

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DA BETA-LACTOGLOBULINA
EM BOVINOS HOLANDO-GIR NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

SORAYA FARIAS DE ANDRADE FREITAS

UFRPE-RECIFE
FEVEREIRO DE 2010

SORAYA FARIAS DE ANDRADE FREITAS

**ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DA BETA-LACTOGLOBULINA
EM BOVINOS HOLANDO-GIR NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre 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

FEVEREIRO DE 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

F866e Freitas, Soraya Farias de Andrade

Estudo do polimorfismo genético da beta-lactoglobulina em bovinos holando-gir no Estado de Pernambuco / Soraya Farias de Andrade Freitas. -- 2010.

61 f. : il.

Orientador: Severino Benone Paes Barbosa.
Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia, Recife, 2010.

Referências.

1. Leite 2. Proteína 3. PCR-RFLP 4. Girolando 5. Bovino
I. Barbosa, Severino Benone Paes, orientador II. Título

CDD 636.082

SORAYA FARIAS DE ANDRADE FREITAS

Dissertação intitulada **Estudo do Polimorfismo Genético da Beta-Lactoglobulina em Bovinos Holando-Gir no Estado de Pernambuco.**

Defendida e aprovada em 22/02/2010, pela Banca Examinadora.

Orientador:

Prof. Severino Benone Paes Barbosa
(Dsc. – UFRPE)

Comissão Examinadora:

Prof. Manoel Adrião Gomes Filho
(Dsc. – UFRPE)

Prof. Kléber Régis Santoro
(Dsc. - UFRPE/UAG)

Prof. Humberto Gonzalo Monardes
(Dsc. - McGill University, Canadá)

**RECIFE
2010**

BIOGRAFIA DA AUTORA

SORAYA FARIAS DE ANDRADE FREITAS, filha de José Afonso Farias de Freitas e 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. Em março de 2008, ingressou no programa de pós-graduação em Zootecnia, área de concentração Produção Animal. Em julho de 2008, concluiu o curso de Licenciatura em Ciências Agrícolas. Em agosto de 2009, ingressou na pós-graduação em Biologia Molecular, pela Universidade de Pernambuco - UPE. Em fevereiro de 2010, concluiu a pós-graduação 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.

Ao meu co-orientador, Prof. Manoel Adrião Gomes Filho, por toda orientação, paciência e preocupação desde o início desta pesquisa. Durante este período, o senhor se tornou um grande amigo.

Ao meu co-orientador, Prof. Kléber Régis Santoro, por me nortear nas inquietações.

Ao professor Humberto Monardes, pelos ensinamentos e pelo exemplo profissional a se seguir.

Às professoras Adriana Guim e Elisa Modesto, pois sem a eficiência delas, provavelmente não chegaria até o exato momento.

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

Aos amigos, Diogo, Jeisy, Dani, Elaine, Ana, Sandra e, em especial, Zoraide, por fazer do FAMA um ambiente maravilhoso todos os dias.

A Carlitcho, por tudo.

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.

À Fundação de Amparo à Ciência Pesquisa e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE –, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento da pesquisa.

Sumário

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Resumo..... | 13 |
| Abstract..... | 14 |
| 1. Introdução Geral..... | 15 |
| 2. Revisão de Literatura..... | 17 |
| 2.1 Classificação, Origem e Domesticação dos Bovinos..... | 17 |
| 2.2 As raças Gir e Holandesa..... | 20 |
| 2.2.1 A raça Holandesa..... | 20 |
| 2.2.2 A raça Gir..... | 21 |
| 2.3 O cruzamento Holando-Gir..... | 23 |
| 2.4 Qualidade do Leite e Fatores de Influência..... | 25 |
| 2.5 Polimorfismo Genético..... | 28 |
| 2.6 Beta-Lactoglobulina e seu polimorfismo | 31 |
| 3. Material e Métodos..... | 38 |
| 3.1 Rebanhos do estudo | 38 |
| 3.2 Grupos genéticos Holando-Gir..... | 38 |
| 3.3 Processamento das amostras de sangue, extração do DNA e verificação da sua integridade..... | 40 |
| 3.4 Genotipagem dos animais..... | 42 |
| 3.4.1 Reação de amplificação em cadeia de polimerase..... | 42 |
| 3.4.2 PCR-RFLP (Reação de polimerização em cadeia – Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição)..... | 44 |

| | |
|---|----|
| 3.5 Análise estatística..... | 45 |
| .3.5.1 Frequências Alélica e Genotípica..... | 45 |
| 3.5.2 Teorema de equilíbrio de Hardy-Weinber..... | 46 |
| 4. Resultados e Discussões..... | 47 |
| 5. Conclusões..... | 54 |
| 6. Referências Bibliográficas..... | 55 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura terciária da β -lactoglobulina..... | 34 |
| Figura 2. Distribuição dos grupos genéticos de bovinos Holando-Gir das propriedades em estudo..... | 39 |
| Figura 3. Fragmento de DNA amplificado do gene β -Lg..... | 44 |
| Figura 4. Padrão eletroforético PCR-RFLP..... | 47 |

Lista de Tabelas

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 1. | Posição dos Aminoácidos Variáveis..... | 33 |
| Tabela 2. | Protocolo mix de amplificação para o gene da B-Lg (volume final 25µl), pesquisa realizada no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada-FAMA em 2009..... | 43 |
| Tabela 3. | Programa de PCR (35 ciclos), pesquisa realizada no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada-FAMA em 2009..... | 43 |
| Tabela 4. | Distribuição das frequências genotípicas e alélicas da β-Lactoglobulina..... | 48 |

Resumo

O objetivo do presente estudo foi detectar o polimorfismo genético da β -Lactoglobulina (β -Lg) em diferentes grupos genéticos Holando-Gir. Foram coletadas 165 amostras de sangue de animais provenientes das fazendas experimentais do Instituto Agronômico de Pernambuco (Itambé e Arcoverde) e de uma propriedade particular, localizada na Zona da Mata Sul do estado. Os grupos genéticos encontrados foram 1/2, 3/4, 5/8 Holandês e 5/8 H bimestiço de 1^a, 2^a, 3^a, e 4^a geração. Para identificação dos genótipos, amplificou-se um fragmento localizado nas regiões dos éxons II e III do gene da β -Lg pela técnica de PCR. O produto da amplificação foi submetido à técnica de PCR-RFLP para digestão do fragmento pela endonuclease *HaeIII*, e gerou fragmentos de peso molecular de 400, 220, 190, e 151pb para todos os indivíduos, o equivalente ao genótipo heterozigoto (100% AB) da β -Lg. De acordo com o teste de qui-quadrado (χ^2), considerando as frequências genóticas observadas e esperadas da β -Lg, verificou-se que estas diferiram significativamente ($P < 0,05$), o que indica que o locus em estudo da amostra populacional não se encontra em equilíbrio genético pela lei de Hardy-Weinberg.

Palavras Chave: leite, proteína, PCR-RFLP

Abstract

The aim of the present work was to detect the genetic polymorphism of the β -Lactoglobulin (β -Lg) in different groups of Holstein-Gir breed cattle. There was collected 165 animals' blood samples from the experimental farms of the Instituto Agronômico de Pernambuco (Itambé e Arcoverde) and from a private farm located in Zona da Mata Sul in the state of Pernambuco. The genetic groups were 1/2, 3/4, 5/8 Holstein and 5/8 H 1st, 2nd, 3rd and 4th bi-crossbred generation. For the identification of genotypes, a located fragment was amplified in the areas of exons II and III of β -Lg gene using the PCR technique. The result of the amplification was submitted to the PCR-RFLP analysis to digest the fragment by *HaeIII* endonuclease and it produced fragments of 400, 220, 190, and 151pb molecular weight for all animals, equivalent to the heterozygous genotype (100% AB) of β -Lg. The Pearson's chi-square test (χ^2) and considering the observed and expected genotypic frequencies of the genotypes β -Lg. Was verified that frequencies differed significantly at the level tested ($P < 0,05$), indicating that the samples studied was not in Hardy-Weinberg equilibrium.

Keywords: milk, protein, PCR-RFLP

1. Introdução Geral

A produção nacional de leite, em sua maioria, é proveniente de rebanhos mestiços, com 80% de sua constituição racial de animais *Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus*, distribuída em vários grupos genéticos (MACHADO, 2001), com predominância do cruzamento entre as raças Holandesa e Gir (McMANUS et al., 2008).

O leite constitui-se, principalmente, por água (87,3%), suspensão coloidal de proteínas (3,4%), emulsão de glóbulos de gordura (3,5%), lactose (4,8%), sais minerais (0,8%) e vitaminas (0,2%).

Segundo Gigante & Costa (2008), o leite é composto por dois grupos de proteínas, que são classificadas em: caseínas (alfa_{s1}-caseína, alfa_{s2}-caseína, beta-caseína e kappa-caseína) e proteínas do soro (alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina).

A Beta-Lactoglobulina (β -Lg) representa em torno de 50% da proteína do soro e 12% da proteína total do leite bovino (FOX & McSWEENEY, 1998). É formada por uma sequência de 162 aminoácidos (HAMBLING et al., 1992), e segundo Hill et al. (1996), os principais genótipos da β -Lg (AA, AB, e BB) resultam em distintas codificações protéicas, propiciando variações nas propriedades físico-químicas e de composição do leite.

Com o uso da técnica de PCR-RFLP (Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo Fragmento de comprimento de restrição), grandes avanços foram obtidos com a finalidade de melhor detectar esses polimorfismos genéticos,

podendo combinar essa informação à técnicas tradicionais de seleção de animais em programas de melhoramento genético, otimizando, dessa forma, a Seleção Assistida por Marcadores – SAM (OLIVEIRA & CURI, 2008).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a existência de polimorfismo no gene da β -Lg em diferentes grupos genéticos de bovinos Holando-Gir, para utilização desses marcadores genéticos em programas de melhoramento animal.

2. Revisão de Literatura

2.1. Classificação, origem e domesticação dos bovinos

A evolução dos organismos na terra, paralelamente ao desenvolvimento intelectual da humanidade, permitiu o agrupamento dessas várias formas orgânicas ao longo do tempo. Vários estudos sobre os diversos sistemas de classificação de organismos, tanto do reino vegetal quanto animal, foram publicados e confrontados dentro do percurso histórico das ciências naturais.

No universo de formas orgânicas, os bovinos constituem os indivíduos agrupados no reino *Animalia*, alocados no filo *Chordata*, na classe *Mammalia*, subclasse *Ungulata*, da ordem *Artiodactyla*, sub-ordem *Ruminantia*, super família *Bovidea*, família *Bovidae* e sub-família *Bovinae* (DOMINGUES, 1960; SANTIAGO, 1960; SANTIAGO, 1985; SANTOS, 1990; JANECEK et al., 1996; JARDIM, 2001; EGITO, 2007). Esta classificação foi elaborada com base em diversos trabalhos encontrados na literatura. Entretanto, em 1758, Linneu, em sua obra *Systema Nature*, teria agrupado todos os bovídeos em um único gênero, o *Bos* (SANTIAGO, 1960).

Dentro da subfamília *Bovinae* encontram-se três tribos: *Bovini*, *Tragelaphini* e *Boselaphini*. Na tribo *Bovini*, de acordo com os diversos sistemas de classificação zoológica, estão dois dos principais gêneros das espécies domésticas de importância econômica: o *Bos* e o *Bubalus* (JANECEK et al., 1996).

Com relação à classificação zoológica das raças Holandesa e Gir, que

compõem o sistema de cruzamento de interesse desse estudo, estas encontram-se inseridas nos grupos taurino (*Bos taurus taurus*) e zebuínos (*Bos taurus indicus*), respectivamente (FAO, 2010), sendo, portanto, subespécies distintas.

Os taurinos são caracterizados morfologicamente por possuírem chifres geralmente curtos, pele clara, pelos longos, sendo uma espécie intensamente disseminada em regiões temperadas (EGITO, 2007).

Os zebuínos apresentam uma estrutura anatômica denominada giba ou cupim, e são ainda diferenciados morfologicamente por possuírem chifres curtos ou longos, pelos curtos e finos, barbela ampla, pele pigmentada e solta (DOMINGUES, 1973).

Os taurinos, mesmo oriundos de regiões com condições climáticas bastante discrepantes das áreas tropicais, continuam sendo introduzidos nessas áreas, seja nas formas de mestiços (zebu×taurino), de rebanhos puros por cruzamento (PC), puros de origem (PO), ou até mesmo na formação de raças brasileiras naturalizadas (EGITO, 2007).

Os resultados de diversos estudos atribuem a descendência de todos os Bovídeos a um tronco filogenético comum, o Antílope, animal que viveu na era terciária, nos períodos do Mioceno e Plioceno (DOMINGUES, 1960; SANTIAGO, 1985). Contudo, especificamente os bovinos são tidos como descendentes do Arouque ou Urus, identificado como *Bos primigenius* (DOMINGUES, 1973; SANTIAGO, 1985).

Os auroques eram animais cosmopolitas, ou seja, possuíam uma extensa área de distribuição geográfica, o que pode ter ocasionado a formação das subespécies bovinas e a origem de diversas raças que se encontram na

atualidade em localizações geográficas distintas (MachUGH et al., 1997).

Segundo Jardim (2001), o “boi primogênito” (Arouque) deu origem a algumas raças européias, como a raça Holandesa. Em relação ao *Bos taurus indicus*, sua origem não está esclarecida, porém acredita-se que sua ascendência é da forma primitiva *Bos nomadicus*, boi selvagem de fóssil encontrado na Índia (SANTIAGO, 1957; DOMINGUES, 1973).

A formação dos bovinos ocorreu na Ásia; sua expansão foi efetivada em épocas diferentes, relatando-se que sua domesticação teria ocorrido após o período neolítico (EGITO, 2007). Santiago (1957) e Domingues (1986) reportaram que a domesticação dos zebuínos parece ter sido posterior ou contemporânea à do bovino europeu, datando por volta de 3000 a.c.. Entretanto, em estudos mais avançados com associação de materiais arqueológicos e estudos de mtDNA (DNA mitocondrial), pôde-se comprovar que a domesticação dos zebuínos e taurinos ocorreu em regiões distintas e divergiram há mais de 610.000 anos (AZEVEDO et al., 2008).

Diante do que foi investigado na literatura, o que se pôde observar é que não existe uma hipótese conclusiva para se afirmar a real origem do *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Desta forma, Domingues (1960) concluiu que dentre os animais domésticos primitivos, essas duas subespécies bovinas são as de origem mais difícil de determinar, e relata ainda que, mesmo com a consulta de vários autores, não se encontrará uma harmonia de opiniões por conta de controvérsias.

Contudo, o maior interesse neste estudo é que essas duas subespécies (taurina e zebuína), desde as suas descobertas, originaram diversas raças utilizadas e pesquisadas em diversos setores da pecuária mundial. O estudo

das Raças Holandesa e Gir, destaques na pecuária leiteira nacional, é de grande importância por serem formadoras dos grupos genéticos desta pesquisa.

2.2. As raças Gir e Holandesa

A produção de leite nacional, em sua maioria, é proveniente de rebanhos mestiços, com 80% de sua constituição racial de animais *Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus* (MACHADO, 2001).

Dentre as raças oriundas das espécies citadas acima, a Gir e Holandesa foram introduzidas no Brasil por intermédio dos colonizadores, que as trouxeram da Península Ibérica (Espanha e Portugal), onde contribuíram, inclusive para a formação das raças crioulas nacionais (PRIMO, 1992).

2.2.1. A Raça Holandesa

A raça Holandesa formou-se na Europa há mais de 2000 anos, mais precisamente nos Países Baixos, região onde também foi domesticada (JARDIM, 2001; EGITO, 2007). É uma raça cosmopolita e recebe várias denominações onde é encontrada, como, Holstein Friesian (Estados Unidos), British Holstein ou British Friesian (Inglaterra) ou Holandesa, no Brasil (DOMINGUES, 1977).

A raça Holandesa teve sua genética melhorada em condições de clima temperado. Conseqüentemente, suas adaptações morfológicas e fisiológicas encontram-se em harmonia com esse ambiente (GIANNONI & GIANNONI, 1987).

A raça Holandesa é conhecida mundialmente por ser a maior produtora de leite dentre as raças bovinas (EGITO, 2007). Entretanto, Santiago (1984) afirma que ela não deve ser considerada apenas como exclusiva para produção de leite, pois seu desenvolvimento esquelético, muscular, além de sua boa conversão alimentar são características favoráveis para a produção de carne.

Todavia, Apesar de ser um excelente animal de produção, os indivíduos da raça Holandesa são altamente exigentes no que concerne à alimentação e ao manejo. Adaptam-se melhor em clima temperado, porém, nos cruzamentos com zebuíno, transmitem suas vantagens produtivas aos mestiços (JARDIM, 2001).

2.2.2. A Raça Gir

Originária da Índia, de regiões montanhosas e florestas do Kathiawar, mais precisamente no distrito de Gujarat (REIS FILHO, 2006), a raça foi se disseminando no percurso histórico, com as grandes invasões e navegações do homem.

A raça Gir foi formada em clima tropical, e, portanto, possui adaptações que facilitam sua sobrevivência no Brasil. No entanto, sofreu pouca seleção funcional, e foi aperfeiçoada para características raciais por meio do método de melhoramento pela seleção fenotípica (morfológica), o que levou à perfeição racial, mas deixou afastados os objetivos produtivos, como produção de leite e carne (GIANNONI & GIANNONI, 1987). Entretanto, foi a variedade bovina que atingiu o maior grau de pureza racial e gerou um grande volume de inscrições

nos livros de registro genealógico nacional (SANTIAGO, 1960).

O padrão brasileiro da raça Gir foi estabelecido através de criadores e de uma comissão técnica em 19 de outubro de 1938, sendo regulamentado pelo Departamento Nacional de Produção Animal, com a elaboração de um regulamento próprio no serviço de registro genealógico (SANTIAGO, 1957).

A raça Gir possui dentro de seu padrão racial animais de corpo longo, cilíndrico e compacto, pelugem variável com predominância de chita ou moura, amarela ou vermelha, em diversos tons. Em média, o tamanho das vacas é de 1,25m e peso de 500kg; touros com 1,30m e peso de 750kg. É uma boa raça produtora de carne, que quando selecionada para produção de leite, exibe grande potencial, comparado ao das demais fêmeas zebuínas, principalmente quando se encontra em cruzamento com o taurino (JARDIM, 2001).

Inicialmente, a raça Gir foi selecionada para produção de carne e chegou a ser a raça zebuína de maior número de indivíduos no país. Porém, a seleção para produção de leite (aptidão natural na Índia) surgiu para incrementar a pecuária leiteira nacional (REIS FILHO, 2006). Este fato resultou na raça que se encontra distribuída em torno de 80% nos rebanhos leiteiros nacionais, sejam eles puros ou cruzados (ALVES et al., 2004).

Reis Filho (2006) relata ainda que a raça Gir é a líder nacional no comércio de sêmen para o segmento leiteiro, com grande perspectiva para o mercado internacional.

2.3. O cruzamento Holando-Gir

Devido às altas radiações solares na faixa tropical, ocorre nesta região a predominância de elevadas temperaturas, sendo que nesta área se encontra 64% da população bovina do mundo e dois terços do território brasileiro (AZEVEDO et al., 2005). Devido a esse fato, Facó et al. (2005) justificaram a utilização em larga escala de cruzamentos de raças zebuínas com raças de origem europeia especializadas em produção de leite, nas regiões de clima tropical.

As raças especializadas possuem sérios problemas em se adaptarem à condições tropicais devido ao estresse térmico, presença de parasitas, baixa qualidade do alimento e manejo inadequado, o que dificulta desta forma a produção (FACÓ et al., 2005).

McManus et al. (2008) reforçaram as justificativas citadas acima e enfatizaram que as condições de pastagem com baixa tecnologia e baixo custo de produção são os principais fatores que influenciam a utilização de animais mestiços zebuínos, para uma maior produção de leite.

Além desses fatores ambientais, os acasalamentos entre taurinos e zebuínos se mostram vantajosos porque otimizam o uso de efeitos da heterose (não-aditivos) e efeitos de complementaridade de raças (aditivos) (BAKER et al., 1989; GUIMARÃES et al., 2002; FACÓ et al., 2008).

Os cruzamentos entre Holandês×Gir obtiveram significativo destaque dentro dos sistemas de produção de leite nacional, tanto que a Associação de Criadores em conjunto com o Ministério de Agricultura, regulamentaram a formação de uma raça sintética, a Girolando, originada de animais 5/8 Holandês + 3/8 Gir bi-Mestiço (BRASIL, 1992).

Em consequência da 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×Gir foram controlados (FACÓ et al., 2005), ampliando, desta forma, o banco de dados, que possibilitou a elaboração de diversas pesquisas sobre o desempenho zootécnico dos variados grupos.

Facó et al. (2002) compararam o desempenho produtivo dos grupos genéticos 1/4, 1/2, 5/8, 3/4, e 7/8 Holando×Gir em diferentes regimes de alimentação. Esses autores afirmaram haver um melhor desempenho dos grupos genéticos, com maior proporção de genes da raça holandesa no melhor regime de alimentação, e produções niveladas entre os grupos quando submetidos às piores condições de alimentação. Os mesmos autores (FACÓ et al., 2005) constataram tendência de elevação do intervalo de partos, à medida que aumenta a participação de genes da raça Holandesa. Em concordância, Guimarães et al. (2002) afirmaram haver menor eficiência reprodutiva para os animais Holandês-Puro por cruza, o que pode ser explicado pela maior sensibilidade às condições de manejo

Azevedo et al. (2005) estimaram valores críticos de índice de temperatura e umidade (ITU) e temperatura do globo negro (TGN) superiores para animais mestiços do que para animais puros de clima temperado, pelo fato dos primeiros serem mais adaptados as condições tropicais.

McManus et al. (2008), em pesquisa nas condições do cerrado brasileiro, concordam maiores durações de lactação para animais da raça Gir, porém, não suficientes para compensar a maior produção de leite média diária de grupos genéticos com maior proporção da raça Holandesa.

As observações relatadas acima fazem um resumo das diferentes respostas de desempenho produtivo e reprodutivo dos diversos grupos genéticos Holando×Gir, que compõem os rebanhos leiteiros nacionais. Porém, é necessário um perfil do desempenho em relação à qualidade do leite proveniente destes indivíduos.

2.4. Qualidade do leite e fatores de influência

O leite é um alimento de excelência, comprovado pelo seu valor nutritivo e funcional. Entretanto, é de alta perecibilidade e necessita de um custo elevado para sua conservação após o processo de produção (FERRAZ & MACHADO, 2001). Além disso, suas características físico-químicas e biológicas originais são alteradas por uma série de mecanismos que abrangem desde a produção primária, estendendo-se até a manipulação no processo industrial (LIMA, 2005). O leite de vacas sadias contém em média 87.1% de água (85,3-88,7), 4,0% de gordura (2,5-5,5%), 3,25% de proteína (2,3-4,4%), 4,6% de lactose (3,8-5,35), 0,7% de cinzas e vitaminas (GIGANTE & COSTA, 2008).

Com relação aos constituintes proteicos do leite, estes podem ser classificados em dois grupos: as caseínas e as proteínas do soro. De acordo com Prata (2001), as caseínas são sintetizadas nas células epiteliais da glândula mamária e constitui 80% da proteína total do leite e são as alfa_{s1}, alfa_{s2}, beta e kappa-caseína. Quanto às proteínas do soro, são quatro as principais classes, alfa-lactoalbumina, beta-lactoglobulina, albumina sérica e imunoglobulinas. As duas primeiras são sintetizadas na glândula mamária, e

as demais, originárias do sangue.

A lactose, outro constituinte do leite de grande importância nutricional é um dissacarídeo que se encontra em concentração aproximada de 4,8% no leite da espécie bovina, e sua síntese ocorre exclusivamente na glândula mamária (PRATA, 2001). Esse é o constituinte de menor variação do leite, ao contrário da proteína e gordura que possuem uma variação significativa (50%), em função da alimentação e fatores ambientais (FREDEEN, 1996).

A gordura é o componente do leite bovino de maior variação e se apresenta em uma porcentagem aproximada de 3,5%. Sua síntese ocorre na glândula mamária, a partir de ácidos graxos originários da corrente sanguínea e da própria glândula mamária (PRATA, 2001).

Em relação aos minerais que constituem o leite, a maioria encontra-se na forma de sais, que são oriundos do sangue e concentram-se em pequenas quantidades (0,8%) no leite. Esses minerais encontram-se na forma de sulfato (100 mg/L), bicarbonato de sódio (500 mg/L), potássio (1450 mg/L), cálcio (1200 mg/L) e magnésio (130 mg/L) (LIMA, 2005).

Outro grupo presente no leite, também em menor quantidade, porém de grande importância à saúde humana, é o grupo das vitaminas do leite, com destaque para vitamina C, já que o leite é fonte de origem animal mais rica nessa vitamina (BOTARO, 2007).

Apesar da importância nutricional e funcional de todos esses constituintes, segundo Madalena (2000) os componentes gordura e proteína são considerados 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.

Devido a esses fatos, o estudo de todos os fatores que alteram a produção e composição química e biológica do leite se torna de grande relevância no contexto econômico e de segurança alimentar. Alguns desses fatores como condições nutricionais, diferenças entre raças, idade do animal, sazonalidade, sanidade, estágio de lactação, ordenhas (número e intervalo), individualidade do animal ou sua fisiologia e possíveis adulterações. Porém Dürr (2004) relata que as concentrações de gordura e proteína variam principalmente em função do manejo nutricional e pela exploração do potencial genético dos animais.

Assim, como principal fator do presente estudo têm-se os efeitos das diferenças genéticas, que são as 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).

Para promover melhorias genéticas nessas características, pesquisas no ramo da biologia molecular têm possibilitado realizar o mapeamento e identificação dos genes responsáveis por essas variações na constituição do leite, facilitando desta forma, o processo de seleção dos animais, baseada na caracterização genotípica (REGITANO & COUTINHO, 2001).

Os polimorfismos genéticos que codificam as principais proteínas do leite, como as caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β e k-caseína), β -Lg e α -lactoalbumina, tornaram-se marcadores de interesse à produção, composição e beneficiamento do leite. Alguns desses marcadores já estão disponíveis ou bastante próximos da aplicação comercial nos rebanhos leiteiros e na indústria de produtos lácteos, como é o caso da β -Lg (REGITANO & COUTINHO, 2001).

2.5. Polimorfismo genético

O futuro da pecuária nacional e seu progresso genético estão intensamente relacionados à variabilidade genética dos animais que os compõe (EGITO et al., 2004). Essa variabilidade genética se expressa nas diferenças das raças, tipos e na variação individual. Esta última é possível de se identificar a nível molecular, em que as metodologias de melhoramento genético clássico não conseguem detectar.

Os polimorfismos genéticos são constantemente associados às características de interesse zootécnico, como por exemplo, o peso em determinada fase de desenvolvimento do animal (PAZ et al., 2004), genótipos superiores para a produção e composição do leite, além de serem utilizados na detecção de doenças e genótipos resistentes à doenças; mapeamento genômico, etc (REGITANO & COUTINHO, 2001).

A identificação de polimorfismos pode ser utilizada para caracterização genética, importante tanto para programas de melhoramento genético animal quanto para os programas de conservação de recursos genéticos, pois avalia a distância entre as populações em estudo e pode ser uma ferramenta na seleção dos animais a serem utilizados na conservação *ex situ* e *in situ*, mediante a estimação de índices de similaridade entre os indivíduos em estudo (SPRITZE et al., 2003). Além disso, permite a formação de acasalamentos ou cruzamentos que sejam favoráveis para que se mantenha a máxima variabilidade genética (EGITO et al., 2001).

A maioria das características de interesse econômico requer avaliação minuciosa, sendo o mérito genético da vaca conhecido apenas quando ela

conclui sua primeira lactação, ou para os machos, quando se obtêm os dados de sua progênie (CONCEIÇÃO et al., 2000).

Para isso, 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 não são afetados pelo meio e podem ser utilizados precocemente, até mesmo na fase embrionária (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

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).

Todavia, quando o objetivo da caracterização genética é o melhoramento animal, apenas ser um marcador molecular não é suficiente para que se obtenha esse progresso. Nesse caso, ele deve obedecer às leis de herança mendeliana (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; OLIVEIRA & CURI, 2008; BORÉM & CAIXETA, 2009), ou seja, que a herança genética dos pais seja transmitida às futuras gerações, sendo então, desta forma, denominados de Marcadores Genéticos.

Marcadores genéticos são características de herança simples que permitem a inferência do genótipo a partir do fenótipo do indivíduo, fornecendo informações importantes para análise genética de uma espécie (OLIVEIRA & CURI, 2008).

Na identificação da variabilidade genética, os marcadores ideais atendem a determinadas exigências: elevada capacidade de detecção em diferentes níveis de polimorfismo, alta herdabilidade, capacidade de abranger

todas as regiões do genoma, identificação independente do estágio de desenvolvimento do indivíduo, facilidade de obtenção, independente das condições ambientais, ser possível de determinação em qualquer tipo de célula e que utilize métodos econômicos para identificação (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

O aprimoramento na seleção genética pode ser obtido pela utilização de novas técnicas para detecção desses marcadores genéticos, que resultam em sua maioria em aumento na produção de leite e melhorias na sua composição (FRANCO & MELO, 2006).

A caracterização do polimorfismo de DNA tornou-se possível com a 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 alterações nos sítios de restrição na sequência de DNA, sejam na posição, presença ou ausência destes são decorrentes das mudanças nos nucleotídeos (mutações), sejam elas causadas por inserções, deleções ou outros rearranjos ao longo da sequência de DNA (BORÉM & CAIXETA, 2009). Essas mutações são reconhecidas e clivadas pelas endonucleases, o que pode variar entre os diferentes indivíduos, gerando desta forma o polimorfismo genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). As diferenças nos padrões

de digestão das endonucleases podem ser visualizadas nos diferentes tipos gel de eletroforese (agarose, amido, poliacrilamida, etc).

Os marcadores RFLP constituem um dos grupos mais utilizados em melhoramento genético de plantas e animais e, com o surgimento da técnica de PCR, possibilitou a associação das duas técnicas resultando em análises PCR-RFLP (BORÉM & CAIXETA, 2009).

Essas informações do polimorfismo genético combinadas às técnicas tradicionais de seleção animal em programas de melhoramento genético, denomina-se Seleção Assistida por Marcadores – SAM (OLIVEIRA & CURI, 2008).

Segundo Garcia & Porto-Neto (2006), nestes programas de seleção o uso de marcadores genéticos pode ser um potencial para o progresso genético, sendo os polimorfismos da k-cn e β -Lg os marcadores genéticos de maior interesse em rebanhos leiteiros para o processamento dos lácteos.

2.6. Beta-lactoglobulina e seu polimorfismo

As proteínas do soro do leite bovino possuem elevado valor nutritivo, pois apresentam alta digestibilidade, excelente composição de aminoácidos e biodisponibilidade destes constituintes (SGARBIERI, 1996).

A β -Lg pertence à família das lipocalinas, possui a forma de cálice, é de caráter hidrofóbico, de grande utilidade na indústria alimentícia, com capacidade de emulsificação, geleificação, formação de espuma e ligação de aroma e sabor, que são características de importância para o beneficiamento dos lácteos na indústria (SGARBIERI, 2005). Essa família de proteínas é

responsável pelo transporte de moléculas e possui baixa identidade sequencial e alta similaridade estrutural (OLIVEIRA, 1999).

A β -Lg compõe um grupo diversificado de proteínas com estruturas diferenciadas entre si e se apresentam em quantidades variadas no leite de diferentes espécies (OLIVEIRA, 1999).

Em estudo comparativo realizado entre o leite bovino e o humano, observou-se que no leite de vaca as porcentagens de caseína e proteína do soro são de aproximadamente 80 e 20% respectivamente. Entretanto, pode-se observar a relação inversa para o leite humano. Além disso, no leite humano, a presença da β -Lg é considerada desprezível (SGARBIERI, 2005) ou inexistente (BOTARO et al., 2007).

A β -Lg bovina é uma proteína globular que representa 50% da proteína total do soro e 12% da proteína total do leite (FOX & McSWENWEY, 1998). É sintetizada na glândula mamária e é formada por 162 resíduos de aminoácidos (HAMBLING et al., 1992; SGARBIERI, 2005; UFFO et al., 2006); apresenta-se na natureza na forma de dímeros e monômeros (OLIVEIRA, 1999), com peso molecular de aproximadamente 18,4 kDa (OLIVEIRA, 1999; UFFO et al., 2006; BOTARO et al., 2007).

Ao utilizar a técnica de eletroforese em papel, em pH 8,6, Aschaffenburg e Drewry, em 1955, demonstraram pela primeira vez a existência de polimorfismo da β -Lg (BOTARO et al., 2007), e a partir deste trabalho, atualmente várias pesquisas foram realizadas com o intuito de identificar mais variantes dessa proteína. Atualmente, cerca de 12 variantes genéticas foram descobertas, onde as mais frequentes são as variantes A e B na espécie bovina (GROSCLAUDE et al., 1976). O gene dessa proteína possui uma

unidade de transcrição de aproximadamente 5kb de longitude e contém seis introns (UFFO et al. 2006).

Segundo Medrano & Aguilar-Córdova (1990), as variantes A e B da β -LG diferem entre si na substituição dos aminoácidos na cadeia polipeptídica, sendo estas, originadas pela substituição de nucleotídeos na fita de DNA (TABELA 1).

Tabela 1. Posição dos Aminoácidos Variáveis

| β -LG | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66... | 117 | 118 |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|--------|-----|------------|
| Sequência Nucleotídica | | | | | | | | GAT | | | | GTC |
| A | Leu | Leu | Gln | Lis | Trp | Gln | Asn | Asp | Glu | Cis... | Leu | Val |
| B | Leu | Leu | Gln | Lis | Trp | Gln | Asn | Gli | Glu | Cis... | Leu | Ala |
| Sequência Nucleotídica | | | | | | | | GGT | | | | GCC |

Fonte: Adaptada de Hill (1996)

Medrano & Aguilar-Córdova (1990) relataram que as substituições ocorrem nas posições 64 e 118 da β -Lg. Na posição 64 ocorre a troca da Adenina pela Guanina, que conseqüentemente, ocasiona a troca do aminoácido Ácido Aspártico (Asp) pelo aminoácido Glicina (Gli). Na posição 118 ocorre a troca de uma Timina por uma Citosina, resultando na substituição do aminoácido Valina (Val) pelo aminoácido Alanina (Ala). Esses mesmos autores informaram que esta última substituição pode ser criada no sítio de restrição da endonuclease *HaeIII*, o que permite análise de RFLP no *locus* da β -Lg. A Figura 1 ilustra a estrutura terciária da β -Lg (Sgarbieri, 2005).

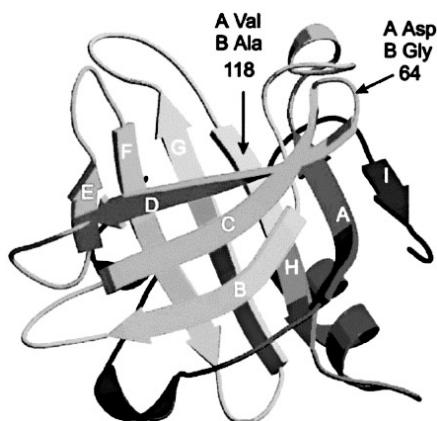


Figura 1. Estrutura terciária da β -lactoglobulina mostrando as variantes genéticas com substituições nos resíduos 64 a 118. Fonte: Sgarbieri (2005).

Com relação à estrutura da β -Lg, Sgarbieri (2005) relata que esta se mantém estável em uma ampla faixa de pH, porém apresenta diversas associações em sua estrutura nas diferentes faixas. As transições na estrutura da β -Lg induzidas pelo pH variam de 1 a 13. Na faixa de 1,0 a 2,0 a β -Lg sofre mudanças estruturais, porém mantém sua estrutura secundária; na faixa de 2,5 a 4,0 ocorre a passagem de dímero para monômero; em pH entre 4,5 a 6,0 ocorrem pequenas mudanças em sua estrutura terciária, sem alteração significativa na estrutura secundária; entre pH 6,5 e 8,5 ocorre a transição de Tanford, caracterizada pela exposição de um grupo carboxila e modificações nas vizinhanças de um resíduo de tirosina (OLIVEIRA, 1999), que alteram as estruturas secundária e terciária. Entretanto, nesta faixa não ocorre mudança na conformação global da proteína; a quinta transição situa-se entre os pHs 9 e 12,5, sendo caracterizada pela desnaturação alcalina, que ocasiona a quebra das ligações diméricas, transformando em monômeros desdobrados (SGARBIERI, 2005), sendo esta última, irreversível.

A β -Lg é uma proteína que também sofre com a ação de altas temperaturas, ocorrendo desde a perda de solubilidade até a exposição de

regiões de associação a outras moléculas. Em temperaturas em torno de 50°C, as modificações são reversíveis, porém, acima de 65-70°C são irreversíveis (SGARBIERI, 2005). As implicações dessa propriedade, segundo Botaro et al. (2007), acontecem durante o processamento do leite na indústria, já que a β -Lg é considerada a responsável pelo processo de agregação, que leva à obstrução e ineficácia dos trocadores de calor (SGARBIERI, 2005).

As funções biológicas da β -Lg ainda são imprecisas, porém, alguns autores informam que esta proteína é encarregada de se unir ao retinol (Vitamina A) para realizar seu transporte e aproveitamento no organismo (OLIVEIRA, 1999; UFFO et al., 2006; BOTARO et al., 2007). Além disso, acredita-se que a β -Lg participe do metabolismo do fosfato na glândula mamária (KONTOPIDIS et al., 2004).

Os polimorfismos genéticos da β -Lg se expressam em pequenas variações na estrutura primária das proteínas que estes codificam. Essas variações no fenótipo da β -Lg estão associadas às propriedades físico-químicas de interesse da indústria (HILL et al., 1996). Pesquisas relacionadas a associações dos diferentes genótipos oriundos das variantes genéticas da β -Lg (A e B) são executadas.

A fração caseínica do leite é uma característica de grande relevância na fabricação de lácteos, já que a caseína é a principal porção proteica envolvida no maior rendimento na produção de queijos (EMMONS et al., 2003). Robitaille et al. (2002) relataram menor concentração de caseínas, menor de α -lactalbumina (25%) e maior proporção de β -Lg no soro (20,5%) do leite de animais homozigotos AA em relação ao BB.

Ao avaliar o efeito dos diferentes genótipos da β -Lg sobre o conteúdo dos diferentes componentes do leite, Lunden et al. (1997) observaram o efeito do polimorfismo da β -Lg sobre o conteúdo de caseína e na relação caseína: proteína total, sendo o genótipo BB superior em relação aos demais (AA e AB).

Aleandri et al. (1990) estimaram os efeitos dos genótipos dos diferentes *locus* das proteínas do leite para o rendimento de queijo parmesão e verificaram maior produção de proteína do soro associada ao genótipo AA, determinando 12% a mais de gordura para o genótipo BB da β -Lg em relação aos demais genótipos. Esse resultado pode melhorar o rendimento do queijo, devendo, segundo estes autores, evitar o genótipo AA, devido a sua associação à maior fração da proteína do soro, o que não está necessariamente relacionado com maior conteúdo de caseínas e, conseqüentemente, menor rendimento lácteo.

Celik (2003) observou efeito significativo dos genótipos da β -Lg sobre alguns constituintes do leite. Como resultado, o pesquisador observou maior produção de sólidos totais e gordura do leite de genótipos BB em relação aos demais (AA e AB). Este autor não observou efeito significativo para cinzas e lactose, mas verificou maior conteúdo de proteína e sólidos não-gordurosos para o genótipo AB em relação aos demais (AA e BB).

Entretanto Ng-Kwai-Hang (1998) e Botaro et al. (2007) não detectaram diferenças significativas no desempenho do leite produzido pelos animais dos três genótipos da β -Lg (AA, AB e BB).

Ng-Kwai-Hang (1997) em trabalhos sobre a β -lactoglobulina afirmou que a relação da produção de leite com os polimorfismos genéticos da β -Lg ainda não é consistente, o que pode ser justificado por diversos fatores. Contudo,

destaca-se a rigorosidade da análise estatística para o ajuste dos fatores que influenciam, principalmente, a produção de leite, sendo o processo da genotipagem a etapa inicial para estes estudos.

3. Material e Métodos

3.1. Rebanhos do estudo

Durante o período de maio de 2008 a agosto de 2009 foram coletadas, aleatoriamente, 165 amostras de sangue de bovinos Holando-Gir (6 machos e 159 fêmeas), incluindo as categorias bezerro (a), novilha e reprodutores. Do total coletado, 58 amostras de sangue foram provenientes da Propriedade 1, 74 originárias da Propriedade 2, e 33 amostras oriundas da Propriedade 3. Essa amostragem foi proveniente de duas fazendas experimentais localizadas na Zona-da-Mata Norte e Agreste do Estado de Pernambuco (Instituto Agronômico de Pernambuco/IPA de Itambé e Arcoverde), denominadas neste estudo como Propriedades 1 e 2, e uma propriedade particular localizada no município de Paudalho (Propriedade 3), Zona-da-Mata Norte do estado. Em todas as fazendas, os animais eram submetidos ao sistema semi-intensivo de criação.

3.2. Grupos genéticos Holando-Gir genotipados

Para identificação e distribuição dos diferentes grupos genéticos Holando-Gir, foram obtidas as informações contidas nas fichas de genealogia de cada propriedade. As fichas das Propriedades 1 e 2 seguem o mesmo padrão, contendo as seguintes informações: a identificação do animal (nome, código e número do registro da associação de criadores da raça Girolando), data de nascimento, sexo, ordem de geração, identificação dos pais, data do

último parto e dados individuais das últimas pesagens. As informações concedidas pela Propriedade 3 foram o código e grupo genético do animal.

Na Figura 2, encontram-se as distribuições dos diferentes grupos genéticos dos animais genotipados.

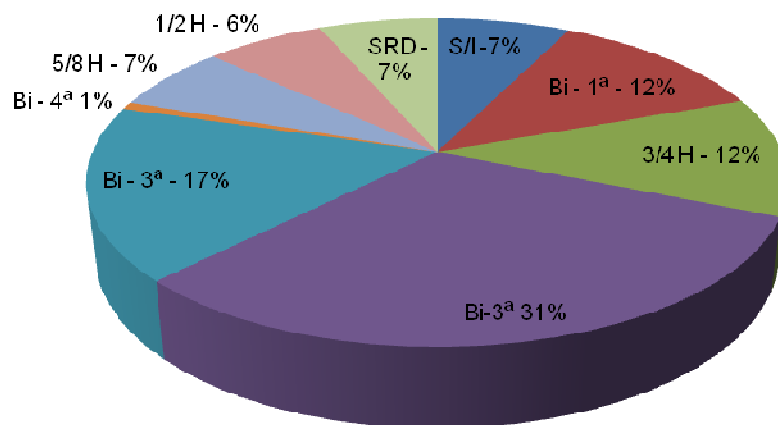


Figura 2. Distribuição dos grupos genéticos Holando-Gir da amostragem proveniente da Zona da Mata e Agreste de Pernambuco.

Foi observada a presença dos seguintes grupos genéticos Holando-Gir: 1/2, 3/4, 5/8, Holandês e 5/8H bimestiço de 1^a, 2^a, 3^a, e 4^a geração.

O grupo 1/2H apresentou um percentual de 6% no número total de indivíduos estudados, sendo esses provenientes da Propriedade 3. Os grupos 3/4H e 5/8H apresentaram os percentuais de 12% e 7%, respectivamente.

Nessa mesma figura, pode-se observar ainda que aproximadamente 61% do total de animais correspondem ao padrão racial Girolando (bimestiços de 1^a, 2^a, 3^a, e 4^a geração), sendo todos provenientes das propriedades 1 e 2.

Com relação aos indivíduos sem padrão racial definido (SRD) e sem identificação, ambos apresentaram um percentual de 7% cada, e

correspondem aos animais que não possuem, respectivamente, a informação de um de seus genitores e escrituração zootécnica, condição que impossibilita a identificação do grupo genético destes indivíduos.

3.3. Processamento das amostras de sangue, extração do DNA e verificação da sua integridade

Para a coleta de sangue foram utilizados tubos a vácuo de 10 ml, contendo o anticoagulante Citrato de sódio. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas imediatamente em recipiente contendo gelo e levadas ao Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada - UFRPE.

Antecedendo a extração do DNA, procedeu-se a obtenção dos leucócitos, por meio da centrifugação do sangue a 3000 rpm por cinco minutos. Com o auxílio de uma pipeta, retirou-se a fração do soro e, posteriormente, a camada das células brancas (leucócitos) foi aspirada e acondicionada em tubo de polipropileno (identificado), armazenada, em seguida, a -20°C.

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo modificado de Sambrook et al. (1989), e obedeceu as seguintes etapas: em um tubo de polipropileno de 1,5ml, devidamente identificado, foi adicionado 100µl da amostra de leucócito, 100µl de TE (Tris 10mM – EDTA 1Mm pH 8,0) e 100µl de fenol equilibrado pH 8,0; a amostra foi mixada por 1 minuto em um vórtex, e em seguida, centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo, devidamente identificado e adicionado 100µl de fenol-cloroformio (1:1). A amostra foi misturada por 1 minuto e centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para

outro tubo de polipropileno, devidamente identificado e foi adicionado: 1º - 10µl de acetato de amônia 3M; 2º - 100µl do sobrenadante do tubo anterior (onde se encontra os DNAs) e 3º - 100µl de isopropanol. A amostra foi novamente mixada por 1 minuto e incubada por, no mínimo, 60 minutos a 4°C. Foi adicionado etanol a 70% e, posteriormente, centrifugada, sendo o etanol desprezado e as amostras secas com o auxílio de um secador para obtenção apenas dos *pellets*. Em seguida, estes foram ressuspensos em 30µl de água ultra pura e armazenados em geladeira a - 20°C.

Posteriormente às extrações dos DNAs, foi verificada a integridade deste em relação aos aspectos qualitativos (visualização em gel de agarose) e quantitativos (leitura em espectrofotômetro). Para avaliação qualitativa, procedeu a eletroforese de uma alíquota de 5µl de DNA de cada amostra em gel de agarose, a uma concentração de 0.8%, em tampão de TBE (Tris Borato de EDTA). Para coloração das bandas foi utilizado 0,2µl do intercalante de DNA (Blue Green Loading Dye I) e, posteriormente, efetuada a visualização em um transluminador de luz ultravioleta, sendo em seguida foto documentado.

Na verificação quantitativa foram realizadas em espectrofotômetro duas leituras de uma alíquota (5µl) da amostra de DNA extraído, diluída em 495µl de água ultra pura, para obtenção do valor do DNA (µg/ml). Com o valor médio das leituras do DNA (µg/ml) foram realizados os cálculos de diluição das amostras para que estas apresentassem uma concentração de 100ng/µl de DNA em um volume final de 20µl.

3.4. Genotipagem dos animais

3.4.1. Reação de amplificação em cadeia de polimerase (PCR)

Foram realizados vários testes preliminares da PCR, que objetivaram otimizar os protocolos de amplificação e programação do termociclo para o fragmento do gene da β -Lg, localizado nas regiões do éxon II e III do gene desta proteína. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador (Biocycler) com uma concentração de 100ng/ μ l de DNA. Utilizaram-se sequências de *primers* descritas por Faria et al. (2000):

Fita Forward

5'- ACCTGGAGATCCTGCTGCAGAAATG - 3'

Fita Reverse

5' – CATCGATCTTGAACACCGCAGGGAT - 3'

Os *primers* amplificaram uma sequência de 961 pares de base do gene da β -Lg.

Os protocolos de amplificação e programação do termociclo para uma reação com produto final de 25 μ l da PCR, encontram-se descritos nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 – Protocolo mix de amplificação para o fragmento gênico localizado nos exons II e III da β -Lg (volume final 25 μ l).

| Reagentes | Volume (μ l) |
|---|-------------------|
| H ₂ O ultra pura | 15,325 |
| Tampão PCR 1X (KCl 500 mM, Tris-Cl pH 8.3 100 mM) | 2,0 |
| MgCl ₂ (Platinum®) | 0,375 |
| Primers (Invitrogen®) | 0,2 |
| DNTP (0,125 Mm) | 2,0 |
| Taq Polimerase Platinum® (unidade/ μ l) | 0,1 |
| DNA | 5,0 |

Tabela 3 – Programa da PCR (35 ciclos) para o fragmento gênico localizado nos exons II e III da β -Lg.

| Etapas da PCR | Tempo (minutos) | Temperatura °C |
|--|-----------------|----------------|
| Etapa 1 (desnaturação inicial) | 5 | 95 |
| Etapa 2 (desnaturação) | 1 | 95 |
| Etapa 3 (anelamento dos <i>primers</i>) | 1 | 57 |
| Etapa 4 (extensão das fitas) | 1 | 72 |
| Etapa 5 (repetir etapas 2 a 4 35 vezes) | - | - |
| Etapa 6 (extensão final) | 5 | 72 |
| Etapa 7 | ∞ | 4 |

O produto das ampliações foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, durante duas horas. Para colora o das bandas foi utilizado intercalante de DNA (Blue Green Loading Dye I). O tamanho dos fragmentos

amplificados foi estimado utilizando-se marcador de pares de base (100kb DNA ladder), sendo os amplicons visualizados no transluminador a luz ultravioleta, e em seguida foto documentados (FIGURA 3).

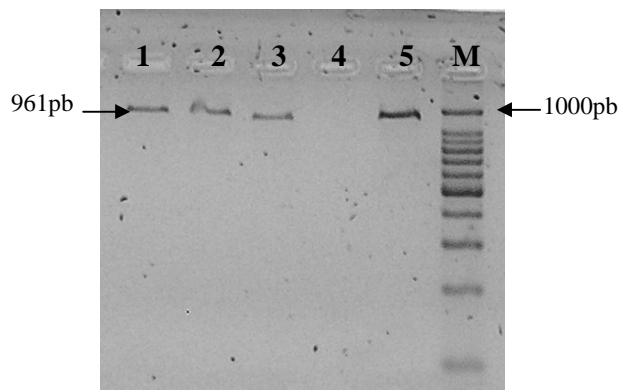


Figura 3. Fragmento de DNA amplificado (961pb), contendo a região do gene β -Lactoglobulina bovina, do exon II ao III. M: Marcador DNA-Ladder100pb. Grupo Genético: Linha 1 Bi-I; 2 Bi-II; 3 Bi-III; 4 controle negativo; 5 - 5/8.

3.4.2. PCR-RFLP (Reação de polimerização em cadeia – Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição)

Confirmada a amplificação, o produto da PCR foi submetido à técnica de RFLP, a partir da digestão pela endonuclease *HaeIII*, de acordo com o seguinte protocolo (cada reação): Tampão 1,5 μ l, enzima 0,2 μ l, produto da PCR 5,0 μ l, e acrescentado água ultra pura para completar o produto final de 15 μ l. A digestão ocorreu a 37°C por 4 horas em termociclador (Biocycler). Segundo Medrano e Aguilar-Córdova (1990), a enzima *HaeIII* reconhece o seguinte sítio de restrição: AGG \downarrow CCT / TCC \downarrow GGA. Em seguida, procedeu-se a eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 2 horas. Posteriormente foram verificados

fragmentos gerados do gene da β -Lg bovina, identificando, assim o genótipo presente na amostragem estudada.

3.5. Análise estatística

Para os resultados de polimorfismo foram utilizados análises descritivas e de dispersão de frequências dos alelos, que foram calculadas por meio de contagem direta, a partir do genótipo identificado na foto documentação da eletroforese da PCR-RFLP.

3.5.1 Frequências genotípica e alélica

As frequências genotípica (xii) e alélicas (xi) da amostra populacional para o fragmento gênico da β -Lg foram estabelecidas pelas equações a seguir:

$$x_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n}$$

Onde n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados no gene i , respectivamente; n corresponde ao número total de indivíduos de acordo com Otaviano (2006).

3.5.2. Teorema de equilíbrio genético de Hardy-Weinberg

Para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizou-se a equação abaixo.

$$(A + B)^2 = A^2 + 2AB + B^2$$

Onde A^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo A; $2AB$ = frequência esperada para heterozigotos AB; B^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo B.

4. Resultados e Discussões

Os produtos da digestão do fragmento gênico da β -Lg (conforme as páginas 42 e 43) geraram o mesmo padrão eletroforético para todos os indivíduos, com fragmentos de peso molecular 400, 220, 190, e 151pb, o equivalente ao genótipo heterozigoto (AB) da β -Lg (FIGURA 4).

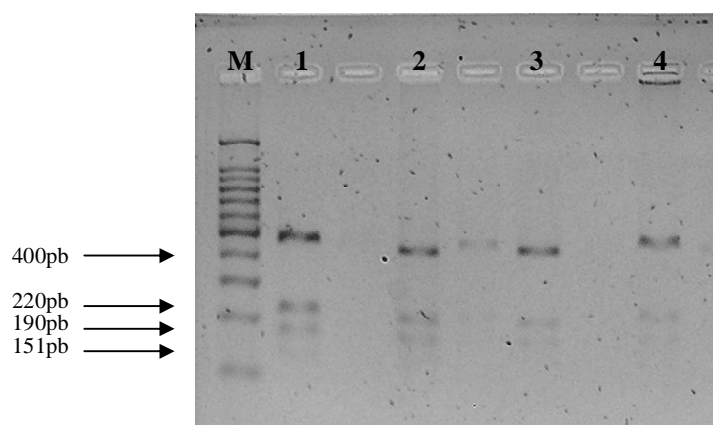


Figura 4. Padrão eletroforético obtido pela digestão da endonuclease *HaeIII*. Região do fragmento gênico da β -Lactoglobulina bovina, localizado nos exons II e III. M: Marcador DNA- Ladder 100pb; Animais 1- 5/8; 2- BI-I; 3- BI-III; 4- BI-II

Em todos os padrões eletroforéticos encontrou-se um fragmento constante de 400pb, o que comprovou a eficácia da digestão pela endonuclease *HaeIII*. Além disso, como forma de controle da digestão enzimática, sempre se adicionava uma amostra não digerida.

As frequências alélicas de A e B foram de 0,5 para cada alelo. A distribuição das frequências genotípica e alélicas do gene da β -Lg observada nos grupos genéticos Holando-Gir, encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas da β -Lactoglobulina.

| Genótipo | Frequência Genotípica (%) | N Observado | N Esperado | χ^2 | Frequência Alélica ($\pm\sigma$) |
|----------|---------------------------|-------------|------------|----------|------------------------------------|
| AA | - | - | 41.25 | | A 0,5 \pm 0,039 |
| AB | 100 | 165 | 82.5 | 165,0* | |
| BB | - | - | 41.25 | | B 0,5 \pm 0,039 |
| Total | | 165 | | | |

* $P < 0,05$

De acordo com o teste de qui-quadrado (χ^2), considerando as frequências genótípicas observadas e esperadas da β -Lg, verificou-se que estas diferiram significativamente ($P < 0,05$), o que indica que nesta amostra populacional o *locus* gênico da β -Lg não se encontra em equilíbrio genético pela lei de Hardy-Weinberg. Este fato pode ser justificado pela existência de fatores evolutivos que atuam sobre esta população (BEIGUELMAN, 2008).

Os resultados referentes às frequências genótípicas observadas da β -Lg deste estudo apresentaram discordância com relação a outros encontrados na literatura, que na sua maioria, verifica-se a presença dos três genótipos (AA, AB e BB). Entretanto, nesta pesquisa detectou-se apenas o genótipo heterozigoto (AB), portanto, pode estar sob a ação de forças seletivas (seleção artificial), pois faltam os genótipos homozigotos, AA e BB, que se esperavam (GIANNONI & GIANNONI, 1983).

Ng-Kwai-Hang et al. (1984); Gonyon et al. (1987); Ng-Kwai-Hang et al. (1990), ao associarem o efeito do polimorfismo genético da β -Lg com a produção de proteína e gordura do leite em bovinos holandeses (*Bos taurus taurus*), detectaram a presença dos três genótipos AA, AB e BB, com maior

frequência do genótipo AB (50,54%; 49,76% e 49,31%, respectivos autores) em relação aos demais (AA e BB).

Aleandri et al. (1990) estimaram o efeito dos genótipos da β -Lg em vacas holandesas sobre a manufatura de queijos e observaram maior frequência para o genótipo AB (47,7%) em relação ao genótipo BB (35,1%), e frequências alélicas de 40,95% para o A e 58,95% para B. Eenennaam & Medrano (1991) estudaram o mesmo polimorfismo genético, também em taurinos, e detectaram o maior percentual de animais heterozigotos, além de frequências alélicas de 43 e 57% para os alelos A e B, respectivamente.

As frequências observadas no trabalho de Sabour et al. (1993) ao estudarem o polimorfismo da β -Lg mostram maior frequência do genótipo AB em animais da raça Holandesa (42%), Ayrshire (49%) e Jersey (45%), em relação aos genótipos AA, e BB.

Hill et al. (1996) e Paterson et. al. (1999), em pesquisas com as raças Holandesa e Jersey na Nova Zelândia, verificaram que maior frequência do genótipo AB da β -Lg (aproximadamente 51 e 43%, respectivamente), para ambas as raças em comparação aos outros genótipos encontrados (AA e BB), com a predominância do alelo B. Na pesquisa realizada por Ojala et al. (1997) detectou-se também em animais das raças Jersey e Holandesa, na Califórnia-EUA, frequência superior para o genótipo AB (51 e 58%, respectivamente) nas duas raças.

Celik (2003) em estudo com a raça Pardo-Suiça na Europa, observou a mesma tendência de maior proporção genotípica AB (53,79%), com predominância do alelo B (56%) em relação ao A.

Tsiaras et al. (2005) determinaram o efeito dos genótipos da β -Lg sobre

características de produção e desempenho reprodutivo em vacas holandesas. Identificaram também maior percentual do genótipo AB, em relação aos demais genótipos (AA e BB).

Em uma pesquisa realizada na Turquia por Oner & Elmaci (2006), determinou-se a variabilidade genética no *locus* da β -Lg, sendo também observada a maior frequência do genótipo AB (48,2%).

Ao associar o polimorfismo do gene da β -Lg com a produção de leite de 70 animais Girolando F1, Rodrigues (2006) realizou um levantamento das frequências genótípicas e alélicas deste polimorfismo, e relatou a predominância do genótipo AB (57,14%), em relação aos genótipos BB (35,71%) e AA (7,14%), e encontrou frequências alélicas de 64 e 36% para A e B, respectivamente.

Outros estudos que envolvem a identificação da variabilidade genética no *locus* da β -Lg foram efetuados por Neves et al. (1998) com vacas da espécie *Bos taurus indicus* (Gir e Nelore), determinando que vacas da raça Gir selecionadas e não selecionadas para produção de leite encontraram concentração alélica de A e B, respectivamente, de 44,87 e 55,13% para A e B, para o grupo de vacas não selecionadas, e maior frequência do genótipo AB (48,72%) em relação aos genótipos AA (20,51%) e BB (30,77%). Uma maior discrepância foi encontrada nas frequências alélicas do grupo das vacas selecionadas para produção, cujos percentuais foram de 35 e 65% para os alelos A e B, respectivamente, sendo o genótipo AB em maior porcentagem (63,33%), em relação aos demais (AA-3,33% e BB-33,33%). Resultado este segundo os autores, justificado pela relação existente entre o alelo B e maior produção de sólidos do leite.

Todavia, outras pesquisas relataram maior predominância do genótipo homocigoto BB da β -Lg. Botaro et al. (2007), ao pesquisarem o efeito do polimorfismo genético da β -Lg sobre características físico-químicas e de composição do leite de animais das raças Holandesa e Girolando, observaram a presença dos três genótipos (AA, AB e BB), com predominância BB (45%) em relação ao genótipo AB (34%). Este trabalho utilizou as mesmas sequências de *primers* desses autores.

Faria et al. (2000) genotiparam as variantes genéticas da β -Lg em 81 animais da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) e sua influência sobre o peso à desmama na progênie, encontrando os genótipos AA (1%), AB (30%) e BB, com predominância também do genótipo BB (69%). As sequências dos *primers* e metodologia empregada neste estudo foram idênticas as utilizadas na pesquisa desses autores.

Com o objetivo de caracterizar genotipicamente uma amostra da população de animais da raça Nelore, Tambasco et al. (2000) analisaram 180 fêmeas por meio de marcadores microssatélite e PCR-RFLP para os genes da β -Lg. As diferenças nos padrões de restrição encontrados entre os animais possibilitaram a identificação dos alelos A (24%) e B (76%) desse *locus*.

Celik (2003) também identificou frequência superior para o genótipo BB (52,53%) da β -Lg em animais da raça Holandesa, onde o alelo B apresentou a frequência de 73%, e o alelo A 27%. Uffo et al. (2006) ao estudar a estrutura genética de três populações de bovinos cubanos (Criollo de Cuba, Zebú Cubano e Siboney de Cuba), identificaram a presença dos genótipos AA, AB e BB nas três raças, também com predominância do genótipo BB da β -Lg.

Investigou-se o polimorfismo genético em outras proteínas lácteas, e foi

observado que em outras raças bovinas e outras espécies domésticas houve a ocorrência de amostras populacionais com 100% de indivíduos de genótipo heterozigoto ou ausência de um dos genótipos.

Otaviano (2006) estudou o polimorfismo genético da beta, kappa e α_{s1} caseína da espécie bubalina e de várias raças bovina (Girolando, Gir, Guzerá, Jersey, Holandesa e Pardo-suíço) no Brasil. Observou também 100% de heterozigose (A1A2) para as raças Gir, Pardo-suíço e Guzerá para o gene da beta-caseína. O mesmo autor, em relação à Girolando, detectou a presença dos genótipos A1A2 (33%) e A2A2 (67%), não encontrando o genótipo homozigoto A1A1 para o mesmo marcador genético.

Caracterizando o polimorfismo genético da α_{s1} -caseína em caprinos das raças Moxotó, Alpina Americana e SRD nas mesoregiões Agreste, Sertão e Zona da Mata pernambucana, Silva et al. (2007) encontraram 100% do genótipo heterozigoto CD nos três grupos, com um número total de 80 animais.

Rodrigues (2006) também avaliou o polimorfismo genético para kappa-caseína em animais Girolando F1, e verificou a presença dos alelos A e B desse gene, porém com a ocorrência apenas dos genótipos AB e BB, não havendo a presença do homozigoto AA.

A diversidade de pesquisas referentes aos marcadores genéticos das proteínas lácteas permitiu o acesso a uma gama de resultados, porém controversos em sua maioria, com relação às frequências dos principais alelos da β -Lg bovina e a influência destes marcadores no comportamento das características de produção de maior interesse econômico.

As considerações a respeito dos resultados encontrados na literatura é a de que o genótipo AA da β -Lg bovina encontra-se em menor frequência em

relação aos genótipos AB e BB, e que o alelo B encontra-se em maior frequência em relação ao alelo A, independente da raça e localização geográfica estudada.

Com relação aos resultados encontrados nesta pesquisa, serão necessários outros estudos, a fim de comprovar o perfil genotípico do *locus* da β -Lg bovina. Para isso, um conjunto de medidas como elevação do N amostral, diversificação de rebanhos, desenvolvimento de *primers* específicos para genotipar os mestiços Holando-Gir, deverá ser adotado.

5. Conclusões

Detectou-se, dentro da amostragem estudada, a frequência de 100% do genótipo heterozigoto (AB) da beta-lactoglobulina em todos os grupos genéticos Holandês-Gir estudados.

Este estudo expressa a necessidade de outras pesquisas que elucidem o comportamento do polimorfismo do *locus* da β -Lg nos diversos grupos genéticos Holando-Gir.

É necessário que trabalhos que correlacionem o polimorfismo genético da beta-lactoglobulina, com características de interesse zootécnico, sejam elaborados com o intuito de comprovar a eficiência desse *locus* como marcador genético em programas de melhoramento de rebanhos mestiços Holando-Gir.

6. 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.
- ALVES, D.D.; PAULINO, M.F.; BACKES, A.A. et al. Características de carcaça de bovinos zebu e cruzados holandês-zebu (F₁) nas fases de recia e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.5, p.1274-1284, 2004.
- AZEVEDO, A.L.S.; GOMEZ, A.L.; GASPARINI, K. et al. Identificação de novos alelos microssatélites na raça Gir. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. p.228.
- AZEVEDO, M.; PIRES, M.F.A.; SATUMINO, H.M. et al. Estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteiras 1/2, 3/4, e 7/8 Holandês-Zebu em Lactação, **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 34, n.6, p.2000-2008, 2005.
- BAKER, J.F.; LONG, C.R.; POSADA, .G.A. et al. Comparison of a five-breeds dialed: size, growth, condition and pubertal characters of second-generation heifers. **Journal of Animal Science**, v.67, n.5, p. 1218-1229, 1989.
- BEIGUELMAN, B. **Genética de populações humanas**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 239p.
- BRASIL. Departamento Nacional de Produção Agropecuária – Coordenação de Produção Animal. **Normas para formação da raça Girolando**. Brasília: DF, 1992. 31p.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2009. p.532.
- BOTARO, B.G. **Variantes genéticas de beta-lactoglobulina em vacas leiteiras e características físico-químicas e de composição do leite**. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo/USP, Pirassununga, 2007.
- BOTARO, B.G.; LIMA, Y.V.R.; AQUINO, A.A et al. Variantes genéticas de beta-lactoglobulina em vacas leiteiras e características físico-químicas e de composição do leite. **Revista Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, v.42, n.5, p.747-753, 2007.

- CELIK, S. β -Lactoglobulin genetic variants in Brown Swiss breed and its association with compositional properties and rennet clotting time of milk. **International Dairy Journal**, v. 13, p.727-731, 2003.
- CONCEIÇÃO, R.O.; OLIVEIRA, D.A.A.; SAMPAIO, I.B.M. et al. Associação entre marcadores de grupos sanguíneos e produção à primeira lactação em bovinos da raça Gir leiteiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.4. 2000.
- DOMINGUES, O. **Introdução à Zootecnia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola – Ministério da Agricultura, 1960. 379p.
- DOMINGUES, O. **O Zebu, sua reprodução e multiplicação dirigida**. 2.ed. Rio de Janeiro: Nobel, 1973. 188p.
- DOMINGUES, O. **Gado leiteiro para o Brasil: gado europeu, gado indiano, gado bubalino**. Sao Paulo: Nobel, 1977. 112p.
- DOMINGUES, O. **Elementos de zootecnia tropical**. 6.ed. São Paulo: Nobel, 1986. 143p.
- 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.; PAIVA, S.R.; MAMANI, E.M. et al. Variabilidade genética de raças bovinas baseadas em marcadores STR. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5, 2004, Pirassununga, **Anais...** Pirassununga: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, [2004]. (CD-ROM).
- EGITO, A.A. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial subsídios para a conservação**. 2007. 232f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)– Instituto de Ciências Biológicas/Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2007.
- 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.

- FACÓ, O.; LÔBO, R.N.B.; FILHO, R.M. et al. Análise do desempenho produtivo de diversos grupos genéticos Holandês × Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.5, p.1944-1952, 2002.
- FACÓ, O.; LÔBO, R.N.B.; FILHO, R.M. et al. Idade ao primeiro parto e intervalo de partos de cinco grupos genéticos Holandês×Gir no Brasil, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.1920-1926, 2005.
- FACÓ, O.; LÔBO, R.N.B.; FILHO, R.M. et al. Efeitos genéticos aditivos e não-aditivos para características produtivas e reprodutivas em vacas mestiças Holandês × Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.1, p.48-53, 2008.
- 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.
- _____. **FAO STATdatabase**. Disponível em
< <http://faostat.fao.org/site/default.aspx#ancor>>. Acesso em: jan. 2010.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA-CENAGEM. 220 p, 1995.
- FERRAZ, E; MACHADO, F.M.A. A importância da qualidade do leite e seus derivados, seus benefícios e riscos para o consumidor. **Revista Balde Branco, Alimentos em Questão** – Cooperativa Paulista de Leite – SP, 2001.
- FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.
- FRANCO, M.M.; MELO, E.O. **Melhoramento animal: o uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida**. Brasília: EMBRAPA, 2006. 14p.
- FREDEEN, A.H. Considerations in the nutritional modification of milk composition. **Animal Feed Science and Technology**, v.59, n 1-3, p.185-197, 1996.
- GARCIA, J.F.; PORTO-NETO, L.P. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre. v.34, (Supl 1), p. 197-203, 2006.
- GIANNONI, M.A.; GIANNONI, M.L. G. **Genética e melhoramento de rebanhos nos trópicos**. São Paulo: Nobel, 1983. 463p.
- GIANNONI, M.A.; GIANNONI, M.L. **Gado de leite - Genética e Melhoramento**. Jaboticabal: Nobel, 1987. 374 p.

- GIGANTE, M.L.; COSTA, M.R. A nova pecuária leiteira brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 3., 2008, Recife. **Anais...** Recife: CCS, 2008. p.85-95.
- 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.; MAHÉ M. F., MERCIER J. C. et al. Polymorphisme des lactoprotéines de bovinés Népalais. II. Polymorphisme des caséines "asmineures".le *locus* as2-Cn est-il lié aux *loci* as1-Cn, b-Cn et k-Cn. **Annales de Génétique et de Sélection Animale** , v.8, p.481-49, 1976.
- GUIMARÃES, J.D.; ALVES, G.A.; COSTA, E.P. et al. Eficiências reprodutivas e produtivas em vacas das Raças Gir, Holandês e cruzados Holandês × Zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.641-647, 2002.
- HAMBLING, S.G.; MCALPINE, A.S.; SAWYER, L. Beta-lactoglobulina. In: FOX, P. F.. ALAONDON: **Advanced Dairy Chemistry** v.1, p.141-189, 1992.
- HILL, J.P.; BOLAND, M.J.; CREAMER, L.K.; et al. Effect of the bovine beta-lactoglobulin phenotype on the properties of beta-lactoglobulin, milk composition and dairy products. In: MACROMOLECULAR INTERACTIONS IN FOOD TECHNOLOGY PARRIS, 1996, Washington. **Anais...** Washinton: American Chemical Society, 1996. p.281-294.
- JANECEK, L.L.; HONEYCUTT, R.L.; ADKINS, R.M. et al. Mitochondrial gene sequences and the molecular systematic of the artiodactyl subfamily bovinæ. **Molecular Phylogenetic Evolution**. v.6, n.1, p.107-119, 1996.
- JARDIM, W. R. **Bovinocultura**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 2001. 525p.
- KONTOPODIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited Review: beta-lactoglobulin: Binding propetties, structure and function. **Journal of dairy Science**, v.87, n. 4, p.785-796, 2004.
- LIMA, Y.V.R. **Variantes genéticas de kappa-caseína em vacas leiteiras e características físico-químicas e de composição do leite**. 2005. 84f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, 2005.
- LUNDEN, A.; NILSSON, M.; JANSON, L. Marked effect of beta-lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n.11, p.2996-3005, 1997.
- MACHADO, S.G. **Marcadores moleculares associados a características de importância econômica em bovinos da raça Girolando**. 2001. 103f.

Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

- MachUGH, D.E.; SHRIVER, M.D.; LOFTUS, R.T. et al. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, v.146, n.3, p.1071-1086, 1997.
- 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.
- McMANUS, C.; TEIXEIRA, R.A.; DIAS, L.T. et al. Características produtivas e reprodutivas de vacas holandesas e mestiças Holandês×Gir no Planalto Central. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.5, p.819-823, 2008.
- MEDRANO, J.F.; AGUILAR-CÓRDOVA, E. Genotyping of bovine beta-lactoglobulin loci following DNA sequence amplification. **Bio/Technology**, v. 8 n. 2. p.144-146, 1990.
- NEVES, A.L.G.; GUIMARÃES, S.E.F.; LIMA, R.M.G. et al. Identification of A and B variants of the beta-lactoglobulin gene in Brazilian Gir populations. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 4, p. 409-414, 1998.
- 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.
- NG-KWAI-HANG, K.F.; MONARDES, H.G.; 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.
- NG-KWAI-HANG, K.F. A review of the relationship between milk protein polymorphism and milk composition/milk production. Milk Protein Polymorphism II, Palmerston North, New Zealand: **International Dairy Federation**, p. 22-37, 1997.
- NG-KWAI-HANG, K.F. Genetic polymorphism of milk proteins: Relationships between with production traits, milk composition and technological properties. **Canadian Journal of Animal Science**, v.78, p.131-147, 1998.
- 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.
- OLIVEIRA, H.N.; CURI, R.A. Seleção assistida por marcadores. In: ZOOTECA, 18., 2008, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Associação Brasileira de Zootecnia, [2008]. (CD-ROM).

- OLIVEIRA, K.M.G. **Estudos de difração de raios-x a alta resolução da beta-lactoglobulina bovina**. 1999. 80f. Dissertação (Mestrado em Física). Instituto de Física “Gleb Wataghin”/UNICAMP, Campinas, 1999.
- 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**. 2006. 97f. Tese (Doutorado em Produção Animal)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/UNESP, São Paulo. 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.
- 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.
- PRATA, L.F. **Fundamentos de ciência do leite**. Jaboticabal, São Paulo: FUNEP/UNESP, 2001. 287p.
- PRIMO, A.T. El Ganado bovino Ibérico en la Americas: 500 años después. **Archivos Zootecnia**. v.41, n.154 (extra), p.421, 1992.
- REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: EMBRAPA, 2001. 213p.
- REIS FILHO, J.C. **Endogamia na raça Gir**. 2006. 54f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)–Departamento de Genética e Melhoramento/Universidade de Viçosa, Viçosa, 2006.
- ROBITAILLE, G.; BRITTEN, M.; MORISSET, J. et al. Quantitative analysis of beta-lactoglobulin A and B genetic variants in milk of cows beta-lactoglobulin AB throughout lactation. **Journal of Dairy Research**, v. 69, n.4, p.651-654, 2002.
- 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.

- 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.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.
- SANTIAGO, A. A. **O Zebu: sua história e evolução no Brasil**. São Paulo: Diretoria de Publicidade Agrícola, 1957, 78p.
- SANTIAGO, A. A. **A Epopéia do Zebu**. São Paulo: Departamento de Produção Animal 1960. 559 p.
- SANTIAGO, A. A. **Os cruzamentos na pecuária bovina**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1984. 549p.
- SANTIAGO, A. A. **O Zebu na Índia, no Brasil e no Mundo**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 1985. 744p.
- SANTOS, R. **O gado sagrado na Índia**. Uberaba: Agropecuária Tropical, 1990. 350p.
- 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.
- SILVA, A.A.; ADRIÃO, M.; JIMENEZ, G.C. et al. Estudo do Polimorfismo genético da α -s₁-caseína em cabas, no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Animal Science**. v. 29, n. 3, p. 255-259, 2007.
- SPRITZE, A.; EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S. et al. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n.10, p.1157-1164, 2003.
- 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.
- TAMBASCO, D.D.; ALENCAR, M.M.; COUTINHO, L.L. et al. Caracterização molecular de animais da raça Nelore utilizando microssatélites e genes candidatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.4, p.1044-1049, 2000.
- UFFO, O.; MARTÍN-BURRIEL, I.; MARTINEZ, S. et al. Caracterización genética de seis proteínas lácteas em trez razas bovinas cubanas. **Animal Genetic Resources Information**, n. 39, p.15-24, 2006.