria=1)>.

Acesso em: 28 dez. 2005.

RIBEIRO, S. D. DE A. **Caprinocultura: criação alpina americana.** São Paulo : (s. n.), 2006. Disponível em: <<http://www.bodeonline.com.br/alpinaa.asp>>.

Acesso em: 10 jan. 2006.

RICORDEAU, G. et al. Fréquence dês allèles de la caséine alphas1 em race Poitevine. **Animal Genetic Resources Information**, Rome, v. 17, p. 103-108. 1996.

\_\_\_\_\_. Fréquences alléliques dês caséines chez lês chèvres dês Pyrénées. Cãs particulier de la caséine  $\beta$  nulle. **INRA Productions Animales**, Castanet-Tolosan, v. 12, n. 1, p. 29-38, 1999.

\_\_\_\_; MANFREDI, E.; AMIGUES, Y. Effets du locus de la caséine  $\alpha$ 1 sur les performances laitières des chèvres Poitevines. In: INTERNACIONAL CONFERENCE ON GOATS, 7., 2000, Tours. **Proceedings...** Tours : (s.n.), 2000. p. 249-251.

RONCADA, P. et al. Identification of caseins in goat milk. Short communication. **Proteomics**, Weinheim, v. 2, p. 723-726, 2002.

SÁNCHEZ, A. et al. Potential benefit from using the alfaS1-casein genotype information in a selection scheme for dairy goats. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 122, p. 21-29, 2005.

SIMPLÍCIO, A.A., RIEIRA, G.S., NUNES, J.F. **Puberdade em fêmeas ovinas da raça Somalis**. Sobral : EMBRAPA/CNPC, 1981. 57 p. (Pesquisa em andamento, n.4).

SOUZA NETO, J. **Características gerais da caprinocultura leiteira no Estado de Pernambuco**. Sobral : EMBRAPA/CNPC, 1987. (Boletim de pesquisa n.4).

VASSAL, L.; DELACROIX-BUCHET, A.; BOUILLON, J. Influence des variants AA, EE, et FF de la caséine  $\alpha$ 1 caprine sur le rendement fromager et les caractéristiques sensorielles des fromages traditionnels: Premières observations. **Lait**, Les Ulis, v. 74, p. 89-103, 1994.

VEGARUD, G. E. et al. Caseins and caseinates: structures, interactions, networks. **International Dairy Journal**, Barking v.9, n. 3-6, p. 367-368, 1999.

VERESS, GY. et al. Polymorphism of the  $\alpha$ 1-casein, k-casin and  $\beta$ -lactoglobulina genes in the Hungarian Milk Goat. **South African Journal of Animal Science**, Pretoria, v.34, n.1, p.20-23, 2004.

WAL, J. M. Structure and function of milk allergens. **Allergy**, Copenhagen, v. 56, suppl. 67, p. 35-38, 2001.

YAHYAOU, M. H. et al. Polymorphism in the goat  $\beta$ -lactoglobulin proximal promoter region. **Journal Animal Science**, Champaign, v.78, p.1100-1101, 2000.