

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA - PDIZ**

**Estudo do Polimorfismo da Kappa- Caseína e Alfa-Lactoalbumina em Bovinos
Girolando do Brasi e Siboney de Cuba**

SORAYA FARIAS DE ANDRADE FREITAS

**UFRPE-RECIFE
JULHO DE 2013**

SORAYA FARIAS DE ANDRADE FREITAS

Estudo do Polimorfismo da Kappa- Caseína e Alfa-Lactoalbumina em Bovinos Girolando, do Brasil e Siboney, de Cuba

Tese apresentada ao programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal

Comitê de Orientação:

Prof. Severino Benone Paes Barbosa

Prof. Manoel Adrião Gomes Filho

Prof. Kleber Régis Santoro

**UFRPE-RECIFE
JULHO DE 2013**

Ficha catalográfica

F866e Freitas, Soraya Farias de Andrade
Estudos do polimorfismo da kappa-caseína e alfa-lactoalbumina em bovinos girolando, do Brasil, e siboney, de Cuba / Soraya Farias de Andrade Freitas. – Recife, 2013.
59 f. : il.

Orientador: Severino Benone Paes Barbosa.

Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco / Universidade Federal da Paraíba / Universidade Federal do Ceará. Departamento de Zootecnia da UFRPE, Recife, 2013.

Referências.

1. Proteínas lácteas 2. Polimorfismo 3. Bovinos I. Barbosa, Severino Benone Paes, orientador II. Título

CDD 636.082

SORAYA FARIAS DE ANDRADE FREITAS

Tese intitulada **Estudo do Polimorfismo da Kappa- Caseína e Alfa-Lactoalbumina em Bovinos Girolando do Brasil e Siboney de Cuba.**

Defendida e aprovada em 17/07/2013, pela Banca Examinadora.

Orientador:

Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa
(UFRPE)

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Maria de Mascena Diniz Maia
(UFRPE)

Prof. Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz
(UPE)

Prof. Dr. Paulo Eleutério de Souza
(UFRPE)

Prof. Dra. Maria Norma Ribeiro
(UFRPE)

**RECIFE
2013**

Sumário

1. Introdução Geral	12
2. Revisão de Literatura	14
2.1 Caseínas	15
2.2. Polimorfismo Molecular e caracterização genética	19
2.3 Kappa-Caseína	23
2.4. Efeito dos Polimorfismos da K-cn e Alfa-La	25
2.4.1 Polimorfismos da Kappa-Caseína e seus efeitos	26
2.4.2 Polimorfismos da alfa-lactoalbumina	29
3. Referências Bibliográficas	34
4. Capítulo II	43
Introdução	44
Material e métodos	46
Resultados e Discussões	48
Conclusões	53
Perspectivas	53
Agradecimentos	53
Referências Bibliográficas	54
5. Capítulo III	55
Introdução	57
Material e Métodos	59
Conclusões	63
Referências Bibliográficas	64

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Resultados do estudo evolutivo das frequências alélicas da Alfa-Lactoalbumina na espécie bovina.....	31
Tabela 2.	Estudo das frequências alélicas do gene da Alfa-Lactoalbumina em rebanhos bovinos da Alemanha, Polônia e México.....	32
Tabela 3.	Resultados das frequências alélicas do gene da Alfa-Lactoalbumina na espécie bovina na Ásia e Caribe.....	33
Tabela 4.	Resultados das frequências alélicas do gene da Alfa-Lactoalbumina na espécie bovina na Ásia e Caribe.....	49
Tabela 5.	Distribuição das proporções genótípicas e frequências alélicas da alfa-lactoalbumina na produção de Girolando, dos municípios de Arcoverde e Itambé.....	50
Tabela 6.	Distribuição das proporções genótípicas e frequências alélicas da alfa-Lactoalbumina na população Girolando, dos municípios de Arcoverde e Itambé, estado de Pernambuco, Brasil.....	52
Tabela 7.	Frequências genótípicas e alélicas do gene da Kappa-caseína em populações Holando-Gir do Estado de Pernambuco.....	62

Lista de Figuras

- Figura 1.** Gel de agarose 2,0%, fragmento de DNA amplificado (583pb) mostrado nas linhas 2 a 8, contendo o gene da alfa-Lactoalbumina bovina, da região 5' (UTR) e éxol.....48
- Figura 2.** Gel de agarose 4,0%, padrão eletroforético obtido pela digestão da endonuclease *MspI*. Região do fragmento gênico da α -Lactoalbumina bovina, localizado na região 5' (UTR) e éxon I. 49

BIOGRAFIA DA AUTORA

SORAYA FARIAS DE ANDRADE FREITAS, filha de Dejanete Francisca de Andrade Freitas, natural de Abreu e Lima – PE, iniciou o curso de graduação em Zootecnia pela Universidade Federal Rural do Pernambuco – UFRPE, no ano de 2003. Iniciou o curso de Licenciatura em Ciências Agrícolas em 2005 na mesma instituição de ensino. Em Dezembro de 2007 concluiu a graduação em Zootecnia, ingressando em março do ano seguinte no Mestrado, área de concentração Produção Animal, ao passo que em julho de 2008 concluiu o curso de Licenciatura em Ciências Agrícolas. Em Fevereiro de 2010 obteve o título de mestre e iniciou no mesmo ano o Doutorado, concluindo uma Especialização em Biologia Molecular pela Universidade de Pernambuco - UPE em Dezembro do mesmo ano. Em Fevereiro de 2013 iniciou carreira de docente na Universidade Federal do Amazonas-UFAM, concluindo em Julho o Doutorado em Zootecnia.

“Se não podemos, em boa fé, negar a evolução, contar como essa se deu, ou se opera, já é difícil, senão por vezes impossível, sem lançarmos mão de hipóteses...”

Otávio Domingues (1960)

À minha mãe,

Dejanete Francisca de Andrade Freitas, por ser o oxigênio que eu respiro.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor imenso reservado a mim.

À minha maior orientadora, minha mãe, por ser minha vida.

Ao meu Orientador, Prof. Severino Benone Paes Barbosa, pela confiança e incentivos concedidos para desempenhar este trabalho, além do bom humor em todos os momentos da orientação.

Aos meus co-orientadores, Prof. Manoel Adrião Gomes Filho e Prof. Kléber Régis Santoro, por toda orientação, paciência e preocupação dispensada desde o início desta pesquisa.

Ao Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) por toda atenção e estrutura para pesquisa.

Aos amigos de infância Fabiana Felix, Gileade Espindola, Renata Ferreira e Méssia Auxiliadora, por serem até hoje minha fonte de energia em todos os momentos.

Aos amigos do Departamento de Zootecnia, em especial Rosália de Barros e Juliana Neves (pelo amor de irmãs) e Leandro Fragoso.

Aos irmãos cubanos por todo o carinho e atenção em todas as vezes que fui até a linda Ilha de Cuba. Minha família caribenha.

Ao Dsc. Júlio César Vieira de Oliveira (IPA Arcoverde) e ao Médico Veterinário Dr. Clécio de Queiroz (IPA Itambé) por permitirem o andamento desta pesquisa e pela excelente comunicação.

A todos os funcionários do IPA, pelo excelente desempenho na execução das colheitas de sangue.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq - Pela concessão da bolsa de estudos e financiamento da pesquisa.

A Capes pela concessão das bolsa de intercâmbio à Cuba, assim como pelo financiamento da pesquisa.

1. Introdução Geral

O leite é um alimento de importância nutricional e funcional para todas as fases da vida, entretanto, de todos os constituintes, os componentes gordura e proteína são considerados os de maior valor econômico dentro dos programas de pagamento de leite por qualidade. Esse fato sugere uma maior importância dada a esses constituintes pelos principais atores da cadeia produtiva leiteira dentro do cenário econômico (MADALENA, 2000).

Dürr (2004) relata que as concentrações de gordura e proteína do leite variam principalmente em função do manejo nutricional e potencial genético dos animais. Desta forma, como principal fator de variação têm-se os efeitos das diferenças genéticas responsáveis pela variação de 25% do total da produção de leite e 50% nas variações dos teores de gordura, proteína e sólidos não gordurosos (GONYON et al., 1987). Segundo Bonfatti et al. (2010), estima-se que a variância genética aditiva para as características de composição do leite encontra-se entre 14 e 39% da variância total.

Com relação aos polimorfismos dos genes que codificam as principais proteínas do leite, como as caseínas, β -Lg e α -La, estes se tornaram marcadores de interesse na produção, composição e beneficiamento do leite. São excelentes modelos de compreensão do comportamento da matéria prima láctea durante o

processo industrial, já que estão intimamente relacionados à fração caseínica do leite, principal porção proteica envolvida com o alto rendimento na produção de queijos e demais derivados. Além disso, os polimorfismos genéticos das proteínas lácteas são frequentemente utilizados para a caracterização de diversas raças de produção animal (CAROLI et al., 2010).

Deste modo, para promover melhorias na genética das características de produção, composição e beneficiamento do leite, pesquisas no ramo da biologia molecular têm possibilitado realizar o mapeamento e identificação em nível genômico, transcriptômico e proteômico dos polimorfismos que contribuem para variações na composição do leite facilitando, desta forma, o processo de seleção dos animais em programas de melhoramento genético.

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi estudar os polimorfismos genéticos da kappa-caseína e alfa-lactoalbumina em bovinos das raças Girolando e Siboney.

2. Revisão de Literatura

2.1. Caseínas: Polimorfismos e caracterização genética

De acordo com Wong et al. (1996), a importância das proteínas lácteas deve-se a diversos fatores, porém, os aspectos nutricionais e tecnológicos têm maior destaque, já que proporcionam vantagens aos consumidores e à indústria. Tais como a solubilidade, absorção e retenção de água e de gordura, capacidade emulsificante e estabilidade das emulsões, capacidade espumante e estabilidade da espuma, geleificação, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis, formação de micropartículas, melhoria nas propriedades sensoriais e na aceitação dos produtos (MODLER, 2000).

Os polimorfismos dos genes que codificam as principais proteínas do leite, como as caseínas, β -Lg e α -La tornaram-se marcadores de interesse na produção, composição e beneficiamento do leite, por serem excelentes modelos de compreensão do comportamento da matéria prima láctea durante o processo industrial, já que estão intimamente relacionados à fração caseínica do leite, principal porção proteica envolvida com o alto rendimento na produção de queijos e demais derivados (EMMONS et al., 2003). Além disso, os polimorfismos genéticos das proteínas lácteas são frequentemente utilizados para a caracterização de diversas raças de interesse zootécnico (CAROLI et al., 2010).

Alguns marcadores estão disponíveis e/ou bastante próximos da aplicação comercial nos rebanhos leiteiros e na indústria de produtos lácteos, como é o caso das caseínas. Diante destes fatos, o objetivo desta revisão é de congregação informações acerca das principais caseínas (α_{s1} , β e k-caseína), seus polimorfismos, e efeitos destes sobre as características de produção de leite e atuação como alimentos nutracêuticos para humanos.

2.1. Caseínas

Segundo Sgarbieri (1996), as proteínas lácteas são divididas em quatro grupos: caseínas, proteínas do soro, proteínas das membranas dos glóbulos de gordura e enzimas. Todavia, as caseínas e proteínas do soro são mais destacadas nos estudos pelo fato de estarem diretamente relacionadas aos diferentes desempenhos produtivos da matéria prima láctea em toda trajetória dos sistemas produtores e beneficiadores de leite.

Em um estudo comparativo realizado entre composições do leite bovino e humano observou-se que no leite de vaca as porcentagens de caseína e proteína do soro são em torno de 80 e 20%, respectivamente, enquanto no leite humano observou-se que essa relação é inversa (BOUNOUS et al., 1988).

As caseínas são moléculas constituídas por água e sais em forma de fosfocaseinato de cálcio que apresentam uma estrutura em forma de micela (Hurley, 2002), concentradas na fração coloidal do leite (BEVILACQUA et al., 2006). As micelas de caseína foram descobertas em 1929 pelos pesquisadores Linderström e Lang, sugerindo que a micela consiste em um complexo coloidal de proteínas

insolúveis na presença do íon Ca^{++} , que objetivam fornecer estabilidade à micela (MORENO et al., 2000).

Algumas frações caseínicas são glicosiladas (BREW HILL, 1975), além disso, esta micela é formada por subunidades esféricas que agregam outras moléculas de caseína como a α_{s1} , α_{s2} , β e κ caseína, que são mantidas em sua maioria por ligações hidrofóbicas e pontes salinas (WALSTRA, 1990). As subunidades das caseínas ainda são divididas em variantes, que são originárias de alterações ocorridas a nível genômico, que para padronização desta revisão serão denominadas de polimorfismos.

As micelas de caseína possuem alta habilidade de separar-se dos demais componentes do leite, o que as torna importante fração para digestão no estômago e intestino de lactantes e a base para fabricação de diversos produtos lácteos na indústria (JENSEN, 1995).

As caseínas podem ser obtidas a partir da sua separação do soro do leite e, segundo Sgarbieri (2005), existem diversos métodos que podem ser utilizados em laboratório ou nos laticínios para esta finalidade. Pode ser realizada pela centrifugação do leite desnatado a 37°C e, também, por precipitação no pH isoelétrico (pH 4,6, 20°C). Entretanto, a coagulação pela ação de enzimas proteolíticas (quimosina e pepsina) é o método mais empregado comercialmente, sendo utilizado no processo industrial de fabricação de queijos.

A síntese das caseínas ocorre a partir da absorção de aminoácidos através da membrana basal da célula por vários sistemas específicos de transporte na glândula mamária. Uma vez dentro da célula, os aminoácidos são unidos por ligações covalentes aos lipossomos do retículo endoplasmático rugoso para formar a caseína (HURLEY, 2002). No complexo de Golgi as diferentes caseínas se integram

com moléculas simples, íons de cálcio e fósforo, formando as micelas (ORDÓÑEZ, 2005).

O complexo da caseína revela a seguinte composição: 53% de carbono; 7,05% de hidrogênio; 16,65% nitrogênio; 0,76% de enxofre e 0,85% de fósforo (SGARBIERI, 1996). Como a caseína contém mais que 16% de nitrogênio, o fator de conversão deverá ser 6,38 e não 6,25 como em outros componentes proteicos (SGARBIERI, 1996).

Quanto à conformação estrutural das caseínas, as frações α_{s1} e β possuem baixo grau de estrutura secundária em alfa hélice, e menos de 10% de sua estrutura apresenta conformação em forma de folhas β . Este fato deve-se ao elevado teor do aminoácido Prolina (aproximadamente 8,5%), que é distribuído uniformemente ao longo da cadeia polipeptídica e possui a propriedade de interromper a continuidade da estrutura secundária, mais especificamente da alfa hélice (DICKINSON, 1999; Sgarbieri, 2005).

A falta da estruturação secundária e terciária torna as caseínas mais susceptíveis à desnaturação e contribui para sua elevada atividade de superfície, o que lhes confere boa capacidade de formação de espumas e emulsões e facilita a proteólise (SGARBIERI, 1996).

Apenas as caseínas α_{s2} e k contêm os aminoácidos cisteína e, esse resíduo de aminoácido forma pontes dissulfeto intermoleculares. A ausência de cisteína nas caseínas α_{s1} e β proporciona flexibilidade nestas moléculas (DICKINSON, 1999).

As caseínas contêm um número diversificado de radicais fosfatos, ligados ao aminoácido Serina ao longo do polipeptídio, formando as em fosfoproteínas. Este fato resulta em regiões mais hidrofílicas na presença do resíduo fosforilado ou mais hidrofóbicas em sua ausência (PEREDA et al., 2005).

A presença dos radicais inorgânicos fornece funcionalidade biológica às caseínas, a partir do fornecimento de fosfato (PO_4) e cálcio (Ca^{2+}) para mineralização de alguns tecidos e provimento de aminoácidos essenciais na formação de peptídeos com atividade biológica (RASMUSSEN et al., 1999).

Demais funcionalidades do coágulo de caseína e os caseinatos de sódio e cálcio estão relacionados a produtos de panificação, sobremesas, sopas, pós para bebidas, suplementos alimentares para atletas e crianças, elaboração de emulsões e coberturas. Na elaboração de queijos, a utilização de coágulo de caseína e de caseinatos resulta em melhor hidratação e rápida dispersão dos componentes, levando a uma melhor textura do produto final. Além destas e de outras aplicações alimentícias, o caseinato de sódio pode ser utilizado na manufatura de papéis e adesivos (HUFFMAN; HARPER, 1999; KRUGUER et al., 2002).

Do ponto de vista nutricional, as proteínas do leite, mais especificamente as caseínas, possuem um Quociente de Eficiência Proteica (QEP) elevado, fato que resultou no título de proteína referência, já que apresenta um QEP acima de 2,5 e o caseinato de sódio apresenta um QEP de 2,6 (MING, 2000). Um estudo de avaliação nutricional do caseinato de sódio e do coágulo de caseína produzidos no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas), revelou valores de QEP de 3,15, para o caseinato de sódio, e de 3,65, para a caseína coagulada enzimaticamente (BORGES et al., 1999).

Além das caseínas como produto de coagulação do leite, os hidrolisados desta fração proteica também têm sido utilizados como suplementos proteicos na elaboração de dietas para alimentação de bebês e adultos com alguma enfermidade têm sido usadas na formulação de dietas de baixa alergenicidade para lactentes e lactantes, suplementação para atletas ou praticantes de atividades físicas, dietas

para idosos e controle de peso (CANDIDO; SGARBIERI, 2003).

Devido a esses benefícios, a produção comercial dos hidrolisados de caseína teve seu início ainda na década de 70, a partir do emprego do caseinato de sódio como a matéria prima mais utilizada. Outras aplicações dos hidrolisados podem estar relacionadas ao seu uso para correção de erros metabólicos congênitos, como na fenilcetonúria, em que ocorre a remoção dos aminoácidos aromáticos. Além destas aplicações, devido à sua alta solubilidade, digestibilidade e boa absorção intestinal, os hidrolisados caseínicos podem ser utilizados em pacientes com baixa atividade gastrointestinal, a exemplo da doença de Crohn, que é uma inflamação crônica do trato gastrointestinal (NEKLYUDOV et al., 2000; VIOQUE et al., 2001; PACHECO et al., 2002; CANDIDO; SGARBIERI, 2003).

Em função dos diversos campos de atuação das caseínas e de seus subprodutos fazem-se necessários estudos que identifiquem os polimorfismos destas em nível molecular, para que se possa proceder seleção no sentido desejado.

2.2. Polimorfismo Molecular e Caracterização Genética das Caseínas

A base molecular do polimorfismo das proteínas do leite consiste na substituição ou supressão de aminoácidos na estrutura primária da cadeia polipeptídica, geradas pelas mudanças de nucleotídeos na sequência dos genes que codificam as frações caseínicas (MEDRANO, 1992). Também influencia em parte, nas propriedades das proteínas, melhorando as características físico-químicas queijeiras do leite (MARTIN et al., 2002).

As caseínas do leite bovino são codificadas por genes altamente polimórficos, e a nível genômico caracterizam-se por várias mutações, com até 47 variantes destas proteínas já identificadas até o momento. Têm sido utilizadas em estudos de ligações com a descrição de *clusters* de polimorfismos estudados há mais de 30 anos, com aplicação voltada ao melhoramento genético animal (CAROLI et al., 2009). Os polimorfismos genéticos são constantemente associados às características de interesse zootécnico, como o peso em determinada fase de desenvolvimento do animal, genótipos superiores para a produção e composição do leite, mapeamento genômico, além de serem utilizados para detecção de genótipos resistentes à doenças (PAZ et al., 2004); REGITANO; COUTINHO, 2001).

Os polimorfismos, que podem ser utilizados para caracterização genética, permitem avaliar a distância entre as populações em estudo e podem ser uma ferramenta útil na seleção dos animais a serem utilizados na conservação *ex situ* e *in situ*, mediante estimação de índices de similaridade entre os indivíduos em estudo (SPRITZE et al., 2003). Além disso, permite a formação de acasalamentos que sejam favoráveis para que se mantenha máxima variabilidade genética (EGITO et al., 2001). Além do mais, essas variantes proteicas estão envolvidas em vários aspectos da nutrição humana, a exemplo da associação de casos alergênicos com ingestão de caseínas, o que exige a seleção de animais para teor reduzido desta fração proteica. Por outro lado, se o objetivo for a fabricação de queijos ou demais derivados, a seleção deve ser a favor de animais com maior valor genético esta fração. Também atua na atividade biológica de peptídeos liberados na digestão das proteínas do leite, que pode ser afetada pela troca de aminoácidos ou supressões oriundas de mutações genéticas (CAROLI et al., 2009).

Marcadores moleculares definem-se como qualquer fenótipo a nível molecular

proveniente de uma região do genoma expressa, como no caso das isoenzimas (polimorfismo protéico) ou uma sequência específica de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; OLIVEIRA; CURI, 2008).

Portanto, técnicas em biologia molecular vêm sendo utilizadas através do uso de marcadores moleculares, que permitem a determinação do potencial de um animal com maior precisão, uma vez que estas características não são afetadas pelo ambiente e podem ser utilizadas precocemente, inclusive na fase embrionária (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

A tipificação do gene da caseína tem sido realizada já há algum tempo em embriões bovinos, utilizando a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), a partir de pequenas quantidades de DNA e digestão com enzimas de restrição (OSTA et al., 1993).

As caseínas se comportam como uma unidade genética, na qual a combinação de alelos (haplótipos) pode ser uma característica peculiar de uma raça e utilizada como uma ferramenta ou marcador genético (LIEN; ROGNE, 1993; FORMAGGIONI et al., 1999).

Dentro do genoma bovino, os polimorfismos das caseínas compreendem um importante grupo de marcadores, localizados no cromossomo 6, dentro de uma região de 250kb, desde o ponto de início da transcrição da α_{s1} , 5', até o extremo 3' do gene da k-cn (GALLAGHER et al., 1994; RIJNKELS et al., 1997), obedecendo a seguinte ordem de sequência: α_{s1} , β , α_{s2} e k (FERRETTI et al., 1990; THREADGILL; WOMACK, 1990; LIEN; ROGNE, 1993). A ordem das caseínas está conservada evolutivamente, fato este demonstrado por trabalhos em ratos e humanos (RIJNKELS et al., 1997).

A estrutura e expressão dos genes das proteínas lácteas têm sido pesquisadas pelo menos em 10 espécies, incluindo os ruminantes. A sequência de nucleotídeos de muitos mRNA e genes tem sido descrita por diversos autores (THREADGILL; WOMACK, 1990; VILLOTE et al., 1993; BLECK; BREMEL, 1993; PROVOT et al., 1995).

A expressão dos genes das frações caseínicas é controlada pelos hormônios da lactogênese, aparentemente os mRNA das caseínas, não são traduzidos com a mesma eficiência. Todavia, alguns pesquisadores observaram a partir dos dados de qPCR, que as quatro transcrições das caseínas ocorreram ao mesmo nível, exceto para o polimorfismo defeituoso da α_{s1} .

Entretanto, a eficiência da tradução das frações caseínicas no tecido mamário mostrou que α_{s1} e β são traduzidas três a quatro vezes mais que α_{s2} e k , o que parece ser regra geral para as três principais espécies estudadas de ruminantes (caprina, ovina e bovina). Em outros estudos, a distribuição das caseínas é observada na proporção de 4:1:4:1 para α_{s1} , α_{s2} , β e k , respectivamente (BEVILACQUA et al., 2006).

Dentro do contexto das ferramentas moleculares no auxílio do processo de caracterização genética, este fato apenas foi possível a partir da descoberta das endonucleases de restrição, que clivam a molécula de DNA em sítios específicos denominados de Sítios de Restrição (4 a 8 pb) (REGITANO; COUTINHO, 2001). Em função das diferentes localizações destes sítios ao longo da sequência de DNA, ocorre a fragmentação desta em tamanhos diferenciados quando submetida à digestão, o que constitui o polimorfismo genético denominado, Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA,

1995; REGITANO; COUTINHO, 2001; BORÉM; CAIXETA, 2009). As diferenças nos padrões de digestão das endonucleases podem ser visualizadas nos diferentes sistemas de eletroforese (agarose, amido, poliacrilamida).

Os efeitos destes polimorfismos nas propriedades do leite pode ser um efeito biológico direto sobre suas propriedades ou um efeito quantitativo na variação da taxa de síntese de uma determinada proteína. A caracterização dos genes das proteínas lácteas em rebanhos das regiões tropicais tem servido para conhecer os efeitos sobre o crescimento do bezerro e a relação da composição de gordura e proteínas do leite sobre a produção láctea (BALIEIRO, 2000; FARIA et al., 2000; MACHADO et al., 2003; DOBICKI et al., 2002).

As informações dos polimorfismos genéticos combinadas às técnicas tradicionais de seleção em programas de melhoramento genético animal, denomina-se Seleção Assistida por Marcadores – SAM (OLIVEIRA; CURI, 2008). Esta modalidade de seleção deve ser acompanhada dos dados de controle leiteiro para uma maior acurácia dos resultados.

2.3 Kappa-Caseína

É uma glicoproteína com a região carboxiterminal da sequência primária solúvel em fase soro denominada Glicomacroproteína (GMP), e uma região de sequência primária de natureza não polar orientada para o interior da micela designada para-k-caseína (PRATA, 2001).

A k-cn é constituída por 169 resíduos de aminoácidos com peso molecular de pouco mais de 19 kDa. Difere das demais caseínas no número de grupos fosfatos fixados à molécula e em sua glicosilação. Representa 13% do total das caseínas e

sua concentração no leite é de 3,5g/L (GROSCLAUDE, 1988).

A estrutura secundária da k-cn é constituída por 23% de α hélice, 31% de folhas β , 24% de alça β e 22% de estrutura aleatória, sendo a mais fosforilada das caseínas, a qual não precipita na presença do Ca^{++} em pH neutro. Com estas peculiaridades, a principal característica da fração kappa é que constitui a capa externa da micela da caseína e, portanto, é responsável por múltiplas interações com o meio, o qual contém consequências imediatas no estado físico do leite (SWAISGOOD, 1975; EIGEL et al., 1984). A k-cn atua como estabilizadora da micela, fato que justifica sua localização na superfície, evitando que as frações α e β precipitem (PRATA, 2001; SGARBIERI, 1996; SGARBIERI, 2005).

No processamento do leite para manufatura de queijos é necessário que ocorra a hidrólise enzimática ou tratamento térmico da micela. Isso resulta na dissociação da k-cn da superfície micelar, eliminando, desta forma, a estabilidade eletrostática e aumentando a hidrofobicidade da superfície, o que leva à agregação das submicelas e formação do coágulo (SGARBIERI, 1996; SGARBIERI, 2005).

O coalho ou quimosina hidrolisa a ligação peptídica entre os resíduos 105 e 106 da k-cn, produzindo a molécula de GMP, a qual é dissolvida na fração de soro. O GMP é formado durante o processo de fabricação de queijo. A região C-terminal da molécula contém os resíduos 105-106 de k-cn. O GMP constitui entre 10 e 15% da proteína de soro processado por microfiltração/ultrafiltração (GERDES et al., 1999).

Atualmente foram descritas variantes genéticas da k-cn pela técnica de reação em cadeia da polimerase associada à técnica de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição, PCR-RFLP e 10 alelos deste gene já foram identificados. Entretanto, os mais frequentes são o A e B, que são mutações

pontuais no exon IV e diferem nos aminoácidos nas posições 136 e 148, onde a variante A exibe uma Treonina na posição 136 oriunda do código genético ACC, e Asparagina na posição 148 proveniente do códon GAT. No entanto, a variante B apresenta na posição 136 Isoleucina (códon ATC) e Alanina na posição 148, códon GCT (MERCIER et al., 1973; RACHAGANI; GUPTA, 2008).

Os demais polimorfismos aparecem raramente e se diferenciam na substituição de diversos aminoácidos (NG-KWAI-HANG et al., 1991; KLAUSZINSKA et al., 2001). Schlieben et al. (1991) descreveram a sequência da variante E, depois de ter sido identificada por PCR-RFLP, o que proporciona a diferenciação direta entre esta e as variantes A e B. A partir do exposto, pôde-se observar que a diversidade genômica e proteica dos genes em estudo e sua vasta área de atuação, essa importância que será então limitada nesta revisão nível do efeito do polimorfismo proteico sobre os parâmetros de produção, composição e tecnologia do leite.

2.4 Efeito dos Polimorfismos da Kappa-Caseína e Alfa-Lactoalbumina Sobre Características de Produção de Leite

Os diversos polimorfismos genéticos das caseínas (α_{s1} , β , α_{s2} e k) são associados constantemente aos diferentes desempenhos do leite na produção dos lácteos, a partir da composição do leite e propriedades de processamento, com destaque para produção de queijos (SAUBOR et al., 1993).

Wedholm et al. (2006) afirmaram que propriedades de produção de queijo podem ser melhoradas pela seleção de leite com alta concentração das frações proteicas β e k -cn e alta proporção desta última em relação a caseína total. Heck et

al. (2009) concluíram que a seleção para o polimorfismos A2 da β -cn e B da k-cn resultará em vacas que produzem leite mais adequado para a produção de queijos.

2.4.1 Polimorfismos da Kappa-Caseína e seus efeitos sobre características de produção de leite

Com relação a k-cn, vários são os estudos realizados com o intuito de confirmar a associação dos seus polimorfismos genéticos com as características de produção de leite e beneficiamento de produtos lácteos. Foi detectada variação na região 5' do gene da k-cn relacionada com sítios de regulação potencial e possivelmente envolvida na expressão deste gene, o que sugere a diferença na expressão dos alelos A ou B da k-cn relacionada com alguma destas mutações (KAMINSKI, 1996).

Debeljak et al. (2000) se referem a expressão do controle pós-transcricional como a razão que determina as diferenças no conteúdo desta proteína no leite (k-cn). Tem-se encontrado outra região polimórfica relacionada a um sítio SINE (Short Interspersed Elements) no intrón II do gene (DAMIANI et al., 2000). Porém, resultados esclarecedores ainda não foram publicados.

McLean et al. (1984) identificaram que os polimorfismos da k-cn afetaram a concentração e proporção da fração k (BB superior a AB, maior que AA) e na fração da caseína α_{s1} (AA superior que AB>BB) de amostras de leite de vacas da raça Holandesa. O fenótipo BB da k-cn proporcionou um aumento de 0,13% na produção de proteína quando comparado aos fenótipos AA e AB, sendo este último o fenótipo intermediário (NG-KWAI-HANG et al., 1984). Em outra pesquisa, Ng-Kwai-Hang et al. (1987) observaram que o leite de vacas k-cn genótipo BB continha mais da fração α_{s1} e k e menor conteúdo da proteína β -Lg que no leite de vacas AA.

Desempenho superior do genótipo heterozigoto foi observado por Gonyon et al. (1987): vacas AB produziram 180 kg de leite a mais comparada à produção de vacas com genótipos BB e AA.

Rogne et al. (1989) tipificaram vacas das raças Holandesa, Ayshire e seus cruzamentos e observaram que o genótipo BB foi superior para produção de leite do que em vacas apresentando o AA e AB.

Aleandri et al. (1990) detectaram que o genótipo BB estava correlacionado positivamente com o conteúdo de gordura. Todavia, outros estudos concluíram que o genótipo AA produz um conteúdo superior de gordura quando comparado ao genótipo BB (NG-KWAI-HANG et al., 1990). Em estudo com rebanhos de diversas raças bovinas, Eenennam e Medrano (1991) observaram aumento na produção de leite ligado ao genótipo BB, com diferença na produção de 296 kg na lactação com relação ao genótipo AA. Quanto ao conteúdo de proteína, o genótipo BB proporcionou acréscimo de 16 kg quando comparado ao genótipo AA.

Imafidon et al. (1991) determinaram o efeito do cloreto de cálcio e dos polimorfismos genéticos da k-cn sobre a estabilidade térmica da β -Lg. Estes autores obtiveram resultados que demonstram maior estabilidade térmica da β -Lg na presença do cálcio com o genótipo AA da K-cn, porém explicações conclusivas não foram relacionadas. Bovenhuis et al. (1992) relataram que vacas genótipo AA para k-cn tem sua produção aumentada em 173kg de leite quando comparada às vacas BB, durante uma lactação. Entretanto, Cowan et al. (1992) não observaram efeito significativo dos genótipos com as características de produção de leite, proteína e gordura.

Tsiaras et al. (2005), em estudos com genotipagem de vacas holandesas, detectaram que o genótipo AB proporcionou uma maior produção de leite que o

genótipo AA. A produção de gordura do genótipo AB apresentou uma superioridade de 24kg (± 14) na lactação, em relação ao genótipo AA. Com relação a produção de proteína, os animais genótipo AB apresentaram uma produção 0.08% maior que AA e, quanto a produção de lactose, não houve associação significativa com este marcador.

Na pesquisa de Wedholm et al. (2006), a concentração da fração k-cn foi maior no leite de vacas com genótipo AB quando comparado ao genótipo AA deste gene, e a coagulação láctea deficiente foi observada em amostras de leite com baixa concentração e proporção de k-cn. Rodrigues (2006), ao pesquisar o efeito dos polimorfismos da k-cn em bovinos da raça Girolando, concluiu que não houve significância para associação entre os genótipos (AA, AB, e BB) e produção de leite corrigida para 305 dias.

Hallén et al. (2008) relacionaram menor concentração da fração caseína k em leite de vacas com genótipos EE, AE, AA enquanto que níveis mais elevados foram associados ao genótipo BB. Rachagani e Gupta (2008) afirmaram que Genótipo BB da k-cn apresentou maior influência sobre o rendimento mensal do leite, produção de leite até 305 dias, sólidos não gordurosos (SNF), produção e rendimento mensal de proteína.

Em estudo com vacas das raças Holandesa e Girolando detectou-se que animais correspondentes aos genótipos AB e BB apresentaram maior conteúdo de gordura no leite em relação ao genótipo AA (BOTARO et al., 2009). Heck et al. (2009) pesquisaram a associação entre os polimorfismos da k-cn com as concentrações relativas das frações protéica da k-cn (B>E>A), α_2 -cn (B>A), α -La, e β -cn (A>B) e com a porcentagem de proteína total (B>A).

Bonfatti et al. (2010) afirmam que o polimorfismo B da k-cn está associado

com maior teor e número de caseína. A inclusão do polimorfismo B da k-cn está associada ao aumento do conteúdo da fração k-cn e maior proporção desta em relação à caseína total, com reduções no percentual de α_{s1} .

Os resultados obtidos pelos diferentes autores são contraditórios, pois existe uma imensa complexidade no sistema de produção de leite que se une a uma diversidade de condições experimentais, como: raças utilizadas, estudo de genética de populações, tamanho da população, metodologias para detecção dos polimorfismos e padronização dos métodos de mensuração dos dados de produção.

No entanto, estudos acerca da compreensão do funcionamento das caseínas e de seus polimorfismos podem ter um grande impacto prático, tanto em nível de indústria láctea quanto no desenvolvimento de novos métodos terapêuticos em animais e humanos (MEDUGORAC; SOLLER, 2001).

Dessa forma, a produção leiteira deve procurar não só atender às necessidades nutricionais dos indivíduos, mas também buscar a aplicação do conhecimento em relação aos constituintes do leite e seus benefícios que porventura possam proporcionar a saúde da humanidade. Dentro desse planejamento, os programas voltados ao melhoramento genético animal devem ser elaborados a partir das necessidades do consumidor, o ponto de partida para planejamento da produção leiteira.

2.4.2 Polimorfismos da alfa-lactoalbumina

A alfa-lactoalbumina (α -La) é uma proteína cálcica de estrutura globular, composta por uma sequência de 123 aminoácidos, bastante conservada entre as espécies de ruminantes domésticos. Compõe cerca de 18% das proteínas do soro e

3,5% da proteína total do leite bovino (BLECK; BREMEL, 1993; BALCAN et al., 2008; DAYAL et al., 2009).

O papel biológico da α -La está no fato de compor o complexo Galactosiltrasfrase, no qual é responsável pela conversão da glicose em galactose para a síntese da lactose na glândula mamária. Por sua vez, a lactose, carboidrato encontrado exclusivamente no leite é responsável pelo controle do volume de água na glândula mamária, devido a sua incapacidade de sair do lúmen do complexo de golgi, fazendo que ocorra maior concentração de soluto, o que faz por osmose ocorrer a entrada de água para ocasionar o equilíbrio osmótico na célula (VOLKER et al., 1999; MARTÍN et al., 2002; UFFO; MARTINEZ, 2002).

Com relação ao gene da α -La, este se encontra localizado no cromossomo 5 bovino (q21), e possui uma sequência de 3.090pb, que compreende quatro éxons e três íntrons. Os polimorfismos identificados até o momento são pontuais na região codificadora de mRNA, em que ocorre a substituição da adenina pela guanina e que resulta nas variantes A e B, que codificam as respectivas variantes proteicas, A e B (VILLOTE et al., 1991; MARTÍN et al., 2002). As variantes proteicas A e B diferem uma da outra pela presença do aminoácido glutamina na variante A e presença do aminoácido arginina (Arg) na variante B, na posição 10 da cadeia polipeptídica (BREW; Hill, 1975; MITRA; YADAV, 1998; BALCAN et al., 2008).

Em seguida, serão apresentados principais estudos de polimorfismos do gene da α -La em populações bovinas em diversas localizações geográficas (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do estudo evolutivo das frequências alélicas da Alfa-Lactoalbumina na espécie bovina.

Resultados das Pesquisas	Localização Geográfica	Autores
A (0,33) e B (0,67).	EUA	Bleck; Bremel (1993)
A (0,14) e B (0,86);	Taiwan	Mao (1994)
Raças: Gir A (0,331) e B (0,669); Guzerá A (0,297) e B (0,703); Sindi A (0,386) e B (0,614), Nelore (0,176) e B (0,824).	Brasil	Silva; Del Lama (1997)
A (0,34) e B (0,66)	EUA	Voelker et al. (1997)

Pela Tabela 1 percebe-se que em todos os estudos houve predominância do alelo B em relação ao alelo A, em populações bovinas de diversas raças, desde espécies taurinas e zebuínas, com valores que chegaram próximo a fixação, como no caso da população de bovinos da raça Holandesa em Taiwan (B=0,86) (MAO, 1994) . Silva e Del Lama (1997), em pesquisa com a subespécie zebuína no Brasil, encontraram frequências próximas a 0,82 para o alelo B em bovinos da raça Nelore, e 0,67 para a raça Gir, componente genético que contribui para a formação da raça Girolando, principal produtora de leite no Brasil.

Na Tabela 2, se encontra resultados de rebanhos pertencentes ao continente europeu e ao México.

Tabela 2. Estudo das frequências alélicas do gene da Alfa-Lactoalbumina em rebanhos bovinos da Alemanha, Polônia e México.

Resultados das Pesquisas	Localização Geográfica	Autores
Sahiwal: A (0,11) e B (0,89)	Alemanha	Mitra; Yadav (1998)
Hariana: A (0,18) e B (0,82)		
Tharparkar: A (0,08) e B (0,92)		
A (0,78) e B (0,22):	Polônia	Kaczmarczy et al. (2005)
CLT*: A (0,559) e B (0,441):	México	Hernández et al. (2006)

*Criolo Leiteiro Tropical

Nestes estudos, com relação à população alemã, observou-se a proximidade de fixação do alelo B com relação ao alelo A nas raças genotipadas de origem zebuína (MITRA; YADAV,1998); valores superiores para o alelo B também identificados nos estudos de Kaczmarczy et al. (2005). Com relação à pesquisa de Hernández et al. (2006), no Estado de Vera Cruz, no México, observam-se valores mais equilibrados entre os dois alelos, com maior frequência do alelo A em animais da raça Criolo Leiteiro Tropical.

Na Tabela 3 encontram-se resultados de pesquisas de frequências alélicas do gene da alfa-lactoalbumina de rebanhos do continente asiático e da região do Caribe.

Tabela 3. Resultados das frequências alélicas do gene da Alfa-Lactoalbumina na espécie bovina na Ásia e Caribe.

Resultados das Pesquisas	Localização Geográfica	Autores
Siboney: A (0,44) e B (0,56); Criollo: A (0,39) e B (0,61);	Cuba	Uffo et al. (2006)
Zebu: A (0,40) e B (0,60). SNPs +15 A (0,31) e B (0,69), Holandesa.	China	Zhang et al. (2007)
Romanian Black, BB.	Bucharest	Balcan et al. (2008)
A (0,14) e B (0,86);	Istambul	Yardibi et al. (2009)

Os resultados indicam maior frequência do alelo B em relação ao alelo A, similar ao observado na maioria das pesquisas encontradas na literatura, em diversos países, caracterizando diferentes raças bovinas. Esses resultados podem ser justificados pelo fato do alelo B ser considerado marcador racial na subespécie *Bos taurus taurus* (taurina), tendo como principal representante a raça Holandesa, que é uma raça cosmopolita e mundialmente conhecida por ser a maior produtora de leite dentre as raças bovinas (DOMINGUES, 1977; EGITO, 2007; BALCAN et al., 2008). É justamente isto que pode justificar a maior frequência do alelo B, já que a base da produção mundial de leite se concentrou na utilização de reprodutores da raça Holandesa na formação de rebanhos e outras raças leiteiras.

Diante destes resultados, estudos que objetivam pesquisar polimorfismos genéticos da alfa-lactoalbumina são necessários em populações outras populações bovinas, em demais localidades geográficas, para suplementar o banco de dados de estudos de estrutura de genes relacionados à produção animal, que poderão auxiliar na etapa de seleção em programas de melhoramento genético animal.

3. Referências Bibliográficas

- ALEANDRI, R.; BUTTAZZONI, L.G.; SCHNEIDER, J.C. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n.2, p. 241-255, 1990.
- BALCAN, V.R.A.; GEORGESCU, S.E.; MANEA, M.A. et al. Alpha-lactalbumin genotypes identification in Romanian Black Spotted cattle breed. **Zootehnie si Biotehnologii**, v.41, n. 1, p. 169-173, 2008.
- BALIEIRO JC. Estimates of genetic parameter and phenotypic genetic and environmental trends of some productive traits in gyr cattle. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n.3, p. 266-275, 2000.
- BEVILACQUA, C.; HELBLING, J.C.; MIRANDA, G. et al. Translational efficiency of casein transcripts in the mammary tissue of lactating ruminants. **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, n.5, p. 567-678, 2006.
- BLECK G.T., BREMEL R.D. Correlation of the α -lactalbumin (+15) polymorphism to milk production and milk composition of Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v.76, p. 2292-2298, 1993.
- BONFATTI, V.; DI MARTINO, G.; CECCHINATO, A. et al. Effects of beta-kappa-casein (CSN2-CSN3) haplotypes and beta-lactoglobulin (BLG) genotypes on milk production traits and detailed protein composition of individual milk of Simmental cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n.8, p. 3797-3808, 2010.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2009. p.532.
- BORGES, P.Z.; SGARBIERI, V.C.; JACOBUCCI, H.B. et al. Avaliação nutricional de concentrado protéico de soro de leite, caseinato de sódio e coágulo de caseína, comparados à caseína comercial. In III SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 3, 1999, Campinas, **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, [1999].
- BOTARO, B.G.; LIMA, Y. V.R.; CORTINHAS, C.S. et al. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 12, p.2447-2454, 2009.
- BOUNOUS G, PAPANBURG R, KONGSHAVN PA. et al. Dietary whey protein inhibits the development of dimethylhydrazine induced malignancy. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 11, n. 3, p. 213-217, 1988.

- BOVENHUIS, H.; Van ARENDONK, J.A.M.; KORVER, S. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.9, p.2549-2599, 1992.
- BREW, K.; HILL, R.L. Lactose biosynthesis, **Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology**, v. 72, p. 105-157, 1975.
- CÂNDIDO, L.M.B.; SGARBIERI, V.C. Enzymatic hydrolysis of Nile tilapia (*Oreochromus niloticus*) myofibrillar proteins: effects on nutritional and hydrophilic properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, V. 83, p. 937–944, 2003.
- CAROLI, A.M.; CHESSA, S.; ERHARDT, G.J. Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n.11, p. 5335-5352, 2009.
- CAROLI, A.; RIZZI, R.; LÜHKEN, G.; ERHARDT, G. Short communication: milk protein genetic variation and casein haplotype structure in the Original Pinzgauer cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n.3, p. 1260-1265, 2010.
- COWAN C.M.; DENTINE M.R.; COYLE T. et al. Chromosome substitution effects associated with kappa-casein and beta-lactoglobulin in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 4, p. 1097-1104, 1992.
- DAMIANI G.; BUDELLI E.; FLORIO S. et al. Polymorphism within sine BOV-A2 of k-casein and steroid 21-hydroxylase in some bovine breeds. **Zootecnica e Nutrizione Animale**, v. 26, n. 3, p. 145-148, 2000.
- DAYAL, S.; BHATTACHARYA, T.K.; KAUSHIK, P. et al. Genetic typing the alpha-lactalbumin gene and its association with milk production and constituent traits in Indian riverine buffloes. **Buffalo Bulletin**, v. 28, n.1, p. 11-17, 2009.
- DEBELJAK M., SUSNIK S., MARINSEK-LOGAR R. et al. Allelic differences in bovine kappa-CN gene which may regulate gene expression. **Pflagers Archives**, v. 439, p. 4-6, 2000.
- DICKINSON, E. Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. **International Dairy Journal**, Cambridge, v. 9, n. 3 - 6, p. 305-312. 1999.
- DOBICKI, A.; CHLÁDEK, G. Y.; ZACHWIEJA, A. Growth rate calver and condition of their Red – and White, Charolais, F₁ or R₁ dams in relation to the genetic polymorphism of milk proteins. **Animal Science Papers and Reports**, v. 20, n.1, p. 161-167, 2002.
- DOMINGUES, O. **Gado leiteiro para o Brasil: gado europeu, gado indiano, gado bubalino**. Sao Paulo: Nobel, 1977. 112p.

- DÜRR, J.W. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite: Uma oportunidade única. **O Compromisso com a qualidade do leite no Brasil**, 2004. p.331.
- EENENNAAM, A.V.; MEDRANO, J.F. Milk protein polymorphisms in Califórnia dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.1730-1742, 1991.
- EGITO, A.A.; ALBUQUERQUE, M.S.; MARIANTE, A.S. Caracterização genética de raças naturalizadas. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. **Anais...**Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2001. p 121-126.
- EGITO, A.A. **Diversidade Genética, Ancestralidade Individual e Miscigenação nas Raças Bovinas no Brasil com Base em Microssatélites e Haplótipos de DNA Mitocôndrial Subsídios para a Conservação**. 2007. 232f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)–Instituto de Ciências Biológicas/Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2007.
- EIGEL, W.N.; BUTLER, J. E.; ERNSTROM, C.A. et al. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth edition. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 1599-1631, 1984.
- EMMONS, D.B.; DUBE, C.; MODLER, H.W. Transfer of protein from milk to cheese. **Journal of Dairy Science**, v.86, n. 2, p.469-485, 2003.
- FARIA, F.J.C; GUIMARÃES, S.E.F.; MOURÃO, G.B. et al. Análise de polimorfismos do gene da β -lactoglobulina em vacas da raça Nelore e efeitos sobre o peso à desmama de suas progênes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.3, p.261-265, 2000.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA-CENAGEM. , 1995, 220 p.
- FERRETTI, L.; LEONE, P.; SGARAMELLA, V. Long range restriction analysis of the bovine casein genes. **Nucleic Acids Res**, v. 18, p. 6829-6833, 1990.
- FORMAGGIONI, P, SUMMER, A, MALACARNE, M, MARIANI, P. **Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in bos genus**. Disponível em: <http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/2010>. Acesso em : out. 2010.
- GALLAGHER, D.S.; SCHELHNG, C.P.; GROENEN, M.M. et al. Confirmation that the casein gene cluster resides on cattle chromosome 6. **Mamm Genome**, v. 5, p. 524, 1994.
- GERDES, S.; HARPER, J.; MILLER, G. **Componentes bioativos de soro e a saúde cardiovascular**. U.S. Dairy Export Council, São Paulo, p. 1-8, 1999.

GONYON, D.S.; MATHER, R.E., HINES, H.C. et al. Associations of bovine blood and milk polymorphisms with lactation traits: Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2585-2598, 1987.

GROSCLAUDE, F. Le polymorphisme genetique des principales lactoproteines bovines. Relation avec la queantite, la compisition et les aptitudes fromageres du lait. **Inra Production Animales**.v.1, n.1, p. 5-17, 1988.

HALLÉN, E.; WEDHOLM, A.; ANDRÉN, A. et al. Effect of beta-casein, kappa-casein and beta-lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants. **Journal of Breed Genetics**, v. 125, n. 25, p. 119-129, 2008.

HECK, J.M.; SCHENNINK, A., VAN VALENBERG, H.J. et al. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 1192-1202, 2009.

HERNÁNDEZ, A.; SALINAS, V.M.; LUNA, M. et al. Comportamiento de las variantes genéticas de los genes k-caseína, alfa-lactoalbumina y hormona del crecimiento en la raza Criollo Lechero Tropical en Mexico y su relación con él nivel de respuesta al calor. **Revista de Salud Animal**, v.28, n. 2, p. 96-104, 2006.

HUFFMAN, L.M.; HARPER, W.J. Maximizing the value of milk through separation technologies. **Journal of Dairy Science**, v . 82, n. 10, p. 2238 - 2244, 1999.

HURLEY, W.L. **Topics Areas in Lactation Biology**. Lessons of Department of Animal Sciences. University of Illinois. Urbana-Champaign, 2002.

IMAFIDON, G.I.; NG-KWAI-HANG, K.F.; HARWALKAR, V.R. et al. Effect of Genetic Polymorphism on the Thermal Stability of β -Lactoglobulin and κ -Casein Mixture. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 6, p. 1791-1802, 1991.

JENSEN, R.G. **Handbook of Milk Composition**. Academic Press, San Diego, 1995.

KACZMARCZYK, E.; MALOLEPSZY, J.; BOJAROJC-NOSOWICZ, B. et al. Polymorphism of the alfa-lactalbumin gene and populations and subpopulations of peripheral blood lymphocytes in heifers naturally infected with bovine leukaemia virus. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.49, p. 279-286, 2005.

KAMINSK, S.; CIESLINSKA, A.; KOSTYRA, E. Polimorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal Applied Genetics**, v. 48, n. 3, p. 189-198, 2007.

- KLAUZINSKA, M.; SIADKOWSKA, E.; GROSHOWSKA, R. et al. Polymorphism of molecular-genetic systems in the Polish red cattle. **Tsitology Genetics**, v. 35, n. 1, p. 58-60, 2001.
- KRÜGER, C.C.H.; CENI, G.C.; SGARBIERI, V.C. et al. Propriedades hidrofílicas de concentrados protéicos de leite bovino. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p.122 - 127, 2002.
- LIEN, S.; ROGNE, S. Bovine casein haplotypes: numbers, frequencies and applicability as genetic markers. **Animal Genetics**, v. 24, p. 373-376, 1993.
- MACHADO, B.B.; ALENCAR, M.M.; PEREIRA, M. et al. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, 259-265, 2003.
- MADALENA, F.E. Valores econômicos para a seleção de gordura e proteína do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 3, p. 678-684, 2000.
- MAO, F..C. A bovine alpha-lactalbumin gene *Mnl* restriction fragment length polymorphism. **Journal of Animal Science**, v.72, p. 529, 1994.
- MARTIN, P.; OLLIVER-BOUSQUET, M.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of casein: a tool to investigate casein micelle organization. **International Dairy Journal**, v. 9, p.163-171, 2002.
- McLEAN, D.M.; GRAHAM, E.R.; PONZONI, R.W. et al. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. **Journal of Dairy Science**, v 51, n. 4, p. 531-546, 1984.
- MEDRANO, J. F. **Mejoramiento de la calidad de la leche**. Mundo ganadero 3(12), 1992, p.25- 35.
- MEDUGORAC, I. Y.; SOLLER, M. Selective genotyping with a main trait and a correlated trait. **Journal Animal Breeding Genetic**, v. 118, p. 285-295, 2001.
- MERCIER, J.C., BRIGNON, G., RIBADEAU-DUMA, B. Structure primary of the casein k- B bovine. Sequence complete. **Europe Journal Biochemical**, v. 35, p. 222-235, 1973.
- MING, P. Descrição da indústria de produtos lácteos dos Estados Unidos. **Leite e Derivados**, São Paulo, n. 12, ano IX, p. 64 – 68, 2000.
- MITRA, A.S.; YADAV, B.R. Alpha-lactoalbumin polymorphism in three breeds of Indian zebu cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 115, p. 403-405, 1998.

- MODLER, H.W. Milk processing. In: NAKAI, S.; MODLER, W. (Eds.). Food proteins: processing applications. Wiley-VCH, Inc., p.1-21, 2000.
- MORENO, I.;BALDINI, V.L.S.; LERAYER, A.L.S. et al. Modificações das proteínas do leite no processamento de queijos. **Revista Indústria de Laticínios**, v. 26, p.44-49, 2000.
- NEKLYUDOV, A.D; IVANKIN, A.N.; BERDUTINA, A.V. Properties and uses of proteinhydrolysates. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 452-459, 2000.
- NG-KWAI-HANG, K.F.; HAYES, J.F.; MOXLEY, J.E. et al. Association of genetic variants of casein and milk serum protein with milk, fat and protein production by dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 835-840, 1984.
- _____. Et al. Variation in milk protein concentration associated with genetic polymorphism and environmental factors. **Journal of Dairy Science**, v. 70. p. 563–570, 1987.
- _____. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits three lactations. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 12,p. 3414-3420, 1990.
- _____. et al. Identification of kappa-casein genotype in Holstein sires: a comparison between analysis of milk samples from daughters and direct analysis of semen samples from sires by polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**. v, 74, n. 8, p. 2410-2415, 1991.
- OLIVEIRA, H.N.; CURTI, R.A. Seleção assistida por marcadores. In: ZOOTEC, 18., 2008, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Associação Brasileira de Zootecnia, [2008]. (CD-ROM).
- ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, v. 2, 2005.
- OSTA, R.; GARCÍA-MURO, E.; ZARAGOZA, P. et al. Milk protein genotyping in bovine embryos using PCR. 9^{na} Reunion AETE-Lyon, 10-11, Septiembre. 1993.
- PACHECO, M.T.B.; AMAYA-FARFAN,J.; SGARBIERI, V.C. Partial characterization of a whey protein concentrate and its enzyme hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v.26, p. 327 – 338, 2002.
- PAZ, C.C.P.; PACKER, I.U.; FREITAS, A.R. et al. Ajuste de modelos não-lineares em estudos de associações entre polimorfismos genéticos e crescimento em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1416-1425, 2004.

- PEREDA, J.A.O.; RODRÍGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F. et al. **Tecnologia de Alimentos**, Rio Grande do Sul: Editora Artmed, 2005. 279p.
- PRATA, L.F. **Fundamentos de ciência do leite**. Jaboticabal, São Paulo: FUNEP/UNESP, 2001. 287p.
- PROVOT, C.; PERSUY, M.A.; MERCIER, J.C. Complete sequence of the ovine beta-casein-encoding gene and interspecies comparison. **Gene**, v. 10, n.2, p. 259-63, 1995.
- RACHAGANI, S.; GUPTA, I.D. Bovine kappa-casein gene polymorphism and its association with milk production traits. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n.4, p. 893-897, 2008.
- RASMUSSEN, L.K.; JOHNSEN, L.B.; TSIORA, A. et al. Disulphide-linked caseins and micelles. **International Dairy Journal**, v. 6. n. 3, p. 215 - 218, 1999.
- REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: EMBRAPA, 2001. 213p.
- RIJNKELS M.; KOOIMAN, P.M.; DE BOER H.A. et al. Organization of the bovine casein gene locus. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 148-152, 1997.
- RODRIGUES, S.G. **Estudo das freqüências dos alelos A e B dos genes da Kappa-caseína e Beta-Lactoglobulina e suas associações com produção de leite em bovinos F1 Girolando**. 2006. 27f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- ROGNE, S.; LIEN, S.; VEGARUD, G. et al. A method of k-casein genotyping of bulls. **Animal Genetics**, v.20, p. 317-321, 1989.
- SABOUR, M.P.; LIN, C.Y.; KEOUGH, A. Effects of selection practiced on the frequencies of k-casein and β -Lactoglobulin genotypes in Canadian Artificial insemination Bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 274-280, 1993.
- SCHANBACHER, F.L.; TALHOUK, R.S.; MURRAY, F.A. et al. Milk-borne bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v. 8, n.5/6, p. 393 – 403, 1998.
- SCHLIEBEN, S.; ERHARDT, G.; SENFT, B. Genotyping of bovine kappa-casein (k-CnA, k-CnB, k-CnC, k-CnE) following DNA sequence amplification and direct sequencing of k-CnE PCR product. **Animal Genetics**, v. 22, p. 333-342, 1991.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações**, modificações. São Paulo: Editora-Livraria Varela, 1996. 517p.
- SILVA, I.T.; DEL LAMA, M.A. Milk protein polymorphisms in Brazilian Zebu cattle. **Brazilian Journal Genetics**, v. 20, n. 4, 1997.

- SGARBIERI, V.C. Review: Structural and physicochemical properties of milk proteins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n.1, p. 43-56, 2005.
- SPRITZE, A.; EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S. et al. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n.10, p.1157-1164, 2003.
- SWAISGOOD, H. E. Primary sequence of kappa-casein. **Journal of Dairy Science**, v. 45, n.1, 1975.
- THREADGILL, D.W.; WOMACK, J.E. Genomic analysis of the major bovine casein genes, **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6935-6942, 1990.
- TSIARAS, A.M.; BARGOULI, G.G.; BANOS, G.; BOSCOS, C.M. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive Performance of Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n.1, p. 327-334, 2005.
- UFFO, O.; MARTÍNEZ, S. Amplificación por PCR de los genes que codifican para la alfa-lactoalbumina, la beta-lactoglobulina y la-kappa-caseína de una alta productora de leche y dos de sus descendientes e identificación de las variantes alélicas por RFLP. **Revista de Salud Animal**, v.24, n. 1, p. 22-26, 2002.
- UFFO, O., MARTÍN-BURRIEL, I., MARTÍNEZ, R. et al. Caracterización genética de seis proteínas láteas em tres razas bovinas cubanas. **AGRI**, v. 39, p. 15-24, 2006.
- VILOTTE, J.L.; SOULIER, S.; MERCIER, J.C. Complete sequence of a bovine alpha-lactalbumin pseudogene: the region homologous to the gene is flanked by two directly repeated LINE sequences. **Genomic**. v. 16, n. 2, p. 529-32, 1993.
- VIOQUE, J; CLEMENTE, A.; PEDROCHE, J. et al. Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos. **Grasas y Aceites**, v. 52, n. 2, p. 132 – 136,2001.
- VOELKER, G.R.; BLECK, G.T.; WHEELER M.B. Single-base polymorphisms within the 5'-flanking region of the bovine α -lactalbumin gene. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 194-197, 1997.
- _____. Identification of Variations in the α -Lactalbumin Gene in Cattle and Potential Correlation to Milk Production Traits, **Illini Dairy Net Papers**, University of Illinois Extension, 1999.
- WALSTRA, P. On the stability of casein micells. **International Journal of Dairy Science**. v. 73, n. 8, p.1965-1979, 1990.
- WEDHOLM, A.; LARSEN, LB.; LINDMARK-MÅNSSON, H. et al. Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 9, p. 3296-3305, 2006.

- WONG, C.W.; SEOW, H.F.; LIU, A.H. et al. Modulation of immune responses by bovine beta-casein. **Immunology and Cell Biology**, v. 74, n. 4, p. 323 – 329, 1996.
- YARDIBI, H.G.; TURKAY, A. MENGI, F. et al. Genetic Polymorphisms of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in South Anatolian and East Anatolian Red Cattle. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.4, p. 252-257, 2009.
- ZHANG, J.; SUN, J.E.; WOMACK, Y.Z. et al. Polymorphism identification, RH mapping and association of alpha-lactalbumin gene with milk performance traits in Chinese Holstein. **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, v.20, n. 9, p. 1327-1333, 2007.

4. Capítulo II

Polimorfismo genético da alfa-lactoalbumina em bovinos das raças Siboney de Cuba e Girolando do Brasil

Resumo - O objetivo do presente estudo foi detectar o polimorfismo genético do gene da alfa-Lactoalbumina (α -La) em bovinos da raça Siboney de Cuba e Girolando do estado de Pernambuco, Brasil. Foram coletadas aleatoriamente 360 amostras de sangue de animais provenientes de diversas localidades do território cubano e de Pernambuco. A identificação dos genótipos procedeu-se pela amplificação do fragmento gênico localizado nas regiões 5' não traduzida e éxon I do gene da α -La pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). O produto da amplificação foi submetido à digestão pela enzima *MspI*, que gerou fragmentos de peso molecular de 583pb (AA); 583pb, 393pb e 190pb (AB); 393pb e 190pb (BB). As frequências alélicas para a população de Siboney de Cuba foram de 0,25 e 0,75 para A e B, respectivamente, sendo as proporções genotípicas de 9.4% (AA), 31.4% (AB) e 59.2% (BB). Com base no teste de qui-quadrado (χ^2), as frequências alélicas e genotípicas do *loco* da α -La não estão em equilíbrio genético de Hardy-Weinberg na população estudada. Com relação à população Girolando esta apresentou as seguintes frequências: A (0.61) e B (0.39), com as respectivas proporções genotípicas, AA (37.21%), AB (47.58%) e BB (15.21%), estando esta população também em desequilíbrio genético de Hardy-Wenbeirg. Diante destes resultados, pode-se observar que estes marcadores foram eficientes para caracterização deste gene nas populações estudadas, se tornando ferramenta útil na etapa de seleção de reprodutores em programas de melhoramento genético destas raças.

Termos para indexação: *Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus*, *MspI*, proteína láctea.

Introdução

A alfa-lactoalbumina (α -La) é uma proteína de importância na biossíntese da lactose, já que é componente da enzima lactose sintase, responsável pela ligação β 1,4 da glicose mais uridina difosfato galactose. Na etapa final da síntese deste carboidrato (VOLKER et al., 1999; MARTÍN et al., 2002). A lactose, por sua vez, possui importante papel regulador da osmolaridade na glândula mamária e sua síntese está associada com a entrada de água no lúmen mamário, provocando, maior produção de leite, processo relacionado com a síntese de α -La (UFFO; MARTINEZ, 2002).

O gene da α -La está localizado no cromossomo 5 bovino (q21), compreendendo o tamanho de 3.090pb, composto por quatro éxons e três íntrons. Na posição +15 na região que codifica o mRNA ocorre substituição de base única (A/G) que origina as variantes A e B, que codificam as respectivas variantes protéicas, A e B (VILLOTE et al., 1991; MARTÍN et al., 2002). A variante proteica A difere da variante B pela substituição de aminoácido situado na posição 10, onde há uma glutamina (Gln) na primeira variante, e uma arginina (Arg) na segunda (BREW; HILL, 1975; MITRA; YADAV, 1998; BALCAN et al., 2008).

Estudos associativos indicaram que o alelo A do gene da α -La está relacionado à maior ejeção láctea, rendimento de proteína e gordura, quando comparado ao alelo B (MARTÍN et al., 2002). Além disso, outras pesquisas detectaram altas porcentagens de proteína e gordura para o genótipo AA da α -La quando comparado ao genótipo BB (BOSTON et al., 2001). Zhang et al. (2007) relataram que vacas com genótipo AA possuem maior valor de habilidade de transmissão predita (PTA) para produção de leite, proteína e gordura (kg) quando

comparado a vacas de genótipo BB. Com relação a essas variantes genéticas, há indícios de que a variante B seja marcador racial na subespécie *Bos taurus taurus* (taurina) e a variante A na subespécie *Bos taurus indicus* (zebuína) (BALCAN et al., 2008).

Os acasalamentos realizados entre as subespécies taurina e zebuína nos sistemas de produção leiteira da República de Cuba deram origem a raça Siboney (5/8H x 3/8Z), a partir de animais da raça Holandesa (taurina) e do Zebu, introduzidos por diversas importações, tendo esta última como base genética, indivíduos provenientes da Jamaica (PORTALES et al., 2009). Cerca de 62% das inseminações efetuadas em Cuba utilizam o sêmen do Siboney, devido a sua excelência com relação à adaptabilidade as condições climáticas, principalmente nas localidades onde o aumento da proporção da genética da raça Holandesa não é favorável (SUÁREZ et al., 2009).

Com relação à produção de leite do Brasil, em sua maioria, é proveniente de rebanhos mestiços, com 80% de sua constituição racial de animais *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*, distribuída em vários grupos genéticos (MACHADO, 2001), com predominância do cruzamento entre as raças Holandesa e Gir. Como consequência obteve-se a formação da raça Girolando, criou-se uma base genética com informações da raça (genealogia, desempenho, etc). A princípio, o desempenho dos diversos grupos genéticos Holandês x Gir foram controlados, formando um banco de dados, que possibilitou a elaboração de diversas pesquisas sobre o desempenho zootécnico dos variados grupos.

Diante da importância das raças em seus respectivos países e do polimorfismo genético da α -La, fez-se necessário a realização deste estudo para

detectar a presença de polimorfismo genético da α -La e a distribuição dos seus possíveis genótipos na raça Siboney de Cuba e Girolando, Brasil.

Material e Métodos

Foram coletadas 360 amostras de sangue de bovinos das raças Siboney, de Cuba, e 360 amostras da raça Girolando, para realização da tipagem do gene da α -La. As análises genéticas dos animais da raça Siboney foram realizadas entre março e maio de 2011, no Laboratório de Biologia Molecular, do Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, localizado na Província de Mayabeque, Cuba. Para a raça Girolando, as análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

A extração do DNA das células sanguíneas foi realizada de acordo com o protocolo de Osta (1994) e, em seguida, os *pellets* de DNA foram ressuspensos em 30 μ l de água ultra pura e armazenados em freezer a - 20°C. As reações de amplificação (PCR) foram realizadas em um termociclador (Biocycler) com uma concentração de DNA de 100ng/ μ l.

Foram utilizadas sequências de *primers* descritas por Osta (1994): LAA(33) 5'TTCCTggATgTAAggCTTgA e LAA(34) 3'ggTATgAAACgCggTACAgA, que amplificam uma sequência de 583pb localizada na região 5' não traduzida (UTR) e a região do éxon I do gene da α -La. Cada reação de amplificação consistiu 2,5 μ l de tampão para PCR 1X (KCl 500 mM, Tris-Cl pH 8.3 100 mM), 0,75 μ l de cada *primer*, 1,0 μ l de dNTP 0,125 mM, 1,0 μ l Taq DNA Polimerase, 0,75 μ l MgCl₂, 2,0 μ l de DNA e água ultra pura para completar o volume final de 25 μ l (Fabricante CENSA). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C, por 5 minutos, seguida

por 30 ciclos de 94°C, por 30 segundos, 62°C, por 30 segundos, e 72°C, por 30 segundos, com extensão final a 72°C, por 5 minutos.

Os produtos das ampliações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0%, durante uma hora, e para coloração das bandas foi utilizado o intercalante de DNA, brometo de etídeo. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado utilizando-se marcador de pares de base (100pb DNA ladder) (Fabricante CENSA), sendo os amplicons visualizados em transluminador com luz ultravioleta e, em seguida, fotodocumentados (Figura 1).

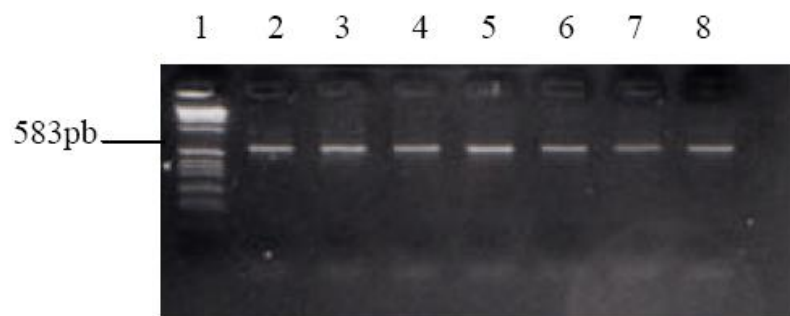


Figura 1. Gel de agarose 2,0%, fragmento de DNA amplificado (583pb) mostrado nas linhas 2 a 8, contendo o gene da alfa-Lactoalbumina bovina, da região 5' (UTR) e éxon I. Na linha 1: Marcador de peso molecular (DNA-Ladder100pb).

O produto da amplificação foi submetido à digestão pela *MspI* durante 12 horas, de acordo com o seguinte protocolo, para cada reação: 1,5µl Tampão, 0,5µl *MspI*, 10,0µl do produto da PCR, acrescentado um volume de água para um produto final de 15µl, em estufa a 37°C. Em seguida, procedeu-se a eletroforese em gel de agarose a 4,0% por uma hora. Após a digestão foram verificados os fragmentos gerados e, posteriormente, identificados os genótipos e, em seguida, os alelos foram quantificados por meio de contagem direta.

As frequências genóticas (χ_{ii}) e alélicas (χ_i) da amostra populacional em estudo foram verificadas pelas equações: $\chi_{ii} = n_{ii}/n$ e $\chi_i = 2n_{ii} + \sum n_{ij}/2n$, onde n_{ii} e n_{ij} corresponderam ao número de homozigotos e heterozigotos observados no gene i , respectivamente; n correspondeu ao número total de indivíduos. As frequências alélicas foram submetidas ao teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Resultados e Discussões

Na Figura 2, observa-se o padrão eletroforético da digestão do produto da PCR do gene da α -La, que gerou fragmentos de peso molecular de 583pb para o genótipo AA; 583, 393 e 190pb, para o genótipo AB, e 393 e 190pb para o BB.

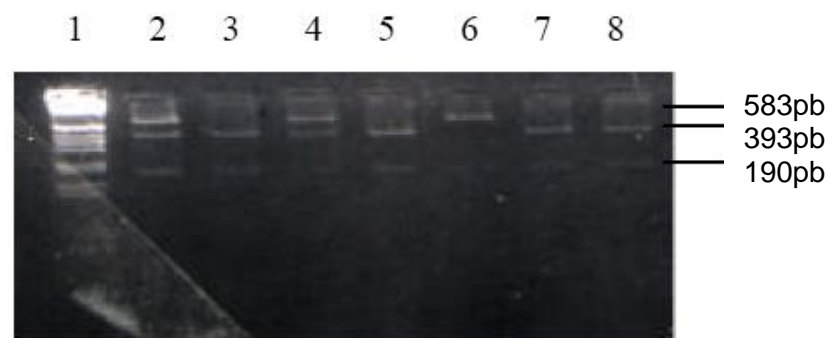


Figura 2. Gel de agarose 4,0%, padrão eletroforético obtido pela digestão da endonuclease *MspI*. Região do fragmento gênico da α -Lactoalbumina bovina, localizado na região 5' (UTR) e éxon I. Linha 1: Marcador de peso molecular (DNA-Ladder100pb); Linha 6: AA; Linhas 2 e 4: AB; Linhas 3,5,7 e 8: BB.

A distribuição das proporções genóticas e frequências alélicas do gene da α -La observada neste estudo encontram-se nas tabelas 1 e 2 para as populações de Cuba e Pernambuco, respectivamente. As frequências das variantes foram de 0.25, para A, e 0.75, para B, sendo as proporções genóticas 9.4% AA, 31.4% AB e 59.2% BB, para o Siboney de Cuba. A amostra populacional a partir deste *loco* gênico se encontra em desequilíbrio genético, pelo Teorema de Hardy-Weinberg.

Este fato é um indício que esta população sofreu e ainda vem sofrendo a

ação de fatores evolutivos, principalmente seleção artificial, uma das principais promotoras de alteração da estrutura genética em populações domésticas. Observa uma maior proporção do genótipo BB, indicado como marcador genético racial da sub espécie taurina.

Tabela 5. Distribuição das proporções genotípicas e frequências alélicas da alfa-Lactalbumina na população Siboney de Cuba

Genótipo	n Observado	Proporção Genotípica Observada (%)	n Esperado	Proporção Genotípica Esperada (%)	χ^2	Frequência Alélica ($\pm\sigma$)
AA	34	9,4	22,5	6,25	10,02*	A 0,25 \pm 0,014
AB	113	31,4	135	37,5		
BB	213	59,2	202,5	56,25		B 0,75 \pm 0,014
Total	360					

* $p < 0,05$

Os acasalamentos para formação do Siboney em Cuba foram estabilizados em 5/8H e 3/8Z; entretanto, até o ápice da revolução política de Cuba a produção leiteira deste país baseava-se na utilização de raças zebuínas, com uma população que chegou a aproximadamente 96% do efetivo total, o que pode explicar a presença do marcador racial α -La A.

Todavia, como parte do planejamento do Estado, implementou-se um programa de melhoramento genético que se fundamentou na absorção da genética da raça Holandesa, para formação de novas raças, como foi o caso do gado Siboney, fato este que pode explicar a maior frequência da variante B (LÓPEZ, 2003; UFFO et al., 2006). Os resultados encontrados nesse estudo apresentaram similaridade a outros encontrados na literatura, que em sua maioria observaram a presença dos três genótipos (AA, AB e BB) e maior ocorrência da variante.

Grosclaude (1988) verificou que em vinte raças de bovinos franceses estudadas dezoito apresentaram o gene da α -La de forma monomórfica para a variante B. Apenas nas raças Limousine e Vesgiene detectaram-se a presença da variante A, em baixa frequência. Osta (1994), em pesquisa realizada na Espanha, observou que todos os animais apresentaram o alelo B, reafirmando a legitimidade desta variante como sendo de raças taurinas europeias. Reinoso (2003), analisando três raças de bovinos cubanos, incluindo a Siboney, também detectou maior frequência para variante B.

O resultado da análise da estrutura genética da população de bovinos Girolando do estado de Pernambuco relata maior proporção genotípica para o heterozigoto AB (47,58%) e frequência superior para o alelo A (0,61) quando comparado ao alelo B (0,39) (Tabela 2). Além disso, esta população, assim como a Siboney de Cuba, também apresentou desequilíbrio genético com base no teorema de Hardy-Weinberg para o *loco* pesquisado.

Tabela 6. Distribuição das proporções genotípicas e frequências alélicas da alfa-Lactoalbumina na população Girolando, dos municípios de Arcoverde e Itambé, estado de Pernambuco, Brasil

Genótipo	N Observado	Proporção Genotípica (%)	N Esperado	Proporção Genotípica (%)	χ^2	Frequência Alélica ($\pm\sigma$)
AA	120	33	134	37,21	5,72*	A 0,61 \pm 0,010 B 0,39 \pm 0,010
AB	200	56	171	47,58		
BB	40	11	55	15,21		
Total	360					

* $p < 0,05$

A população de bovinos do estado de Pernambuco também se encontra sujeita a ação de fatores evolutivos, principalmente a seleção. Entretanto, pode-se acrescentar o alto fluxo gênico como outro fator evolutivo, já que houve uso intenso

de material genético de outras populações através do uso da inseminação artificial.

Bleck e Bremel (1993) demonstraram que mesmo em raças taurinas há uma maior ocorrência da variante A quando comparados a outros resultados de pesquisa em que a variante B foi monomórfica, o que pode ser explicado pela introdução da genética zebuína nos acasalamentos para formação destes animais nas regiões tropicais.

Com relação aos estudos de Silva e Del Lama (1997), os valores mais elevados da variante A em relação a esta pesquisa com Siboney de Cuba, apenas reafirma a maior participação do zebuino na formação destas raças no Brasil, já que este é considerado um marcador genético para a subespécie Zebu. Nos estudos de Voelker et al. (1997) ficou evidenciada a provável introdução gênica zebuína na formação destas populações nos EUA.

Os resultados de Mitra e Yadav (1998) demonstraram a proximidade para fixação do alelo B na raça Tharparkar. Kaczmarczyk et al. (2005) relataram resultados contrários às demais pesquisas já relatadas para a mesma raça, o que pode caracterizar destacada participação da genética zebuína nos acasalamentos que originaram estes animais. Hernández et al. (2006) determinaram a estrutura genética dos *loci* das proteínas lácteas de vacas taurinas Criolo Leiteiro Tropical (CLT), do Estado de Vera Cruz, no México, e observaram que em regiões de condições de estresse pelo calor, o alelo A alcançou valores próximos da fixação, 0,925 e 0,947, para o estresse moderado e elevado, respectivamente. Tal fato é um indicador de que o marcador racial α -La A está relacionado à adaptação dos animais em ambientes de elevadas temperaturas.

Uffo e Martínez (2002) caracterizaram os genes das proteínas do leite da vaca recordista mundial Ubre Blanca (3/4H×1/4Z) e duas de suas descendentes

(filha e neta) em Cuba. Observaram que para o gene da α -La a Ubre Blanca era heterozigota (AB), sendo sua filha e neta homozigotas para o alelo B. Este estudo foi de fundamental importância, já que a Ubre Blanca alcançou o recorde mundial de produção de leite de 27.674,2kg, com percentual de 3,81, para gordura, e 1.054,4kg de proteína em 365 dias de lactação, que evidenciou sua extraordinária capacidade metabólica.

Uffo et al. (2006) observaram as frequências próximas entre os alelos A e B para a raça Siboney, comportamento diferente para a raça Girolando, a mesma raça desta pesquisa. Contudo, deve-se considerar que o número amostral utilizado pelos autores foi de 50 animais para cada raça. Com relação ao gado Criollo, os autores relataram mestiçagem destes com animais de raças zebuínas.

A caracterização genética da α -La da amostragem Siboney em estudo exibiu a variabilidade esperada (AA, AB e BB), o que possibilita a seleção dos reprodutores mais adequados nos programas de melhoramento genético e pode-se ainda verificar que raças bovinas mundiais consideradas puras não o são totalmente, já que observaram-se incorporações gênicas da variante da α -La (A) em populações que eram consideradas monomórficas para a variante B deste gene, ocorrendo também, em alguns casos, maior frequência dessa variante nas raças taurinas em sistemas de produção europeu, o mesmo que ocorre com o Girolando.

Conclusões

Diante dos resultados encontrados, o marcador da alfa-lactoalbumina se mostrou eficiente na diferenciação dos diferentes genótipos nas populações Siboney e Girolando.

A presença dos três genótipos (AA, AB e BB) poderão auxiliar os programas de melhoramento genético animal, quando do processo de escolha de reprodutores para diferentes objetivos de produção de leite.

Perspectivas

É necessária a realização de trabalhos que correlacionem as variantes genéticas da alfa-lactoglobulina, com características de interesse zootécnico, que sejam elaborados com o intuito de comprovar a eficiência desse *loco* como marcador genético em programas de melhoramento de rebanhos mestiços Siboney de Cuba e Girolando do Brasil.

Agradecimentos

À CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro; ao Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA, Cuba), pelo auxílio técnico; ao Laboratório de Fisiologia Animal, Molecular Aplicada (FAMA); à Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela formação acadêmica.

Referências

BALCAN, V.R.A.; GEORGESCU, S.E.; MANEA, M.A. et al. Alpha-lactalbumin genotypes identification in Romanian Black Spotted cattle breed. **Zootehnie si Biotehnologii**, v.41, n. 1, p. 169-173, 2008.

BLECK, G.T.; BREMEL, R.D. Sequence and single base polymorphism of the bovine LA 5'-flanking region. **Gene** v. 126, p. 213-218, 1993.

BOSTON, W.S.; BLECK, G.T.; CONROY, J.C. et al. Short Communication: Effects of increased expression of α -Lactalbumin in transgenic mice on milk yield and pup growth. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 620-622, 2001.

BREW, K.; HILL, R.L. Lactose biosynthesis. **Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology**, v. 72, p. 105-157, 1975.

DAYAL, S.; BHATTACHARYA, T.K.; KAUSHIK, P. et al. Genetic typing the alpha-lactalbumin gene and its association with milk production and constituent traits in Indian riverine buffloes. **Buffalo Bulletin**, v. 28, n.1, p. 11-17, 2009.

GROSCLAUDE, F. Le polymorphisme genetique des principales lactoproteines bovines. Relation avec la queantite, la compisition et les aptitudes fromageres du lait. **Inra Production Animales**.v.1, n.1, p. 5-17, 1988.

HERNÁNDEZ, A.; SALINAS, V.M.; LUNA, M. et al. Comportamiento de las variantes genéticas de los genes k-caseína, alfa-lactoalbumina y hormona del crecimiento en la raza Criollo Lechero Tropical en Mexico y su relación con él nivel de respuesta al calor. **Revista de Salud Animal**, v.28, n. 2, p. 96-104, 2006.

KACZMARCZYK, E.; MALOLEPSZY, J.; BOJAROJC-NOSOWICZ, B. et al. Polymorphism of the alfa-lactalbumin gene and populations and subpopulations of peripheral blood lymphocytes in heifers naturally infected with bovine leukaemia virus. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.49, p. 279-286, 2005.

LÓPEZ, D. Cruzamiento en Cuba. Experiencias y perspectivas, 2003. Disponible em: <http://www.alpa.org.ve/publicac/criollo/capiv.dbf>. [consulta: 10 de maio de 2011].

MAO, F..C. A bovine alpha-lactalbumin gene *Mnl* restriction fragment length polymorphism. **Journal of Animal Science**, v.72, p. 529, 1994.

MARTÍN, P.; MALGORZATA, S.; ZWIERZCHOWSI, L. et al. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminat milks. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 433-459, 2002.

MITRA, A.S.; YADAV, B.R. Alpha-lactoalbumin polymorphism in three breeds of Indian zebu cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 115, p. 403-405, 1998.

OSTA, R. **Caracterización genética de proteínas lácteas y sexaje de embriones en ganado vacuno mediante la aplicación de la biotecnología al**

análisis del DNA. 1994. 150 f. Tese (Doutorado em Veterinária) – Departamento de Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade de Zaragoza, Zaragoza Espanha, 1994.

PORTALES, A.; GONZÁLES-PEÑA, D.; GUERRA, J.C. et al. Estimación de componentes de varianza para rasgos productivos y reproductivos en ganado Siboney de Cuba. **Ciencia y Tecnología Ganadera**, v. 3, n. 1, p. 39-44, 2009.

REINOSA, O.U. **Aplicación de los marcadores moleculares al estudio de la biodiversidad del ganado bovino cubano.** 2003. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária) – Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Universidad Agraria de la Habana, Habana Cuba, 2003.

SILVA, I.T.; DEL LAMA, M.A. Milk protein polymorphisms in Brazilian Zebu cattle. **Brazilian Journal Genetics**, v. 20, n. 4, 1997.

SUÁREZ, M.A.; ZUBIZARRETA, I.; PERÉZ, T. Interacción genotipo ambiente en ganado bovino Siboney de Cuba. **Livestock Research for Rural Development**, v.21, n.9, 2009.

SWAISGOOD, H. E. Primary sequence of kappa-casein. **Journal of Dairy Science**, v. 45, n.1, 1975.

UFFO, O.; MARTÍNEZ, S. Amplificación por PCR de los genes que codifican para la alfa-lactoalbumina, la beta-lactoglobulina y la-kappa-caseína de una alta productora de leche y dos de sus descendientes e identificación de las variantes alélicas por RFLP. **Revista de Salud Animal**, v.24, n. 1, p. 22-26, 2002.

UFFO, O.; MARTÍN-BURRIEL, I.; MARTINEZ, S. et al. Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. **Animal Genetic Resources Information**, n. 39, p.15-24, 2006.

VILOTTE, J.C.; SOULIER, S.; PRINTZ, C.; MERCIER, J.C. Sequence of the goat α -lactalbumin-encoding gene: comparison with the bovine gene and evidence of related sequences in the goat genome. **Gene**, v.98, p. 271–276, 1991.

VOELKER, G.R.; BLECK, G.T.; WHEELER M.B. Single-base polymorphisms within the 5'-flanking region of the bovine α -lactalbumin gene. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 194-197, 1997.

VOELKER JR. G.R., BLECK G.T., WHEELER M. B. Identification of Variations in the α -Lactalbumin Gene in Cattle and Potential Correlation to Milk Production Traits, **Illini Dairy Net Papers**, University of Illinois Extension, 1999.

YARDIBI, H.G.; TURKAY, A. MENGI, F. et al. Genetic Polymorphisms of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in South Anatolian and East Anatolian Red Cattle. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.4, p. 252-257, 2009.

ZHANG, J.; SUN, J.E.; WOMACK, Y.Z. et al. Polymorphism identification, RH mapping and association of alpha-lactalbumin gene with milk performance traits in Chinese Holstein. **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, v.20, n. 9, p. 1327-1333, 2007.

2. Capítulo III

Polimorfismos do Gene da Kappa-Caseína em Bovinos Holando-Gir do Estado de Pernambuco

Resumo - O objetivo do presente estudo foi caracterizar geneticamente a kappa-caseína e população Holando-Gir do Estado de Pernambuco. Foram coletadas aleatoriamente 250 amostras de sangue de diversos grupos genéticos Holando ($\frac{1}{2}$ holando-gir, $\frac{3}{4}$ holando-gir, $\frac{5}{8}$ holando-gir), desse material foi extraído o DNA. A genotipagem ocorreu no Laboratório de Biotecnologia pertencente ao Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia localizado na Universidade Federal do Amazonas, Parintins. O amplicon foi digerido pela enzima de restrição *HindIII* para observar os possíveis polimorfismos. Foram encontradas as seguintes frequências alélicas e proporções genotípicas, respectivamente, 0,53 A e 0,47 B, AA (28%), AB (50%) e BB (22%), destacando que esta população em equilíbrio poderá possibilitar a seleção de rebanhos para produção de tipos leiteiros o que pode contribuir no processamento do leite na indústria.

Termos para indexação: *Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus*, *HindIII*, proteína láctea.

Introdução

O leite possui diversos compostos que proporciona, em crianças, proteção imunológica contra infecções, que pode ser atribuída aos peptídeos bioativos com propriedades reguladoras no desenvolvimento do sistema imunológico (SMACHI; GOBBETTI, 2000).

A diversidade de pesquisas referentes aos marcadores genéticos das proteínas lácteas permitiu o acesso a vários resultados. Porém, controversos em sua maioria, com relação às frequências dos principais alelos deste grupo em populações bovinas, localizadas em diversas regiões do mundo, sendo a influência destes marcadores no comportamento das características econômicas o grande interesse de todos os setores que compõem os estratos do processo da produção de leite.

Enfatizando o setor primário, tendo como cenário principal a propriedade rural, as metas concentram-se em otimizar o processo produtivo de modo a obter maior volume e conteúdo de produtos (leite e seus derivados) com menor número possível de produtoras de leite. O melhoramento genético animal é a alternativa mais adequada a solucionar esta questão, com vista a conciliar maior volume por unidade animal com a sustentabilidade ambiental, entretanto, que permita manter o suprimento a alimentos básicos, como leite e seus derivados, a população local.

Diante destas opções, os estudos dos marcadores genéticos moleculares associados à expressão das proteínas lácteas constituem parâmetros que auxiliam na tomada de decisão na etapa de seleção de reprodutores em acasalamentos dirigidos, dentro de um programa de melhoramento genético animal. Desta forma, pesquisas que contemplam a

caracterização genética molecular da Kappa-caseína (K-Cn) são de extrema importância para a tomada de decisões.

A k-cn é uma glicoproteína com a região carboxiterminal da sequência primária solúvel em fase soro denominada Glicomacroproteína (GMP), e uma região de sequência primária de natureza não polar orientada para o interior da micela designada para-k-caseína (PRATA, 2001).

Quando ocorre o processamento do leite para manufatura de queijos é necessário que ocorra a hidrólise enzimática ou tratamento térmico da micela, que resulta na dissociação da k-cn da superfície micelar, eliminando, desta forma, a estabilidade eletrostática, aumentando a hidrofobicidade da superfície, o que leva à agregação das submicelas e formação do coágulo (SGARBIERI, 1996; SGARBIERI, 2005).

Diante desses fatos, o objetivo desta pesquisa foi identificar a estrutura genética populacional de bovinos Holando-Gir por meio do gene da Kappa-Caseína, como base para programas de melhoramento genético de bovinos leiteiros.

Material e Métodos

Foram coletadas, durante o período de agosto a outubro de 2012, 250 amostras de 10 ml de sangue total em tubos a vácuo contendo o anticoagulante citrato de sódio, de fêmeas e machos bovinos Holando-Gir provenientes de diferentes categorias (bezerros, novilhos e animais adultos) e propriedades particulares distribuídas nos Municípios de Itambé e Arcoverde,

Pernambuco. As amostras foram acondicionadas imediatamente em recipiente contendo gelo e levadas ao Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada-FAMA, localizado no Departamento de Morfologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde foi realizada a extração de DNA.

A extração do DNA das células sanguíneas foi realizada de acordo com o protocolo de Biase et al. (2002) e, em seguida, os *pellets* de DNA foram ressuspensos em 30µl de água ultra pura e armazenados em freezer a -20°C. A genotipagem foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia da Universidade Federal do Amazonas. As reações de amplificação (PCR) foram realizadas em um termociclador (Biocycler) com uma concentração de DNA de 100ng/µl. As sequências de *primers*, protocolos de reação e ciclagens foram descritas por Pinder et al. (1990). Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0%, durante uma hora, e para coloração das bandas foi utilizado o intercalante de DNA, Blue Green Loading Dye I®. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado utilizando-se marcador de pares de base (100pb DNA ladder).

O produto da amplificação foi submetido à digestão pela enzima AluI de acordo com o protocolo de Otaviano et al. (2008). Em seguida, foi procedida a eletroforese em gel de agarose a 4,0%, por uma hora. Após a digestão foram verificados os fragmentos gerados e, posteriormente, identificados os genótipos e, em seguida, os alelos quantificados por meio de contagem direta.

As frequências genotípicas (χ_{ii}) e alélicas (χ_i) da amostra populacional em estudo foram obtidas pelas equações: $\chi_{ii} = n_{ii}/n$ e $\chi_i = 2n_{ii} + \sum n_{ij}/2n$, onde n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homocigotos e heterocigotos observados no

gene i , respectivamente; n corresponderá ao número total de indivíduos. As frequências alélicas foram submetidas ao teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Resultados e Discussões

As frequências alélicas do fragmento gênico da kappa-caseína foi de 0,53 e 0,47 para A e B, respectivamente. A distribuição das frequências genotípicas e alélicas do gene da K-Cn observadas nos grupos genéticos dos grupos Holando-Gir encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Frequências genotípicas e alélicas do gene da Kappa-caseína em populações Holando-Gir do Estado de Pernambuco

Genótipo	Frequência Genotípica (%)	N Observado	N Esperado	χ^2	Frequência Alélica ($\pm\sigma$)
AA	28%	75	70	1,61 ^{ns}	A
AB	50%	115	125		B
BB	22%	60	55		0,53 \pm 0,039
Total		250			0,47 \pm 0,039

ns= não significativa ($p < 0,05$)

Pela Tabela 2, observa-se que o *loco* gênico da K-Cn se encontra em equilíbrio genético pela lei de Hardy-Weinberg. Este fato pode ser justificado pela ausência de fatores evolutivos nesta população, entretanto, tratando-se de populações que são submetidas à seleção artificial, era esperado desequilíbrio nos loci estudados, além de outros fatores como migração e ausência de *panmixia*.

Postiglioni et al. (2002) encontraram frequências genotípicas também similares a esse estudo, com maior frequência para o genótipo AB de 0,5, já para o genótipo AA, foi encontrado 0,25 e para o genótipo BB 0,24, o que nesse caso se apresenta como uma melhor ocorrência de leite para a fabricação de queijo.

Uffo et al. (2006) em animais Criolos de Cuba demonstraram que em animais Siboney de Cuba, as frequências variaram de 0,7 a 0,8 para o alelo A e 0,2 a 0,3 para o alelo B. Além disso, em trabalho realizado com vacas Holandesas de linhagem Italiana (COMIN et al. 2008), os alelos A e B também foram os mais observados, porém, nesse mesmo estudo o autor observou também o alelo E mesmo que com uma baixa frequência (0,06).

Por outro lado, os dados encontrados nesse estudo discordam dos encontrados por Tsiaras et al. (2005), que identificaram em vacas holandesas a frequência de 0,88 para o genótipo AA e 0,12 para o AB, não encontrando o genótipo BB. Segundo Sulimova et al. (2007b), o genótipo BB é o mais importante para a fabricação de queijos devido às propriedades do coalho desse tipo específico de leite.

Otaviano (2006) realizou um experimento no Brasil com diferentes raças de bovinos e os valores encontrados para o gado holandês foram de 0,62 para o genótipo AA, 0,26 para AB e 0,12 para BB.

Frequência inferior do genótipo BB também foi encontrada em outros estudos em diversos países como os de Pinder et al. (1991) no Reino Unido, Tsiaras et al. (2005) na Grécia, Uffo et al. (2006) em Cuba, Comin et al. (2008) na Itália e Otaviano (2006) no Brasil, o que concorda com a frequência desse genótipo no rebanho estudado em relação ao alelo A.

Outra característica que é possível de relacionar aos alelos A e B da *k-Cn* é a produção de leite em que Lin et al (1989) verificaram que vacas com genótipo BB produzem mais do que as de genótipo AA e AB, em animais das raças Holandesa, Ayrshire e seu cruzamento. Em contraste, Gonyon et al (1987) observaram efeito significativo oposto: vacas Holandesas AA apresentaram, em média, 180Kg a mais de leite do que vacas BB.

Bovenhuis et al (1992) demonstraram que vacas com genótipo BB produzem 173Kg menos de leite do que vacas com genótipo AA. Ainda, outros

pesquisadores, como Aleandri et al (1990); McLean *et al* (1987) e McLean et al (1984) relataram que não há efeito de cada alelo na produção de leite.

Conclusões

Diante dos resultados encontrados pode-se afirmar que a identificação de animais Holando-Gir é possível através do marcador genético da kappa-caseína utilizada nessa pesquisa.

A partir destes resultados, programas direcionados de melhoramento genético poderão ser elaborados e executados no sentido de aumentar a produtividade nos sistemas de produção.

Referências Bibliográficas

ALEANDRI, R ; BUTTAZZONI, L. G.; SCHNEIDER, J. C. The effects of milk polymorphism on milk components and cheese-producing ability. **J. Dairy Sci.**, v.73, p. 241- 255, 1990.

ALEXANDER L.J., STEWART A.F., MACKINLAY A.G., KAPELINSKAYA T.V., TKACH T.M. & GORODETSKY S.L. Isolation and characterization of the bovine Kcasein gen'e. **European Journal of Biochemistry** 178, 395-401, 1988.

ANGIOLILLO, A.; YAHYAOU, M. H.; SÁMCHES, A.; PILLA, F., FOLCH, J. M. Characterization of a new genetic variant in the caprine k-casein gene. **J. Dairy Sci.** v.85.p. 2679-2680, 2002.

BIASE, F.H.; FRANCO, M.M.; GOULART, L.R. et al. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 313-315, 2002.

BOVENHUIS H.; JOHAN, A. M.; ARENDONK, V.; KORVER, S. Association between milk protein polymorphisms and milk production traits. **J. Dairy Sci.**, v.75, p. 2549- 2559, 1992.

COMIN, A., CASSANDRO, M., CHESSA et al. Effects of Composite β - and κ -Casein Genotypes on Milk Coagulation, Quality, and Yield Traits in Italian Holstein Cows. **Jornal of Dairy Science**. v. 91, p. 4022–4027, 2008.

EENENNAAM, A.V.; MEDRANO, J.F. Milk protein polymorphisms in Califórnia dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.1730-1742, 1991.

EIGEL, W.N.; BUTLER, J. E.; ERNSTROM, C.A. et al. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth edition. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 1599-1631, 1984.

FOX, P.F; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.

GONYON, D. S.; MATHER, R. E.; HINES, H. C. Association of bovine blood and milk polymorphisms with lactation traits: Holsteins. **J. Dairy Sci.**, v.70, p. 2585-2598, 1987.

GROSCLAUDE, F. Le polymorphisme genetique des principales lactoproteines bovines. Relation avec la queantite, la compisition et les aptitudes fromageres du lait. **Inra Production Animales**.v.1, n.1, p. 5-17, 1988.

KAMINSKI, S. Bovine k-casein gene: molecular nature and application in dairy cattle breeding. **J. of Applied Genetics**, v.37, p.179-196, 1996.

LIN, C. Y.; McALLISTER, K. F.; NG-KWAIHANG, K. F. Relationships of milk protein types to lifetime performance. **J. Dairy Sci.**, v.72, p. 3085 - 3090, 1989.

McLEAN, D. M.; GRAHAM, E. R.; PONZONI, R. W. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. **J. Dairy Res.** v.51, n.4, p. 531-546, 1984.

NG-KWAI-HANG, K.F.; HAYES, J.F.; MOXLEY, J.E. Association of genetic variants of casein and milk serum protein with milk, fat and protein production by dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.835-840, 1984.

NG-KWAI-HANG, K.F., MONARDES, H.G. e HAYES, J.F. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits three lactations. **Journal of Dairy Science**, v.73, n12,p.3414-3420, 1990.

OJALA, M.; FAMULA, T.R.; MEDRANO, J.F. Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. **Journal of Dairy Dairy Science**, v. 80, n.8, p.1776-1785, 1997.

ONER, Y.; ELMACI, C.; Milk protein polymorphism in Holstein cattle. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 3. p.180-182, 2006

OTAVIANO, A. R. Polimorfismo dos genes das caseínas e sua utilização na detecção de misturas de leite bovino e bubalino **tese de mestrado pela Universidade Estadual Paulista – UNESP**, 2006.

PATERSON, G.R.; MACGIBBON, A.K.H.; HILL, J.P. Influence of kappa-casein and beta-lactoglobulin phenotype on the heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 9, n. 3-6, p.375-376, 1999.

PINDER, S.J., PERRI, B. N., SKIDMORE, C. J., SAVVA, D. Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of the polymerase chain reaction. **Animal Genetic.**, v. 22, p. 11-20, 1991.

POSTIGLIONO, A., RINCON, G., KELLY, L. et al. Biodiversidad genética en bovinos criolos del Uruguay, análisis con marcadores molecular. **Archivos De zootecnia.**, v51, p. 195-202, 2002.

PRATA, L.F. **Fundamentos de ciência do leite**. Jaboticabal, São Paulo: FUNEP/UNESP, 2001. 287p.

SABOUR, M.P.; LIN, C.Y.; KEOUGH, A. Effects of selection practiced on the frequencies of k-casein and β -Lactoglobulin genotypes in Canadian Artificial insemination Bulls. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.274-280, 1993.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações**, modificações. São Paulo: Editora-Livraria Varela, 1996. 517p.

SGARBIERI, V.C. Review: Structural and physicochemical properties of milk proteins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n.1, p. 43-56, 2005.

SMACHI, E.; GOBBETTI, M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. **Food Microbiology**, v. 17, p. 129 - 141, 2000.

SULIMOVA G. E., ABANI AZARI, M., ROSTAMZADEH, J. et al. Allelic polymorphism of kappa-casein gene (CSN3) in Russian cattle breeds and its informative value as a genetic marker. **Genetika**, v. 43(1), p. 88-95, 2007a.

TSIARAS, A.M; BARGOULI, G.G; BANOS, G.; BOSCOS, C.M. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive Performance of Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.1, p.327-334, 2005.

UFFO, O., MARTÍN-BURRIEL, I., MARTÍNEZ, R. et al. Caracterización genética de seis proteínas láteas em tres razas bovinas cubanas. **AGRI**, v. 39, p. 15-24, 2006.