

ELEONORA DE FIGUEIREDO MORAES

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES DA α S1 - CASEÍNA E
DA κ - CASEÍNA EM CABRAS DO SEMI-ÁRIDO DO NORDESTE
BRASILEIRO**

RECIFE

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

ELEONORA DE FIGUEIREDO MORAES

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES DA α S1-CASEÍNA E DA κ -
CASEÍNA EM CABRAS DO SEMI-ÁRIDO DO NORDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:
Profa. Dra. Aurea Wischral
Co-Orientador:
Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

RECIFE

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

M827e Moraes, Eleonora de Figueiredo
Estudo de polimorfismo dos genes da α S1-caseína e da κ -
caseína em cabras do semi-árido do Nordeste brasileiro /
Eleonora de Figueiredo Moraes. -- 2009.
53 f.

Orientadora : Áurea Wischral
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Univer -
sidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de
Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia.

CDD 636.082 1

1. DNA
 2. Polimorfismo
 3. Leite
 4. PCR - RFLP
- I. Wischral, Aurea
II. Título

À minha querida mãe, Maria dos Prazeres. Em todos os momentos importantes e decisivos de minha vida, tu estavas ao meu lado. Agradeço a Deus todos os dias por ter recebido o presente de ser tua filha. Serei eternamente grata por tudo o que tu fizestes e fazes por mim.

Dedico.

Agradecimentos

A Deus, que sempre me guiou e iluminou todos os momentos de minha vida. É impossível não crer em ti.

À minha amada mãe e amiga, Prazeres. Com a tua presença e carinho tudo se torna possível.

Ao meu querido pai, Soares, pelo amor, apoio e incentivo. Muito obrigada por fazer parte da minha vida.

Ao meu querido esposo, Alexsandro, pelo carinho e principalmente pela compreensão nos momentos em que estive ausente. Muito obrigada por sempre me fazer sorrir.

Ao meu amado avô, Marino, por ser esta criatura tão doce que eu amo tanto.

À Prof. Dra. Aurea Wischral pela oportunidade, delicadeza e compreensão. Muito obrigada por acreditar em mim.

Ao Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho pela dedicação e entusiasmo com que conduz os experimentos.

Aos Professores Dra. Valéria W. Teixeira e Dr. Álvaro Teixeira pelo apoio e incentivo que sempre me deram. Vocês sempre serão especiais para mim.

Aos colegas do Serviço de Fiscalização Agropecuária - MAPA (SEFAG/DT/SFA-PE), por sempre me estimularem a concluir o Mestrado.

À bibliotecária Tuzinha pela correção das referências desta Dissertação.

À colega Laura Leandro Rocha pela ajuda na estatística.

Aos colegas do laboratório FAMA, em especial, Daniela Bastos, Diogo, Adriano e Jeice Kelle pela ajuda durante a realização do experimento. Muito obrigada pelo apoio.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, através do Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

Estudo do polimorfismo dos genes da α S1 - caseína e da κ - caseína em cabras do Semi – Árido do Nordeste Brasileiro.

A caprinocultura pela expressão sócio-econômica que representa para a população da região Nordeste, tem a necessidade da implantação de biotecnologias com a finalidade de melhorar a produtividade dos seus rebanhos. O estudo do polimorfismo genético do leite de animais criados nas condições zoosanitária e de bioclimatologia dessa região permitirá uma melhor correlação com as raças de produção e o conhecimento da composição do leite de cabras de diferentes raças. Objetivando realizar a genotipagem de cabras da raça Moxotó e Sem Raça Definida (SRD) provenientes do Semi Árido do Nordeste brasileiro (Pernambuco, Paraíba, Ceará e Rio Grande do Norte), por meio da técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism), estudou-se o polimorfismo dos genes da α S1-caseína e κ -caseína. Foram colhidas amostras de sangue total, de caprinos adultos da raça Moxotó e SRD, do sexo feminino, sadios, criados de maneira extensiva; a extração do DNA leucocitário foi realizada por meio do protocolo de clorofórmio e fenol e os genes foram amplificados pela técnica de PCR com *primers* específicos para cada caseína. Em seguida foram utilizadas as enzimas XmnI (α S1-caseína) e HaeIII (κ -caseína) para obter o padrão de fragmentos das raças estudadas. Para a α S1-caseína obteve-se dois padrões de bandas representando os alelos B e D, sendo que a maioria dos animais apresentou o genótipo BB, enquanto o D apareceu em menor número associado ao B (B/D). Entre os animais da raça Moxotó, a frequência alélica observada foi de 96,03% para o genótipo BB e 3,97% para o genótipo B/D. Em relação aos animais SRD, a frequência observada foi de 88,77% e 11,23% para os genótipos BB e B/D, respectivamente. Não foi observada diferença estatística entre as raças nem entre os Estados estudados. No caso da κ -caseína, apenas o alelo A foi encontrado, caracterizando o monomorfismo para todos os animais estudados. Os resultados do presente estudo demonstraram a proximidade genética entre a raça Moxotó e os animais SRD, e dos rebanhos existentes nos estados do Nordeste incluídos nesta pesquisa, caracterizando a origem similar destes animais. Diante da detecção da maior presença do alelo B (forte) do gene da α S1-caseína nos animais estudados, admite-se a possibilidade de que fenotipicamente esses animais venham a exibir a característica de uma forte produção de proteínas, característica importante para o leite destinado à produção de queijos, favorecendo a caprinocultura da região.

Palavras - chave: DNA, polimorfismo, leite, PCR-RFLP.

Study about the genetic polymorphism of the α S1 - casein and κ - casein in goats from the Brazilian Northeast Semi Arid.

The goat raising, by the socio-economic expression that it represents for the population of the Northeast region, has the necessity of biotechnology implantation in order to improve the productivity of its herd. The study of genetic polymorphism of the milk of the animals raised in zoosanitary bioclimatology conditions of this region will permit a better correlation with the breed for reproduction and the knowledge of the milk composition of goats of different breeds. Aiming at the genotyping of Moxotó goats breed and mixed-breed goats from the Semi-Arid of Brazilian Northeast (Pernambuco, Paraíba, Ceará and Rio Grande do Norte), by means of PCR-RFLP technique (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism), it was studied the polymorphism of the α S1-casein and κ -casein genes. It was collected total blood samples from adult Moxotó and mixed-breed goats, female, healthy, raised extensively; the leucocytary DNA extraction was made through chloroform and phenol protocol and the genes were amplified using the PCR technique (Polymerase Chain Reaction) with specific primers for each casein. After that, it was used XmnI enzymes (α S1-casein) and HaeIII (κ -casein) to obtain the pattern of fragments representing the B and D allele, being the majority of the animals presenting the BB genotype, while the D one appeared in a smaller number, associated to B (B/D). Among the animals of Moxotó breed, the allelic frequency observed was 96,03% for the genotype BB and 3,97% for the genotype B/D. In relation to the mixed-breed animals, the frequency was 88,77% and 11,23% for the genotypes BB and B/D, respectively. It was not observed statistic difference between the breeds nor the studied States. In the case of κ -casein, only the allele A was found, characterizing the monomorphism for all the animals studied. Based in the results of the present study, it is demonstrated a genetic proximity between Moxotó and mixed-breed of the exiting herd in the states of the Northeast included in this research, characterizing a similar origin of these animals. Before the detection of a higher presence of the allele B (strong) of the α S1-casein gene in the animals studied, it is acknowledged the possibility that phenotypically these animals come to show the characteristic of a strong protein production, an important one for the milk destined to cheese production, favoring the goat raising in the region.

Key words: DNA, polymorphism, milk, PCR-RFLP.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Os caprinos nativos do Nordeste.....	10
2.2 Produção de leite de cabra no Nordeste Brasileiro.....	10
2.3 As Caseínas.....	11
2.4 Potencial Alergênico das Caseínas.....	12
2.5 Polimorfismos das caseínas e propriedades tecnológicas.....	13
2.6 Marcadores Moleculares Aplicados ao estudo genético animal.....	19
2.7 Enzimas de restrição.....	20
3 REFERÊNCIAS.....	22
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	33
4.1 Estudo do polimorfismo genético da αS1-caseína em cabras do Semi - Árido do Nordeste Brasileiro.....	33
4.2 Estudo do polimorfismo genético da κ - caseína em cabras do Semi - Árido do Nordeste Brasileiro	44
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53

1. Introdução

O Nordeste brasileiro, em especial o semi-árido, durante séculos, tem sido uma região de vocação pecuária, principalmente para a exploração dos ruminantes domésticos. Sendo ruminantes de pequeno porte, os caprinos apresentam significativas vantagens em relação à bovinocultura, principalmente no que diz respeito à área ocupada e manejo. A rusticidade desses animais, bem como a facilidade de adaptação às condições ambientais e outros fatores, contribuem para tornar essa atividade relevante, nas pequenas e médias propriedades rurais do semi-árido (CARDOSO, 2002). Na década de 30 e início da década de 40, os principais caprinos vistos no Nordeste eram da raça Moxotó, encontrados no Estado de Pernambuco, com maior frequência no Vale do Rio Moxotó, de onde se originou o nome da raça, e no norte do Brasil, na Ilha de Marajó, no Pará. Nesta época ainda eram criados em menor escala os mestiços das raças Toggenburg e Nubiana (DOMINGUES, 1942). Os animais mestiços proporcionam a formação de rebanhos mais produtivos em comparação às nativas, pois as crias reúnem o potencial genético e a rusticidade (RIBEIRO, 2004). Apesar da grande importância dos caprinos para as populações das regiões semi-áridas, como fonte de renda e alimentar, poucos estudos genéticos/moleculares têm sido desenvolvidos com os animais da raça Moxotó e Mestiços.

O fator principal que afeta as propriedades tecnológicas do leite e seu rendimento de produção de queijo é a concentração de proteínas coagulantes ou caseínas, que no caso de leite de cabra, diferentemente do que acontece no leite de vaca e ovelha, é muito variável (REMEUF et al., 1993). Na seleção de caprinos leiteiros, em décadas passadas, o critério utilizado era “quantidade de leite”. Atualmente, a seleção feita pelo polimorfismo genético tem auxiliado na agroindústria onde esta seleção visa mais a qualidade do leite (BEVILACQUA et al., 2002). Em vista disto, Grosclaude et al. (1987), Jordana et al. (1996) e Veress et al. (2004) confirmaram que o melhor queijo procede de leite associado com os alelos fortes A, B e C da α S1-caseína. Segundo Silva et al. (2007) existe polimorfismo para o gene CSN1S1 da α S1-caseína caprina, entre a raça Alpina Americana e a raça Moxotó, e animais SRD, característica do Estado de Pernambuco o que demonstra a proximidade genética entre a Moxotó e SRD, decorrente dos cruzamentos realizados aleatoriamente, uma vez que a raça Moxotó predomina na região do Estado em que o estudo foi realizado. O estudo do polimorfismo genético das caseínas é muito importante em virtude de muitas variantes serem mais benéficas do ponto de vista da nutrição humana, enquanto outras

variantes estão associadas com a qualidade do leite, sua composição e características tecnológicas (BOLAND et al., 2001).

Tem-se dado muita importância aos estudos de recursos genéticos em animais domésticos, no entanto, a população caprina nativa da região Nordeste e a dos animais Sem Raça Definida (SRD) é pouco caracterizada, embora estes animais desempenhem papel socioeconômico muito importante para populações das regiões de clima semi-árido porque dependem destes para sua subsistência (HENSON, 1992).

O estudo do polimorfismo genético das caseínas de animais criados nas condições zoonosológica e de bioclimatologia da região, permitirá o conhecimento da composição do leite de cabras de diferentes raças e uma melhor relação com as raças de produção. A partir da identificação dos genes (genotipagem) através da técnica PCR-RFLP, pode-se estabelecer a distribuição de frequências de ocorrência das variantes genéticas, entre as diferentes raças envolvidas neste estudo e estabelecer referenciais, ajustados com informações de outros centros de estudo, com o fim de subsidiarmos o emprego da caprinocultura, conciliando-se a geração de bens de consumo, agregação de valor aos produtos comercializados e geração e distribuição de renda na região Nordeste do Brasil.

Uma vez que no Brasil existem poucos trabalhos no tema proposto e diante do exposto, neste trabalho objetivou-se caracterizar o genótipo da α S1-caseína e κ -caseína em cabras da raça Moxotó e Mestiças do Semi Árido do Nordeste do Brasil por meio da técnica de PCR-RFLP, visto que a identificação das caseínas do leite, mediante o emprego da biologia molecular, pode contribuir para o ajuste de programas de melhoramento animal, em relação ao tipo de emprego/produção a que se destina um determinado tipo de caseína.

2. Revisão de literatura

2.1 Os caprinos nativos do Nordeste

Há evidências de que a cabra foi o primeiro animal ruminante a ser domesticado pelo homem e o uso do seu leite remonta aproximadamente a 8.000 a.C. Nesta época os caprinos passaram de animais selvagens a domesticados pelos povos nômades da Ásia e Oriente Médio (JARDIM, 1985). A formação das raças e tipos nativos no Brasil desenvolveu-se a partir de raças trazidas pelos colonizadores portugueses, franceses e holandeses por volta de 1535 (PORTER, 1996). Nos anos entre 1930 e 1940, os caprinos da raça nativa Moxotó eram encontrados de Pernambuco à Ilha de Marajó, no Pará, sendo mais freqüente no Vale do Moxotó, origem de seu nome. Neste período, encontrava-se ainda em pequena escala, os mestiços de Toggenburg, Nubiana, Murciana, Malteza e Angorá (DOMINGUES, 1942).

Dentre os caprinos nativos do Nordeste, a Moxotó é a que apresenta maior população comparada com outras raças nativas. Esta raça encontra-se distribuída em alguns núcleos abertos (sem controle de monta), formando rebanhos sem raça definida (SRD) e alguns núcleos fechados (controlados para manter a padronização da raça), sendo este último de interesse para a conservação. Estudos realizados pela Embrapa Caprino e Ovino mostram que a raça Moxotó tem o mesmo tronco genético das demais raças nativas, apesar de apresentar pequena segregação de pelagem (ROCHA, 2007).

A maior parte dos caprinos da Região Nordeste pertence ao grupo SRD, que não possui padronização, sendo formado pela mistura de raças. Outro grande grupo refere-se aos animais padronizados destacando-se os grupos Moxotó, Marota, Canindé e Repartida. Estes caprinos são conhecidos como naturalizados, pois foram introduzidos na época da colonização e sofreram forte seleção natural para se adaptar às condições do semi – árido. São suas características principais a rusticidade, a prolificidade e alta qualidade do couro. Dentre estes grupos, talvez o mais tradicional seja o da raça Moxotó, originária de Pernambuco, que possui reconhecimento do Ministério da Agricultura e Livro Genealógico (MACHADO, 2000).

2.2 Produção de leite de cabra no Nordeste Brasileiro

De acordo com o Censo Agropecuário, a produção de leite de cabra no Brasil é de 21.275 mil litros (IBGE, 2006). A produção nacional diária de leite caprino é da ordem de 85.000 litros. O Nordeste, embora detentor da quase totalidade do rebanho nacional participa com

pouco mais de 26% da produção de leite de cabra, e com 17% do total comercializado. Dentre os estados nordestinos, vale destacar os Estados do Rio Grande do Norte e da Paraíba, com produções em torno de 11.000 lts/dia e 6.000 lts/dia, respectivamente, embora o principal destino do produto seja a merenda escolar, através de subsídios governamentais. No Estado do Ceará, a produção diária de leite de cabra é estimada em cerca de 1.000 lts. (WANDER; MARTINS, 2004).

A região Nordeste concentra 92% do rebanho caprino brasileiro e é onde mais recentemente iniciou-se um sistema organizado de aquisição, industrialização e distribuição de leite com os programas institucionais de governos estaduais (CORDEIRO; CORDEIRO, 2008). Nos últimos 20 anos houve um grande aumento no número de cabras (FAO, 2001), motivado pelo aumento na demanda do leite caprino, basicamente em três aspectos: consumo de leite (in natura), interesse por produtos feitos com leite de cabra, especialmente queijos e iogurtes e também ao fato de pessoas com alergia ao leite de vaca estarem procurando uma alternativa, que seria o consumo de leite e derivados de cabra. Além disso, os cosméticos a base de leite de cabra têm conquistado um importante mercado, tornando-se mais uma alternativa para os produtores principalmente como importante produto de marketing e de divulgação (HAENLEIN, 2004).

2.3 As caseínas

O leite dos ruminantes contém seis proteínas que podem ser classificadas em dois grupos: caseínas (α S1, α S2, β e K) e proteínas do soro (β lactoglobulina e α lactoalbumina). As quatro caseínas são os principais componentes, totalizando 76-86% do total das proteínas lácteas (MARTIN et al., 2002). As caseínas são proteínas conjugadas, que além das cadeias polipeptídicas têm na sua constituição substâncias de natureza não peptídica (fósforo), denominando-se de fosfoproteínas (RICARDO; TEIXEIRA, 1983). Estas proteínas apresentam função biológica de fornecer, à progênie, fonte de fosfato e cálcio para processos de mineralização de tecidos calcificados, bem como aminoácidos e peptídeos biologicamente ativos (FIAT et al., 1993) e podem ser separadas das proteínas do soro, principalmente, por dois processos: precipitação no pH isoeletrico (pH 4,6; 20°C) e coagulação pela ação da enzima quimosina-pepsina (coalho comercial), no processamento industrial de fabricação de queijos (WONG et al., 1996). O leite de vaca e de cabra contém proporções similares de proteínas como κ - caseína (10 - 24%) e α S2-caseína (5- 19%). Contudo, o leite de cabra contém níveis elevados, se comparado ao leite de vaca, de β -caseína (42 - 64% *versus* 34 -

41%) e baixos níveis de α S1-caseína (0 - 26% *versus* 36 - 40%) (WALSTRA; JENNES, 1984; LAW; TZIBOULA, 1992).

Tanto no leite da vaca como da cabra, o teor protéico de caseína tem valor aproximado de 80%, ou seja, superior ao do leite humano onde a caseína representa 40% das lactoproteínas (MARTIN, 1997). Os 20% restantes das lactoproteínas é constituído de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (NOUAILLE et al., 2005).

2.4 Potencial Alergênico das Caseínas

Desde o tempo de Hipócrates (Grécia Antiga: 460-377 a.C.) os médicos recomendavam o uso do leite de cabra para crianças enfermas, devido a sua fácil digestibilidade. Além disso, aquelas alérgicas ao leite de vaca podiam, usualmente, tolerar o leite de cabra (FRENCH, 1970).

As intolerâncias apresentadas por algumas pessoas ao leite bovino parecem estar relacionadas a altas concentrações de α S1-caseína e um aspecto importante a ser considerado é a crescente importância do leite caprino na dieta de crianças, em virtude deste leite ser, em muitos casos, menos alergênico que o leite bovino (HAENLEIN et al., 2004). As pessoas sensíveis a esta proteína, têm como sintomas: urticária; rinoconjuntivite; asma; vômito; diarreia e, na maioria dos casos graves, choque anafilático e morte (LARA-VILLOSLADA et al., 2005). Embora não seja a única fonte alergênica do leite, alguns neonatos apresentam alergias a níveis elevados desse tipo de proteína. Dessa forma, torna-se necessária a substituição do leite por um que apresente níveis inferiores, ou até praticamente nulos, dessa proteína em sua composição. Sendo assim, muitos especialistas recomendam a substituição do leite de vaca pelo leite de cabra devido ao seu teor inferior de caseína, reduzindo, assim, o potencial alergênico deste produto (BRANDÃO et al., 2006).

O leite caprino tem ainda como fator positivo, a ausência de histamina, considerada um forte agente alergênico. Ela age sobre receptores específicos (receptores H) localizados, sobretudo nos músculos bronquiais, induzindo contrações dos mesmos e dificultando a função respiratória (MÉTAIS et al., 1988).

De acordo com Bevilacqua et al. (2001), a vantagem do consumo do leite caprino por pessoas alérgicas pode ser atribuída ao baixo conteúdo de α S1 e α S2 caseína determinado por haplótipos particulares em muitos animais. Roncada et al. (2002) descreveram que o leite de cabra contendo α S1-caseína procedente de alelos intermediários, são mais utilizados para as

peessoas alérgicas. Também Haenlein (2004) atribuiu o menor percentual de α S1-caseína como fator determinante da hipoalergenicidade. Wal (2001) e Munoz Martin (2004) atribuíram os fatores alergênicos às caseínas (lactoproteínas) do leite de vaca. Nouaille et al. (2005) consideraram a β -lactoglobulina como dominante alergênico e que não é somente a β -caseína do leite de vaca que induz alta resposta de IgE, isto também ocorre com a β -caseína do leite humano. A β -lactoglobulina está ausente no leite humano, todavia está presente no leite de cabra numa concentração inferior ao leite de vaca (PINA et al., 2005).

2.5 Polimorfismos das caseínas e propriedades tecnológicas

As caseínas são as proteínas predominantes no leite de quase todas as espécies de mamíferos, constituem um grupo heterogêneo de fosfoproteínas e correspondem à principal fração protéica do leite de ruminantes, sendo um dos componentes mais valiosos em função de seu valor nutricional e propriedades tecnológicas. Nessas duas últimas décadas, o cDNA e seqüências genômicas de genes das caseínas tem sido determinados. Evolutivamente, são compostos por três ou quatro genes (dependendo da espécie): α S1-caseína, β -caseína, α S2-caseína e κ -caseína (RIJNKELS, 2002). São codificados por únicas cópias de genes contidas em um segmento de aproximadamente 200 Kb no cromossomo 6 de caprinos (*Capra hircus*) (BEVILACQUA et al., 2002).

Segundo alguns autores, a fração de caseína é codificada por quatro genes ligados e é organizada como um agrupamento em um segmento de DNA genômico de 250Kb, na seguinte ordem: α S2-caseína (CSN1S2), α S1-caseína (CSN1S1), β -caseína (CSN2) e κ -caseína (CSN3) (GROSCLAUDE et al., 1987; FERRETI et al., 1990; THREADGILL; WOMACK, 1990). Estes genes foram mapeados no cromossomo 6 em bovinos e caprinos (HAYES et al., 1993; POPESCU et al., 1996). Os tipos de mutação relatados, que ocasionam alto grau de polimorfismo, são substituição ou deleção de um único nucleotídeo, ou grande deleção ou inserção de nucleotídeos (MARTIN, 1993).

O gene CSN1S1 caprino apresenta o maior grau de variabilidade de todos os genes de caseína de ruminantes estudados, representando um excelente modelo para demonstração de que grande parte da variabilidade observada na α S1- caseína, presente no leite de cabra, se deve à presença de alelos autossomais no *locus* estrutural α S1- caseína (CSN1S1). Assim, foram identificados alelos associados com diferentes níveis de expressão de α S1- caseína no leite, sendo estes níveis designados “alto”, “médio”, “baixo” e nulo (MARTIN, 1997). Alelos A, B1, B2, B3, B4, C e M (3,6 g/L), H (4,2 g/L) e L (3,6 g/L) são relacionados com a elevada

presença de α S1- caseína; alelos I (1,7 g/L) e E (1,6 g/L) são de níveis intermediários; alelos D, F e G (0,6 g/L) estão relacionados a baixos níveis desta proteína no leite (BEVILACQUA et al., 2002). Os alelos nulos, três no total, estão associados à ausência de α S1- caseína no leite. O alelo O1 é caracterizado por uma grande deleção, enquanto que o alelo O2 por uma grande inserção de nucleotídeos (NEVEU et al., 2002).

Manfredi et al. (1993) observaram as variantes de alelos A, B, C, D, E, F e O que foram classificadas de acordo com a relação da síntese de proteínas. Os alelos A, B, C estão associados a uma taxa de síntese protéica elevada. O alelo E, está associado a uma taxa de síntese intermediária, F e D com uma taxa de síntese fraca e O com uma taxa de síntese nula. Os alelos nulos estão associados à ausência de α S1- caseína no leite. Outros estudos já identificaram até 16 alelos: A, B1, B2, B3, B4, C, E, F, G, H, I, L, M, N, O1 e O2 neste locus (BEVILACQUA et al., 2002; RAMUNNO et al., 2002).

As sete variantes de α S1-caseína descritas nas cabras Alpinas e Saanen francesas por Boulanger et al. (1984), com base nas diferentes mobilidades eletroforéticas, foram classificadas dentro dos quatro grupos de acordo com a média de síntese protéica associada a cada um deles: o 1º grupo foi formado de alelos fortes (A, B, C) nos quais foi encontrada α S1-caseína em média de 3,6g/kg de leite. O 2º grupo foi formado por um só grupo intermediário (E) associado a uma média de 1,6g/kg de leite. O 3º grupo constituído por alelos fracos (D e F) teve uma média de 0,6g/Kg. O 4º grupo, considerado como grupo de alelo nulo (O), é o que determina a ausência desta caseína no leite (GROSCLAUDE et al., 1994).

A análise das frações de proteína do leite de cabra tem demonstrado o polimorfismo qualitativo da α S1-caseína, associado com a variação quantitativa (BOULANGER et al., 1984; GROSCLAUDE et al., 1987). Devido à importância destes caracteres foi incluída a genotipagem do gene da α S1- caseína, na avaliação de machos utilizados para inseminação artificial na França (BARBIERI et al., 1995).

O locus CSN1S2 exhibe um grau de variabilidade maior no caprino doméstico do que no bovino e ovino. Oito alelos correspondem a níveis diferentes de expressão da proteína α S2-caseína, como segue: alelos normais (2,5g/l) - A, B (BOULANGER et al., 1984), C (BOUNOL et al., 1994), E (VELTRI et al., 2000) e F (RAMUNNO et al., 2001a), alelo intermediário (1,25g/l) - D (RAMUNNO et al., 2001a) e alelo nulo - 0 (RAMUNNO et al., 2001b). Para o alelo G (ERHARDT et al., 2002) não há informações sobre o nível de expressão protéica desta variante.

Variações no locus CSN2 em caprinos são indicadas pela existência de cinco alelos com expressão diferenciada de β -caseína no leite. O alelo A (ROBERTS et al., 1992), B

(MAHÉ; GROSCLAUDE, 1993) e C (NEVEU et al., 2002) são associados com uma produção normal de β -caseína enquanto o alelo O (PERSUY et al., 1999) e O' (RAMUNNO et al., 1995) são associados com uma concentração não detectável ou traços da proteína no leite. Além disso, dois alelos nulos deste gene foram identificados, ambos caracterizados por mutações responsáveis por códons de parada prematuros no éxon 7, sendo um encontrado em rebanhos do Sul da Itália (RAMUNNO et al., 1995) e o outro em cabras Creole e Pyrenean (PERSUY et al., 1999). A proteína β -caseína reduz o tempo de formação do coalho, além de acelerar a liberação do soro, influenciando assim o tempo de coagulação e o dessoramento (KAMINSKI, 1996).

A κ -caseína foi analisada pela primeira vez por Zittle e Custer (1966) e sua seqüência de 171 aminoácidos (aa) foi determinada posteriormente por Mercier et al. (1976 ab). Devido a modificações pos-transcricionais, a κ -caseína se mostra heterogênea em sua análise por eletroforese, com cinco formas diferentes (ANGIOLILLO et al., 2002; KEMENES e COUTINHO, 2000). É a proteína do leite que determina o tamanho e funções específicas das micelas e sua clivagem pela quimosina é responsável pela coagulação do leite. (YAHYAOUUI et al., 2003). O gene da κ -caseína caprina (CSN3) compreende 5 exons, estando a região codificante para a proteína, contida nos exons 3 (9 aa) e 4 (171 aa). Por sua vez, o exon 4, contém uma região de 459 pares de bases (pb), que é responsável pela maior parte da região codificante para a proteína κ -caseína (141 aa de um total de 171 aa) (YAHYAOUUI et al., 2003). Este locus não era considerado polimórfico até que Di Luccia et al. (1990) relataram variações (alelos A e B) em um rebanho italiano. Estudos recentes, em caprinos, demonstraram que o gene da κ -caseína é extremamente polimórfico (CAROLI et al., 2001; YAHYAOUUI et al., 2001; ANGIOLILLO et al., 2002).

Para a formação do coalho na produção de queijo, é necessária a digestão da κ -caseína, produzindo a precipitação das micelas. Em bovinos, foram descritas seis variedades (A, B, C, E, F, e G) da κ -caseína (KAMINSKI, 1996) e vários estudos têm demonstrado que o genótipo BB da k-Cn determina uma melhor propriedade do leite para a produção de queijo (NG-KWAI-HANG, 1998; VIANA, et al., 2001) enquanto em ovinos, a κ -caseína é considerada monomórfica (MOIOLI et al., 1998). Em particular, o genótipo BB está associado com o coalho mais firme, com redução do tempo necessário para a formação do coalho e com maior rendimento da produção de queijo. A produção de queijo é baseada na clivagem do peptídeo Phe-Met (fenilalanina-metionina) da κ -caseína por enzimas ou pelo calor (ANGIOLILLO et al., 2002).

Devido à importância da κ -caseína nas propriedades tecnológicas do leite, vários pesquisadores analisaram esta proteína em cabras em busca de variantes genéticas, descrevendo a existência de polimorfismos (DI LUCCIA et al., 1990; JAUBERT; MARTIN, 1992; LAW; TZIBOULA, 1993; RECIO et al., 1997).

Os polimorfismos protéicos são formas variantes de proteínas geneticamente determinadas, geralmente identificadas por métodos de fracionamento eletroforéticos associados às técnicas histoquímicas, que permitem a revelação das atividades de enzimas específicas. Estes têm sido fonte de inúmeras investigações, tanto no homem como nos animais, principalmente de interesse zootécnico (ROCHA, 1997). Os polimorfismos protéicos ou polimorfismos bioquímicos, também denominados marcadores genéticos-bioquímicos são considerados ferramentas úteis para os melhoristas, sendo muito investigados em estudos de associação com características de interesse econômico, por marcarem uma estrutura ou processo biológico, sendo largamente empregados na identificação de paternidade, distância entre raças e endocruzamentos (IGARASHI, 1997).

O interesse na variabilidade dos genes do leite caprino foi incentivado pela grande variabilidade observada na espécie bovina e a associação das variantes com a produção de leite, propriedades tecnológicas e saúde humana (LODES et al. 1996; FREYER et al. 1999; MCLACHLAN, 2001). Segundo Martin et al. (2002), diferentes mecanismos de controle da expressão gênica da caseína, transcricionais e pós-transcricionais, afetam as propriedades do leite. A diversidade encontrada nos genes bovinos das proteínas lácteas demonstrou uma forte relação com o gene da lactase humana e tem sido utilizada para realizar análises geográficas e da diversidade genética no gado europeu (BEJA-PEREIRA et al., 2003).

Em caprinos, polimorfismos genéticos foram relatados com os genes da α S1, α S2 e β caseínas. Variantes da α S1 caseína foram associados com diferenças no conteúdo de proteína no leite, na razão caseína/total de proteína e no rendimento de queijo (GROSCLAUDE et al., 1994). Estudos vêm sendo desenvolvidos em cabras de raças exóticas associando os polimorfismos em alelos com níveis alto e baixo de α S1 - caseína (RAMUNO et al., 2000; LAGONIGRO et al., 2001).

As possibilidades de se detectar, ao nascer, o genótipo dos animais quanto ao gene da α S1- caseína, pode fazer com que os produtores possam optar pela criação de animais com baixo teor de α S1- caseína, para o desenvolvimento de um produto com propriedades nutracêuticas ou, alto teor, quando o interesse for a produção de queijo ou outros derivados. Assim, por razões econômicas e com objetivo de melhorar a eficiência de programas de seleção, os efeitos desse polimorfismo têm sido estudados (MARINI et al., 2007).

Altos níveis de α S1- caseína tem sido associados a elevado nível de proteína total e micelas menores, contendo menos cálcio. Sendo assim, apresentam melhor potencial na fabricação de queijos e coalho firme (CLARK; SHERBON, 2000). Baixos níveis de proteína estão associados a baixos conteúdos de gordura e lipólise mais intensa, para dar um sabor mais forte (BARBIERI et al., 1995). Uma inconveniência dos genótipos fortes e intermediários tem sido observada com relação ao sabor do queijo. Queijos feitos com leite procedente destes genótipos têm menos aroma típico do que procedentes de genótipo fraco, devido aos diferentes ácidos graxos. Contudo, tem sido discutido se isto é realmente um efeito do gene ou a consequência da lipólise dos ácidos graxos durante a maturação do queijo (DELACROIX-BUCHET et al., 1996; DELACROIX-BUCHET, 1998). Os efeitos deste polimorfismo foram estudados também na Itália (PIZZILO et al., 1996), no rebanho da Espanha (ANALLA et al., 2000) e em rebanho misto nos EUA (CLARK e SHERBON, 2000).

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

Os efeitos deste polimorfismo sobre a composição do leite, estruturas das micelas, propriedades coagulantes e produção de queijo têm sido muito estudados no rebanho francês, onde se constatou que não existe diferença entre os genótipos com respeito à produção de leite. Tem-se comprovado os efeitos do polimorfismo genético da α S1-caseína sobre as características físico-químicas do leite de cabra, os alelos AA induzem maior síntese de α S1-caseína proporcionando a fabricação de queijos superiores aos obtidos com outros tipos de leite. O leite procedente de genótipos fortes apresenta propriedades de fácil coagulação, sólida coalhada, queijo mais firme, etc., melhores do que o leite obtido nos genótipos intermediários, e estes apresentam por sua vez, melhores propriedades de que os genótipos fracos (MAHÉ et al., 1994; REMEUF, 1993; BARBIERI et al., 1995; RICORDEAU et al., 1996; MARTIN et al., 1999; RICORDEAU et al., 2000). Por outro lado, como foi discutido anteriormente, os genótipos fracos não apresentam efeitos alergênicos no leite e/ou derivados.

Segundo Kusza et al. (2007), trabalhando com cabras leiteiras na Hungria, a relação entre as variantes alélicas dos genes CSN1S1, CSN1S2 e CSN2 e o conteúdo de caseína, que influenciam nas propriedades físico-químicas do leite, podem ser utilizadas em esquemas de seleção, levando ao aumento da qualidade de processamento do leite e seus produtos. De

acordo com Marletta et al. (2005), trabalhando com caprinos Girgentana e Argentata dell'Etna, o estudo dos loci de caseínas sensíveis ao cálcio (α S1-caseína, α S2-caseína e β -caseína) torna possível entender o efeito dos alelos quantitativos na qualidade e conteúdo de caseína produzido por esses animais. Kumar et al. (2007) concluíram que a variabilidade observada no locus CSN1S1, de rebanhos caprinos indianos, pode ser utilizada tanto para conservação como para melhoramento genético, com a finalidade de aumentar a qualidade e quantidade da produção leiteira.

Segundo Silva et al. (2007), existe polimorfismo para o gene CSN1S1 da α S1-caseína caprina entre as raças Alpina Americana e Moxotó e animais SRD, no Estado de Pernambuco, o que demonstra a proximidade genética entre a Moxotó e SRD, decorrente dos cruzamentos realizados aleatoriamente, uma vez que a raça Moxotó predomina na região do Estado em que o estudo foi realizado.

O estudo do polimorfismo genético das caseínas é muito importante em virtude de muitas variantes serem mais benéficas do ponto de vista da nutrição humana, enquanto outras variantes estão associadas com a qualidade do leite, sua composição e características tecnológicas (BOLAND et al., 2001).

O desenvolvimento de novas técnicas na área da biologia molecular tem facilitado o estudo da composição genética dos animais, tornando possível a realização da seleção de animais baseada em características genotípicas. Estas técnicas vêm sendo utilizadas, através do uso de marcadores moleculares para estudar genes que afetam a composição corporal, ganho de peso e produção de leite. A vantagem do uso dos marcadores moleculares, é que estes permitem a determinação do potencial de um animal com maior acurácia, uma vez que não são afetados pelo meio ambiente e podem ser utilizados precocemente, até mesmo na fase embrionária. Trabalhos têm demonstrado o melhoramento das características genotípicas/fenotípicas de interesse zootécnico através da análise comparativa entre diferentes modelos biológicos (KEMENES; COUTINHO, 2000).

Para a identificação de certos caracteres, pode-se recorrer à técnica de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) que se baseia na presença de sítios de restrição para uma ou mais endonucleases de restrição na região amplificada do DNA-molde que pode ser determinada por intermédio do processamento do produto da PCR (*polymerase chain reaction*) (GARCIA, 1995).

Apesar da grande importância dos caprinos para as populações das regiões semi-áridas, como fonte de renda e alimentar, poucos estudos têm sido desenvolvidos com os animais da raça Moxotó e Mestiços, especialmente para caracterizar os genes da α s1-caseína

e κ -caseína utilizando a técnica de PCR-RFLP. Apesar da importância que se tem dado aos estudos de recursos genéticos em animais domésticos, as populações caprinas nativas da região Nordeste e Sem Raça Definida (SRD) são pouco caracterizadas (HENSON, 1992).

2.6 Marcadores Moleculares Aplicados ao estudo genético animal

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente. A caracterização genética com o uso de marcadores moleculares tem demonstrado ser uma ferramenta eficaz para quantificação da diversidade genética de animais domésticos. Os marcadores genéticos são *loci* que apresentam características detectáveis que diferenciam os indivíduos de determinada população, demonstrando variações entre indivíduos e grupos de animais (MENEZES et al., 2006).

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade na sequência de DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e minissatélites ou locos VNRT (Variable Number of Tandem Repeats). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), STS (Sequence Tagged Sites), Microsatélite e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (POLLASTRI, 2002).

Em estudos genéticos e no melhoramento animal, diferentes técnicas moleculares têm sido empregadas com sucesso, as quais revelam classes distintas de marcadores moleculares. Este tem sido fonte de inúmeras investigações, principalmente nos estudos de caracterização genética, parentesco, relações filogenéticas e associações com genes de interesse zootécnico. O uso eficiente de marcadores moleculares deve considerar: a base genética dos polimorfismos revelados por estes marcadores; os aspectos técnicos dos métodos que os definem e as vantagens e limitações de cada classe (ROCHA, 2005).

As análises de marcadores genéticos, tais como grupos sanguíneos e polimorfismos bioquímicos, permitem a caracterização da variabilidade intra e inter populacional, sendo ferramentas úteis nos estudos da caracterização e de relações genéticas entre as raças (LIPPI; MORTARI, 2003). Os marcadores moleculares têm sido muito utilizados também na

caracterização de populações, de acordo com Kuhnlein et al. (1989), Gilbert et al. (1991), Mannen et al. (1993), Vierling et al. (1994) e Yang et al. (1999).

Os polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição, ou RFLP, resultam da possibilidade de cortar o DNA através da utilização de enzimas de restrição que são capazes de reconhecer pequenas sequências específicas (normalmente com 4 a 8 pares de bases de comprimento). Entende-se que um gene (ou *locus*) é polimórfico quando se caracteriza pela ocorrência de pelo menos duas formas alternativas com frequências superiores a 1%. Essas formas alternativas têm o nome de alelos e da sua combinação resultam os genótipos dos indivíduos (BEJA-PEREIRA; ALMEIDA, 2005).

O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na sequência de nucleotídeos ao longo da fita. A presença ou ausência de sequências específicas reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, pode variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismo. Diferenças na sequência de DNA dos indivíduos podem resultar de inserções, deleções ou outros rearranjos (translocações, inversões) que alterem a distância entre os sítios de restrição. Ao ser submetido à clivagem com uma enzima de restrição, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado nos sítios específicos, gerando fragmentos de diferentes tamanhos (ANTONINI et al., 2004).

A correlação entre marcadores moleculares e características de produção tem sido investigada em várias espécies de interesse econômico. O objetivo desses estudos é a obtenção de marcadores que possam ser utilizados nos programas de seleção para a identificação mais precisa de genótipos superiores. Muitos autores sugerem que algumas das variações das proteínas do leite estão associadas a características diferenciadas deste produto, no que diz respeito ao seu processamento para a fabricação de queijos. A κ -caseína, por exemplo, é controlada por um loco com dois alelos principais, A e B (DAMIANI et al., 1990). A identificação desses alelos pela técnica de PCR-RFLP foi descrita simultaneamente por Zadworny e Kuhnlein (1990) e Medrano e Aguilar-Cordova (1990).

2.7 Enzimas de restrição

Enzimas de restrição têm sido purificadas de bactérias a partir de estudos sobre restrição e modificação hospedeiro-específico de vírus de bactérias. As primeiras enzimas identificadas foram *EcoRI* e *EcoRII* de *Escherichia coli* e *Hind II* e *Hind III* de *Haemophilus influenzae*. Várias outras bactérias tem sido avaliadas para essas enzimas desde então, e mais de 3.000 enzimas já foram identificadas com mais de 200 tipos de especificidade. A função

biológica das enzimas de restrição consiste em proteger células da invasão de DNA exógeno. Atualmente, existem algumas centenas deste tipo de enzimas disponíveis comercialmente, que cortam sequências com motivos muito diversificados e têm, por isso, uma grande utilidade. As enzimas de restrição são divididas em várias classes, dependendo da estrutura, da atividade e dos sítios de reconhecimento e clivagem. As enzimas do Tipo II, as mais importantes na Tecnologia do DNA Recombinante, são proteínas monoméricas ou diméricas e clivam o DNA no mesmo sítio do seu reconhecimento. O sítio de reconhecimento deste tipo de enzima é normalmente uma sequência palindrômica, isto é, ela tem um eixo de simetria e a sequência de bases de uma fita é a mesma da fita complementar, quando lida na direção oposta (BEJA-PEREIRA; ALMEIDA, 2005).

3. Referências

AMBROSOLI, R.; DI STASIO, L.; MAZZOCCO, P. Contento of α s1-casein and coagulation properties in goat milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, n. 71, p.24-28, 1988.

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

ANGIOLILLO, A. et al. Short communication: Characterization of a new genetic variant in the caprine k-casein gene. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, p. 2679-2680, 2002.

BALTRENAITÉ, L.; KRIAUSIENĖ, J.; MIVIKIENĖ, I. Goat kappa casein gene polymorphism. **Veterinarija ir Zootechnika**, Lithuania, v. 38, n. 60, p. 9-12, 2007.

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

BEJA-PEREIRA, A. et al. Gene culture co-evolution between cattle and human lactase genes. **Nature Genetics**, New York, v. 35, p. 311-313, 2003.

BEJA-PEREIRA, A.; ALMEIDA, N. F. Métodos moleculares na análise da diversidade biológica. **Genética, Biotecnologia e Agricultura**, 2005.

BEVILACQUA, C. et al. Goats milk defective alpha (S1) casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to beta lactoglobulin in guinea pigs. **Journal of Dairy Research**, Washington, US, v. 68, p. 217-227, 2001.

BEVILACQUA, C. et al. Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new α s1 casein variant found in the goat species. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 269, n. 4, p.1293-1303, 2002.

BOLAND, M.; MACGIBBON, A.; HILL, J. Designer milks for the new millennium. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 72, p. 99-109, 2001.

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

BOUNIOL, C. et al. Biochemical and genetic analysis of variant C of caprine alpha s2 casei (*Capra hircus*). **Animal Genetics**, Oxford, v.25, p. 173-177, 1994.

BRANDÃO, S. C. C.; MATEDI, M. A. L.; CARDOSO, M. L. O. Alergia e intolerância ao leite de vaca. Universidade Federal de Viçosa, MG, 2006.

CARDOSO, J. R. A. **A importância da caprinovinocultura em assentamentos rurais de Mossoró**. 2002. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2002. Disponível em : <<http://romerocardoso.sites.uol.com.br>> Acesso em: 20 de dez. 2008

CAROLI, A. et al. Genetic polymorphism of goat k-casein in different breeds and characterization at DNA level. **Animal Genetics**, Oxford, v.32, p. 226-230, 2001.

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

CORDEIRO, P. R. C.; CORDEIRO, A. G. P. C. O negócio do leite de cabra no Brasil e sua cadeia produtiva. Estruturação da cadeia produtiva do leite caprino. XII Seminário Nordestino de Pecuária 23 a 26 de junho de 2008.

DAMIANI, G., FERRETTI, L., GOGNONI, G., SGARAMELLA, V. Restriction fragment lenght polymorphism analysis of the κ -casein locus in cattle. **Animal Genetics**, Oxford, v. 21, p. 107-114, 1990.

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

DELACROIX-BUCHET, A. et al. Influence des variants AA et FF de la caséine α s1 caprine sur le rendement fromager et les caracteristiques sensorielles des fromages. **Lait**, Les Ulis, v. 76, p.217-241, 1996.

DI LUCCIA, A. et al. Kappa casein polymorphism in caprine milk. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, Milan, v. 41, p. 305-314, 1990.

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

ERHARDT, J. et al. Genetic polymorphism of goat α_2 -casein (CSN1S2) and evidence for a further allele. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 57, p. 137-140, 2002.

FAO. **Dados estatísticos**. Disponível em: <<http://www.fao.org/countryfiles/index.asp>>. Acesso em: 20 jan. 2009.

FERREIRA, M. C. C.; TRIGUEIRO, I. N. S. Produção de leite de cabras puras no Curimataú paraibano durante a lactação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 2, maio/jul. 1998.

FERRETI, L.; LEONE, P.; SGARAMELLA, V. Long range restriction analysis of the bovine casein genes. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 18, p. 6829-6833, 1990.

FIAT, A-M. et al. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 76, n.1, p. 301-310, 1993.

FRENCH, M. H. **Observaciones sobre las cabras**. Roma: Organizacion de lãsnaciones unidas para la agricultura y la alimentacion, 1970. 234 p. (FAOEstudios agropecuários, n. 80).

FREYER, G. et al. Casein polymorphism and relation between milk production traits. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 116, p. 89-97, 1999.

GARCIA, J. F. **Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR (polymerase chain reaction) de embriões bovinos** 1995. 172 p. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

GILBERT, D.A.; PACKER, C.; PUSEY, A.E.; STEPHENS, J.C.; O'BRIEN, S.J. Analytical DNA fingerprinting in Lions: parentage, genetic diversity, and kinship. **Journal of Heredity**, v.82, p.378-386, 1991.

GROSCLAUDE, F. et al. Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat α s1-casein. **Genetics Selection Evolution**, Versailles, v. 19, n. 4, p. 399-412, 1987.

GROSCLAUDE, F. et al. Du gène au fromage: le polymorphisme de la caséine α -s1 caprine, ses effets, son évolution. **Revista de Produção Animal**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 3-19, 1994.

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

HAYES, H. et al. Localization and α S2 casein gene (CASAS2) to the homologous cattle, sheep and goat chromosomes 4 by in situ hybridization. **Cytogenetics Cell Genetics**, Basel, v. 64, p. 281-285, 1993.

HENSON, E.L. In-situ conservation of livestock and poultry. Rome: FAO, 1992. (FAO Animal Production and Health, paper 99).

IBGE. **Censo Agropecuário 2006**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impresao.php?id_noticia=1064>. Acesso em: 20 jan. 2009

IGARASHI, M. L. S. de P. **Variabilidade genética em caprinos de rebanhos do Nordeste Brasileiro**. 1997. 83f. Tese (Doutorado em Ciências Genéticas) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.

JARDIM, W. R. **Criação de caprinos** 11. ed. São Paulo : Nobel, 1985. 239 p.

JORDANA, J. et al. Gene frequencies of caprine α S1 casein polymorphism in Spanish goat breeds. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 20, p. 215-221, 1996.

JAUBERT, A.; MARTIN, P. Reverse phase HPLC analysis of goat caseins. Identification of α s1 and α s2 genetic variants. **Lait**, Les Ulis, v. 72, p. 235-247, 1992.

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

KEMENES, P. O.; COUTINHO, L. L. frequências dos alelos “A” e “B” dos genes de kappa-casein e β lactalbumina fresas raças holandesa, nelore, gir e caracu. **Arquivos de Zootecnia**, São Paulo, v.1, p.190-192, 2000.

KUHNLEIN, U.; DAWE, Y.; ZADWORNÝ, D.; GAVORA, J.S. DNA fingerprinting: a tool for determining genetic distances between strains of poultry. **Theoretical and Applied Genetics**, v.77, p.669 - 672, 1989.

KUMAR, A. et al. Identification of the CSN1S1 allele in Indian goats by the PCR-RFLP method. **Animal**, Uttar Pradesh, v. 1, n. 8, p. 1099-1104, 2007.

KUSZA, S. et al. Technical note: Genetic polymorphism of α S1 and α S2 caseins in Hungarian Milking Goats. *Small Ruminant Research*, Böszörményi, v. 68, p. 329-332, 2007.

LAGONIGRO, R. et al. Molecular genetic characterization of the g0ta s2-casein E allele. **Animal Genetics**, Campobasso, v.32, p.391-393, 2001.

LARA-VILLOSLADA, F.; OLIVARES, M.; XAUS, J. The Balance Between Caseins and Whey Proteins in Cow's Milk Determines its Allergenicity. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88 p.1654–1660, 2005.

LAW, A. J. R.; TZIBOULA, A. Quantitative fractionation of caprine casein by cation-exchange HPLC. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 47, n. 9, p. 558-562, 1992.

LAW, A. J. R., TZIBOULA A. Fractionation of caprine k-casein and examination of polymorphism by FPLC. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 48, p. 68-71, 1993.

LIPPI, A.; MORTARI, N. Studies of blood groups and protein polymorphisms in the Brazilian horse breeds Mangalarga Marchador and Mangalarga. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 403, 2003.

LODES, A. et al. The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk. 1. Casein micelle size and the content of non-glycosylated kappa casein. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 51, p. 368-373, 1996.

MACHADO, T. M. M. et al. Genetic distances and taxonomic trees between goats of Ceará States (Brazil) and goats of the Mediterranean Region (Europe and Africa). **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 121-125, 2000.

MANNEN, H.; TSUJI, S.; MUKAI, F.; GOTO, N.; OHTAGAKI, S. Genetic similarity using DNA fingerprinting in cattle to determine relationship coefficient. **Journal of Heredity**, v.84, p.166-169, 1993.

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

MAHÉ, M.F; GROSCLAUDE, F. Polymorphism of α casein in the Creole goat of Guadeloupe: evidence for a null allele. **Genetics, Selection, Evolution**, Versailles, v. 21, p. 127-129, 1993.

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

MARINI, S. et al. Estudo do alelo G da alpha S1 caseína em uma população de cabras leiteiras. **Arquivo de Ciência Veterinária e Zoologia**, v. 10, n. 2, p. 105-110, 2007.

MARLETTA, D. et al. Genetic polymorphism of the calcium sensitive caseins in sicilian Girgentana and Angentata dell Etna goat breeds. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 57, p. 133-139, 2005.

MARTIN, P. Polymorphisme génétique des lactoprotéines caprines. **Le Lait**, Les Ulis, v. 73, n. 5-6, p. 511-532, 1993.

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

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

MARTIN, P. et al. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant's milks. **Reproduction Nutrition Development**, Jouy Enjosas, v. 42, p. 433-459, 2002.

MCLACHLAN, C.N. Beta-Casein A ischaemic heart disease mortality and other illnesses. **Medical Hypothesis**, Penrith, v. 56, p. 262-272, 2001.

MEDRANO, J.F. & AGUILAR-CORDOVA, E.. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. **Bio-Technology**, v. 8, p. 144 – 146, 1990.

MENEZES, M.P.C. et al. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1336-1341, 2006.

MERCIER, J. C.; ADDEO, F.; PELISSIER, J. P. Primary structure of the caprine caseinomacropeptide. **Biochimie**, Paris, v. 58, p. 1303-1310, 1976a.

MERCIER, J. C.; CHOBERT, J. M.; ADDEO, F.; Comparative study of the amino acid sequence of the caseinomacropeptide form seven species. **FEBS Letters**, Jouy-en-Josas, v.72, p.208-214, 1976b.

MÉTAIS, P. et al. Exploration biochimique du tissu conjonctif et de l'inflammation. In:-----
Biochimie clinique: biochimie fonctionnelle. Paris : Simep, 1988. v.3, p. 212-259.

MOIOLI, B.; PILLA, F.; TRIPALDI, C. Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.27, p.185-195, 1998.

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

NEVEU, C. et al. Heterogeneity of caprine beta-casein elucidated by RP-HPLC/MS: Genetic variants and phosphorylation. **Journal of Protein Chemistry**, New York, v. 21, p. 557-567, 2002.

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

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

PERSUY, M. A. et al. A single nucleotide deletion resulting in a premature stop codon is associated with marked reduction of transcripts from a goat α casein null allele. **Animal Genetics**, Campobasso, v. 30, p. 444-451, 1999.

POPESCU, P. et al. Standardization of cattle karyotype nomenclature: report of committee for standardization of the cattle karyotype. **Cytogenetics Cell Genetics**, Basel, v. 74, p. 259-261, 1996.

PORTER, V. **Goats of the world**. London: Farming Press. p. 151-156. 1996.

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

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

POLLASTRI, J. R. R. **Marcadores Moleculares**. Disponível em:

<<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL004.htm>> Acesso em: 20 de fevereiro de 2009

RAMUNNO, L. et al. Um gene ad effetto maggiore sul contenuto di caseína β nel latte di capra. Atti XI Cong. Naz. ASPA-GRADO (GO), Udine, p. 185-186, 1995.

RAMUNNO, L. et al. Identification of the goat CSN1S1 allele by means of PCR-RFLP method. **Animal Genetics**, Oxford, p 31, v .333-346, 2000.

RAMUNNO, L. et al. Characterization of two new alleles at the goat CSN1S1 locus. **Animal Genetics**, Oxford, v. 32, p.264-268, 2001a.

RAMUNNO, L. et al. An allele associated with a non detectable amount of α 2-casein in goat milk. **Animal Genetics**, Oxford, v.32, p. 19-26, 2001b.

RAMUNNO, L. et al. Um nuovo allele a lócus CSN1S1 di capra:CSN1S1 N. **Atti XV Congr. Naz. SIPAOC**, Cagliari, 221, 2002.

RECIO, I. et al. Study of the polymorphism of caprine milk caseins by capillary electrophoresis. **Journal of Dairy Research**, Champaign, v. 64, p. 515-523, 1997.

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

RIBEIRO, F. L. A importância das cabras mestiças na produção de leite. Bahia: (s. n.), 2004. Disponível em: <<http://www.accoba.com.br/ap>> Acesso em: 20 dez. 2008

RICARDO, C.; TEIXEIRA, A. **Moléculas biológicas, estruturas e propriedades**. 2.ed. Lisboa: Didactica Editora, 1983. p. 131-133.

RICORDEAU, G. et al. Fréquence des allèles de la caséine $\alpha 1$ em race Poitevine. **Animal Genetic Resources Information**, Rome, v. 17, p. 103-108, 1996.

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

RIJNKELS, M. Multispecies Comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia Springer**, v. 7, n. 3, p. 327-345, 2002.

ROBERTS, B. et al. Cloning of the goat α casein encoding gene and expression in transgenic mice. **Gene**, Amsterdam, v. 121, p. 255-262, 1992.

ROCHA, D. **Raça Moxotó: Importancia e critérios para conservação**. 2007. Disponível em: <<http://www.zootecniabrasil.com.br/sistema/modules/wfsection/article.php?articleid=13>> Acesso em: 20 dez. 2008

ROCHA, L. L. **Caracterização genética e morfoestrutural de caprinos da raça Moxotó nos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte**. 2005. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

ROCHA, R. H. **Possíveis associações entre polimorfismos genéticos-bioquímicos de proteínas sanguíneas e produção de leite em búfalos (*Bubalis bubalis*)**. 1997. 172p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

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

SILVA, A. A.; ADRIÃO, M.; JIMENEZ, G. C.; SANTOS, M. C. R.; WISCHRAL, A.; AFONSO, J. A. B. Estudo do polimorfismo genético da α S1 caseína em cabras, no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Sci. Anim. Sci.*, Maringá, v. 29, n. 3, p. 255-259, 2007.

THREADGILL, D. W.; WOMACK, J. E. Genomic analysis of the major bovine protein genes. *Nucleic Acid Research*, Oxford, v. 18, p. 6935-6942, 1990.

VASSAL, L.; DELACROIX-BUCHET, A.; BOUILLON, J. Influence des variants AA, EE, et FF de la caséine α s1 caprine sur le rendement fromager et les caractéristiques sensorielles des fromages traditionnels: Premières observations. *Lait*, Les Ulis, v. 74, p. 89-103, 1994.

VELTRI, C. et al. Molecular characterization of the goat α s2 casein E allele and its detection in goat breeds of Italy. **International Conference on Goats**, Tours, France, 14-20 May. P.727, 2000.

VERESS, G. Y. et al. Polymorphism of the α S1 casein, k casein and β lactoglobulin genes in the Hungarian Milk Goat. **South African Journal of Animal Science**, Pretoria, v. 34, n. 1, p. 20-23, 2004.

VIANA, J. et al. Análises de los genótipos más frecuentes de la k-caseína em la raza vacuna rubio galega mediante PCR/RFLPs. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v.50, p. 91-96, 2001.

VIERLING, R.A.; XIANG, Z.; JOSHI, C.P.; GILBERT, M.L.; NGUYEN, H.T. Genetic diversity among elite sorghum lines revealed by restriction fragment length polymorphisms and random amplified polymorphic DNAs. **Theoretical and Applied Genetics**, v.87, p.816-820, 1994.

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

WALSTRA, P.; JENNES, R. **Dairy chemistry and physics**. New York: Wiley, 1984.

WANDER, A.E.; MARTINS, E.C. Viabilidade Econômica da caprinocultura leiteira. IV SEMANA DA CAPRINOCULTURA E OVINOCULTURA BRASILEIRAS - Embrapa Caprinos - Sobral, 20 a 24 de Setembro de 2004. Disponível em: < <http://www.freewebs.com/awander/WanderAE.pdf> > Acesso em: 02 de março de 2009

WONG, D. W. S.; CAMIRANT, W. M.; PAVLATH, A. E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Review of Food Science Nutrition**, Cleveland, v. 36, n. 8, p. 807-844, 1996.

YAHYAOU, M. H. et al. Genetic polymorphism of the caprine kappa casein gene. **Journal of Dairy Research**, Champaign, v. 68, p. 209-216, 2001.

YAHYAOU, M. H. et al. Characterization and genotyping of the caprine k-casein variants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 2715-2720, 2003.

YANG, L.; ZHAO, S.H.; LI, K.; PENG, Z.Z.; MONTGOMERY, G.W. Determination of genetic relationships among five indigenous Chinese goat breeds with six microsatellite markers. **Animal Genetics**, Oxford, v.30, p.452-455, 1999.

ZADWORN, D. & KUHNLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoretical Applied Genetics**, v. 80, p. 631- 634, 1990.

ZITTLE, C. A.; CUSTER, J. H. Identification of the k-casein among the components of whole goat casein. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 49, p.788-791, 1996.

Estudo do polimorfismo genético da α S1-caseína em cabras do Semi - Árido do Nordeste Brasileiro *

Eleonora de Figueiredo Moraes^{1*}, Sildivane Valcácia da Silva², Carlos Adriano de Santana Leal¹, Laura Leandro da Rocha³, Manoel Adrião Gomes Filho¹ e Aurea Wischral²

*¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. ²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. ³Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. . *Autor para correspondência. E-mail: eleonorafg@yahoo.com.br*

RESUMO. A população de raças caprinas nativas e Sem Raça Definida (SRD) do Nordeste do Brasil é pouco caracterizada, apesar da importância que se tem dado aos estudos de recursos genéticos em animais domésticos. Com o objetivo de estudar o polimorfismo do gene da α S1-caseína em DNA genômico de cabras Moxotó e SRD provenientes do Semi Árido do Nordeste brasileiro, por meio da técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism), foram utilizadas 215 cabras divididas em dois grupos, das raças Moxotó e SRD, provenientes dos estados de Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará. A extração do DNA foi realizada com a utilização do protocolo fenol-clorofórmio e o gene da α S1-caseína foi amplificado por meio da PCR (Polymerase Chain Reaction). Em seguida, foi utilizada a endonuclease XmnI para obter o padrão de fragmentos de cada alelo. Com base na frequência alélica das raças estudadas, não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre as populações de cada Estado estudado e entre animais Moxotó e SRD, demonstrando-se a proximidade genética entre estas fêmeas. Conclui-se que há uma forte influência da raça Moxotó nas fêmeas SRD e que os animais dos Estados estudados devem ter uma origem comum. Diante da detecção da maior presença do alelo B (forte) do gene da α S1-caseína nos animais estudados, admite-se a possibilidade de que fenotipicamente esses animais venham a exibir a característica de uma forte produção de proteínas, característica importante para o leite destinado à produção de queijos, favorecendo a caprinocultura da região.

PALAVRAS-CHAVE: DNA, leite, PCR-RFLP.

* Formatado para a Revista Acta Scientiarum Animal Sciences

ABSTRACT. Study about the genetic polymorphism of the α S1 casein in goats from the Brazilian Northeast Semi Arid. The population of native goats and mixed-breed races from the Northeast of Brazil is little characterized despite the importance it has been given to the studies of genetic resources in domestic animals. Among the proteins of milk called caseins, the α S1-casein was the first comproved based in the genetic polymorphism. With the objective of studying the polymorphism of the α S1-casein gene in genomic DNA of Moxotó and mixed-breed race goats from the semi-arid of Brazilian Northeast, by the PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Lenght Polymorfism) technique, 215 goats were used, divided in two groups, Moxotó races and mixed-breed races that came from the states of Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte and Ceará. The DNA extraction was made using the phenol-chloroform protocol and the gene of α S1-casein amplified by the PCR (Polymerase Chain Reaction). After that, it was used the endonuclease XmnI to obtain the pattern of fragments in each allele. Based in the allelic frequency from the races studied, it has not been observed significant difference ($p > 0,05$) among the populations of each studied state and between Moxotó and mixed-breed race animals, demonstrating the genetic proximity among these females. It is concluded that there is a strong influence from the Moxotó race in mixed-breed females and that the animals from the studied states must have a common origin. In face of the detection of a highest presence of allele B (strong) from the α S1-casein gene in the animals studied, it is admitted the possibility that, phenotypically, these animals come to show the characteristic of a strong production of proteins, an important feature for the milk destined to cheese production, favoring the goat raising in the region.

KEY WORDS: DNA, milk, PCR-RFLP.

Introdução

De acordo com o Censo Agropecuário, a produção de leite de cabra no Brasil é de 21.275 mil litros (IBGE, 2006). O Nordeste, embora detentor da quase totalidade do rebanho nacional, participa com pouco mais de 26% da produção de leite de cabra, e com 17% do total comercializado (WANDER; MARTINS, 2004).

A importância econômico-social dos caprinos criados no Nordeste do Brasil reside na produção de leite e de carne, para alimentação das populações de média e baixa renda, como fonte de proteína animal de baixo custo, no entanto a população das raças caprinas nativas desta região e das Sem Raça Definida (SRD) são pouco caracterizadas, apesar da importância que se tem dado aos estudos de recursos genéticos em animais domésticos (SILVA; ARAÚJO, 2000).

O leite dos ruminantes contém seis proteínas que podem ser classificadas em dois grupos: caseínas (α S1, α S2, β e κ) e proteínas do soro (β lactoglobulina e α lactoalbumina). As quatro caseínas são os principais componentes, totalizando 76-86% do total das proteínas lácteas (MARTIN et al, 2002). A alta concentração de α S1-caseína parece estar relacionada com a intolerância apresentada por algumas pessoas ao leite bovino e um aspecto importante a ser considerado é a crescente importância do leite caprino, em virtude deste leite ser, em muitos casos, menos alergênico que o leite bovino (HAENLEIN, 2004).

A fração de caseína é codificada por quatro genes ligados e é organizada como um agrupamento em um segmento de DNA genômico de 250Kb, na seguinte ordem: α S2-caseína (CSN1S2), α S1-caseína (CSN1S1), β -caseína (CSN2) e κ -caseína (THREADGILL; WOMACK et al., 1990). O gene CSN1S1 caprino apresenta o maior grau de variabilidade de todos os genes de caseína de ruminantes estudados, e foram identificados alelos associados com diferentes níveis de expressão de α S1- caseína no leite, sendo estes níveis designados “alto”, “médio”, “baixo” e nulo (MARTIN et al., 1999).

O polimorfismo genético das caseínas caprinas tornou-se uma área de pesquisa de interesse, em virtude de sua relação com a composição do leite e características tecnológicas importantes para fabricação de queijos e outros produtos lácteos (BALTRENAITÉ et al., 2007). Altos níveis de α S1- caseína estão associados a elevado nível de proteína total e micelas menores, contendo menos cálcio. Sendo assim, apresentam melhor potencial na fabricação de queijos e coalho firme (CLARK; SHERBON, 2000). Baixos níveis de proteína estão associados a baixos conteúdos de gordura e lipólise mais intensa, para dar um sabor mais forte (BARBIERI et al., 1995).

Apesar da grande importância dos caprinos para as populações das regiões semi-áridas, como fonte de renda e alimentar, e da relação da composição do leite de cabra com características tecnológicas importantes para fabricação de queijos e outros produtos lácteos, poucos estudos têm sido desenvolvidos com os animais da raça Moxotó e Mestiços,

especialmente para caracterizar o gene da α S1-caseína utilizando a técnica de PCR-RFLP com a enzima XmnI.

Desta forma, objetivou-se com este estudo caracterizar os alelos do gene CSN1S1 da α S1-caseína, presentes em cabras nativas Moxotó e SRD da Região do Semi-Árido do Nordeste do Brasil, visto que a identificação das caseínas do leite, mediante o emprego da biologia molecular, pode contribuir para o ajuste de programas de melhoramento animal, em relação ao tipo de emprego/produção a que se destina um determinado tipo de caseína.

Material e Métodos

Coleta de material biológico

Foram colhidos 5 mL de sangue total, de caprinos adultos da raça Moxotó e Mestiços (215 animais – 126 Moxotó e 89 SRD), do sexo feminino, clinicamente sadios, criados de maneira extensiva; provenientes de regiões do semi-árido do Nordeste do Brasil, especificamente dos estados do Ceará, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte.

Extração do DNA

O sangue foi centrifugado (10 min. a 825 g) e lavado com solução salina (0,9% em NaCl), repetida por três vezes para obtenção dos leucócitos. O DNA genômico foi extraído de uma alíquota de 100 μ L de leucócitos, usando 100 μ L de TE (Tris 10 mM – EDTA 1 mM pH 8,0) e 100 μ L de fenol equilibrado pH 8,0 (com centrifugação por 5 min. a 18.000 g). A uma alíquota de 100 μ L do sobrenadante foi adicionado 100 μ L de fenol-clorofórmio (1:1) (centrifugação por 5 min. a 18.000 g), em seguida, a uma alíquota de 100 μ L do sobrenadante foi adicionado 100 μ L de clorofórmio (centrifugação por 5 min. a 18.000 g). Para precipitação do DNA, foi utilizado 10 μ L de acetato de amônio 3M, 100 μ L do sobrenadante (DNA) e 100 μ L de isopropanol, esta mistura foi incubada por, no mínimo, 60 min em freezer a -20°C (centrifugação por 5 min. a 18.000 g). O pellet foi lavado com 500 μ L de etanol 70% em centrifugação por 5 min. a 18.000 g. O DNA extraído foi quantificado e avaliado, mediante leitura em espectrofotômetro (Bionate 3 - Thermo Scientific).

Amplificação e Polimorfismo da α S1-caseína na região estudada

O gene da α S1- caseína foi amplificado usando a reação de polimerase em cadeia (PCR) (RAMUNNO et al., 2000). Cada PCR foi realizada em volume final de 25 μ L

contendo 100 ng de DNA genômico, 2,5 µL de tampão 10X PCR, 1,75 µL de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen), 10 pmol de cada primer (direto - 5' TTCTAAAAGTCTCAGAGGCAG 3' e reverso 5' GGGTTGATAGCCTTGTATGT 3'), 2,5 µL de dNTP, 16,15 µL de água pura e 1,0 U de Taq DNA polimerase (Fermentas).

O protocolo de amplificação consistiu de um ciclo inicial de 97 °C por 2 min., 60 °C por 45 s, 72 °C por 2 min. e 30 s, seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 60 °C por 45 s, 72 °C por 2 min. e 30 s, com aumento progressivo de 4 s a cada ciclo na extensão; com uma extensão final de 72 °C por 10 min. no final do ciclo.

O fragmento amplificado de 230 pb foi digerido em volume final de 15 µL: 5 µl do produto de PCR, 8,4 µL de água pura, 1,5 µL de tampão da enzima, 1,0 U da enzima XmnI (New England – Biolabs), por quatro horas a 37 °C; em seguida, inativação da enzima a 65°C por 20 minutos. Os produtos dos fragmentos digeridos foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (10 ng /µL, usando marcador de peso molecular (50 bp DNA-Ladder – LGC Biotecnologia).

Os dados foram tratados de forma descritiva, calculando a frequência das bandas alélicas encontradas, na forma de percentis (%), para se estabelecer a ocorrência dos alelos encontrados em cada raça e em cada Estado envolvido no estudo. Assumindo que existe um estado ideal de equilíbrio Hardy-Weinberg (EHW), o mesmo foi verificado utilizando o teste exato de Fischer, através do programa GENEPOP (versão 1.2), sendo o nível de significância padronizado para 0,05% (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

Resultados e discussão

A amplificação do gene CSN1S1 da α S1- caseína ocorreu em todos os animais estudados apresentando o mesmo padrão com 230 pares de bases (pb). O resultado da digestão enzimática (endonuclease XmnI) demonstrou a presença, na população estudada, de dois padrões de fragmentos, representados pelos alelos B (65 + 165 pb) e D (230 pb) (Figura 1).

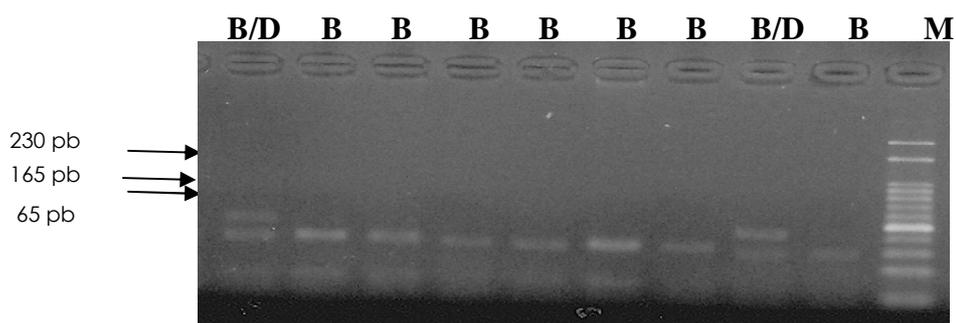


Figura 1. Padrão eletroforético obtido por digestão com endonuclease XmnI da região do DNA que contém o gene CSN1S1 de caprinos. M: Marcador *DNA-Ladder* 50 pb.

Figure 1. DNA electrophoretic patterns obtained after digestion with XmnI endonuclease of the DNA region containing the goat CSN1S1 gene. M – DNALadder 50 bp

O gene CSN1S1 caprino apresenta a maior variabilidade de todos os genes de caseína de ruminantes já estudados e até 16 alelos são conhecidos nesse locus (BEVILACQUA et al., 2002).

Por meio da técnica utilizada (PCR-RFLP), o gene CSN1S1 foi amplificado com primers específicos e os fragmentos gerados foram os mesmos observados por Ramuno et al. (2000) que são 65, 165 e 230pb.

Na Tabela 1 encontram-se as frequências alélicas e genótípicas do loco estudado, onde observou-se uma maior frequência do alelo B em relação ao alelo D em todas as populações estudadas. O alelo D (fraco) foi encontrado em menor proporção, quando comparado ao alelo B, esse alelo é considerado um alelo de nível fraco quanto à produção da proteína no leite indicando que o leite com baixo teor de caseína é uma importante opção, quando o indivíduo apresenta alergia se exposto demasiadamente a este tipo de proteína (MARINI et al., 2007). Foi observada a predominância do genótipo BB em todas as populações analisadas, genótipo característico de uma maior produção de caseína no leite.

Em relação à heterozigiosidade observa-se uma baixa frequência de indivíduos heterozigotos em todas as populações, principalmente nas populações da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. A análise das frequências não demonstrou desvios do EHW seja nas raças ou nos estados estudados em relação ao loco analisado. Tampouco foi observada diferença significativa entre as proporções de cada raça ou Estado ($P>0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Frequências alélica, genotípica, heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) e o equilíbrio de

Raças	Alelos		Genótipos		Heterozigosidade		EWH
	B	D	BB	BD	Ho	He	
MCE	0,932	0,068	0,8636	0,137	0,136	0,130	ns
MPB	0,985	0,015	0,969	0,031	0,030	0,030	ns
MPE	0,976	0,024	0,951	0,049	0,048	0,048	ns
MRN	0,962	0,038	0,923	0,077	0,077	0,075	ns
SCE	0,931	0,069	0,862	0,138	0,138	0,130	ns
SPB	0,932	0,068	0,863	0,137	0,136	0,130	ns
SPE	0,925	0,075	0,850	0,15	0,150	0,142	ns

Hardy Weinberg (EHW) do loco da α S1-caseína na raça Moxotó e SRD nos diferentes estados do Nordeste do Brasil estudados

Table 1. Allelic and genotypic frequency of α S1-casein in Moxoto and SRD goats, in NE states of Brazil

MCE=Moxotó Ceará; MPB= Moxotó Paraíba; MPE= Moxotó Pernambuco; MRN= Moxotó Rio Grande do Norte; SCE= SRD Ceará; SPB= SRD Paraíba e SPE= SRD Pernambuco; ns= não significativo

Ricordeau et al. (1996) analisaram os alelos da α S1-caseína de caprinos nativos (Aldudes, Arette Lourdios, Aspe Pau-Aquitaine, Soulor, Bigorre, Nistos Ariège, Chèvres e Boucs) das montanhas dos Pirineus, e comprovaram que o alelo E foi predominante entre estes animais, contudo, o mesmo autor estudando a raça nativa francesa Poitevine encontrou predominância do alelo B. De acordo com Grosclaude et al. (1987) a concentração total de caseína no leite caprino está positivamente correlacionada com a presença do alelo da α S1-caseína e é maior nos alelos A, B e C.

Otaviano et al. (2005) encontraram monomorfismo para o gene da alfa S1 caseína em búfalos, onde estes apresentaram 100% dos genótipos AB, e uma das justificativas para este resultado seria a seleção dos animais com ênfase na produção de leite, ou pela conservação de seu genoma, devido a disposição para a adaptação a diferentes ambientes. Do mesmo modo, Kumar et al. (2007) analisando caprinos indianos pela técnica de PCR /RFLP encontraram, em maior proporção, os alelos A e B que são associados com uma maior síntese de caseína. Os resultados encontrados nos nossos estudos estão de acordo com os de Boulanger et al. (1984), que encontraram predominância do alelo B em cabras das raças Alpina, Saanen e

cruzadas (Alpina X Saanen). Kusza et al. (2007) encontraram uma maior frequência do alelo B (forte) entre caprinos leiteiros húngaros locais, do que nas raças importadas Alpina e Saanen.

Silva et al. (2007), realizando a genotipagem de cabras criadas no Sertão, Agreste e Zona da Mata do estado de Pernambuco constataram que os alelos B e D foram predominantes para a raça nativa Moxotó e animais SRD (100%), e os alelos C e D, para a raça Alpina Americana (100%), concluindo que existem variações genéticas para o gene da α S1-caseína do leite das raças caprinas estudadas, embora evidencie a proximidade genética entre a Moxotó e SRD, o que também foi verificado nos animais do presente estudo.

No presente estudo, apesar de ser encontrado em menor frequência, o alelo D apresentou-se com frequências acima de 0,060 nas três populações SRD e em uma Moxotó, este fato poder ser devido a introdução de outras raças caprinas, que carregam este alelo em sua composição genética, como por exemplo a Alpina Americana conforme trabalho de Silva et al. (2007).

A semelhança genética entre os animais Moxotó e SRD, observada neste trabalho, pode caracterizar a presença da raça nativa (Moxotó) nos cruzamentos que deram origem aos animais SRD, ou seja, a utilização maciça destes animais nos cruzamentos aleatórios. De acordo com Ribeiro (2004), a raça Moxotó encontra-se disseminada, sofrendo diluição genética pela participação em cruzamentos com raças exóticas ou outras nativas, dando origem ao rebanho Sem Raça Definida (SRD).

Os resultados obtidos também corroboram com os de Jordana et al. (1996) que constataram que os genótipos das raças Moxotó e SRD de cabras do Sertão do Moxotó e do Agreste do Médio Capibaribe se identificaram com os da raça Canária da Espanha nas quais os alelos fortes A e B foram mais frequentes.

Conclusão

Com base nos resultados do presente estudo, demonstrou-se a proximidade genética entre animais da raça Moxotó e animais SRD, decorrente dos cruzamentos realizados aleatoriamente, e conclui-se que, diante da detecção da maior presença do alelo B (forte) nos animais estudados, admite-se a possibilidade de que fenotipicamente esses animais venham a exibir a característica de uma forte produção de proteínas, característica importante para o leite destinado à produção de queijos, favorecendo a caprinocultura da região.

Outros estudos quanto à presença do gene da α S1-caseína em outras populações caprinas nativas devem ser realizados para uma avaliação mais ampla, já que o alelo tipo B está classificado como sendo de alto nível para a produção desta proteína no leite.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e a Laura Leandro da Rocha pelo auxílio na análise estatística desse trabalho.

Referências

BALTRENAITÉ, L.; KRIAUSIENÉ, J.; MIVIKIENÉ, I. Goat kappa casein gene polymorphism. *Veterinarija ir Zootechnika*, v. 38, n. 60, p. 9-12, 2007.

BARBIERI, M.E.; MANFREDI, E.; ELSÉN, J. M.; RICORDEAU, G.; BOUILLON, J.; GROSCLAUDE, F.; MAHE, M. F.; BIBE, B. Influence du locus de la caséine alpha S1 sur les performances laitières et les paramètres génétiques des chèvres de race alpine. *Genetique Selection Evolution*, v. 27, n.1, p. 437-450, 1995.

BEVILACQUA, C.; FERRANTI, P.; GARRO, G.; VELTRI, C.; LAGONIGRO, R.; LEROUX, C.; PIETROLA, E.; ADDEO, F.; PILLA, F.; CHIANESE, L.; MARTIN, P. Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new α s1 casein variant found in the goat species. *European Journal of Biochemistry*, v. 269, n. 4, p.1293-1303, 2002.

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

CLARK, S.; SHERBON, J. W. Genetic variantes of α s1 –CN in goat milk: breed distribution and association with milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Ruminant Research*, v. 38, n.2, p. 135-143, 2000.

GROSCLAUDE, F.; MAHE, M. F.; BRIGNON, G.; DI-STASIO, L.; JEUNET, R. A mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat α s1-casein. *Genetics Selection Evolution*, v. 19, n.4, p. 399-412, 1987.

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

IBGE. Censo Agropecuário 2006. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia>>. Acesso em: 20 jan. 2009

JORDANA, J.; AMILLS, M.; DIAZ, E.; ANGULO, C.; SERRADILLA, J.M. and SANCHEZ, A. Gene frequencies of caprine α S1 casein polymorphism in Spanish goat breeds. *Small Ruminant Research*, v. 20, p. 215-221, 1996.

KUMAR, A.; ROUT, P. K.; MANDAL, A.; ROY, R. Identification of the CSN1S1 allele in Indian goats by the PCR-RFLP method. *Animal*, v. 1, n. 8, p. 1099-1104, 2007.

KUSZA, S.; VERESS, G.; KUKOVICS, S.; JÁVOR, A.; SANCHEZ, A.; ANGIOLILLO, A.; BÓSZÉ, Z. Technical note: Genetic polymorphism of α S1 and α S2 caseins in Hungarian Milking Goats. *Small Ruminant Research*, v. 68, p. 329-332, 2007.

MARINI, S.; SOARES, M. A. M.; RODRIGUES, M. T.; SOMMER, D.; GASPARINO, E.; BRUNO, L. D. G.; SOUZA, A.C.; NAMBA, V. Estudo do alelo G da alpha S1 caseína em uma população de cabras leiteiras. *Arquivo de Ciência Veterinária e Zoologia*, v. 10, n. 2, p. 105-110, 2007.

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

MARTIN, P.; SZYMANOWSKA, M.; ZWIERZCHOWSKI, L.; LEROUX, C. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant's milks. *Reproduction Nutrition Development*, v. 42, p. 433-459, 2002.

OTAVIANO, A. R.; TONHATI, H.; DESIDERIO SENA, J. A.; FERREIRA LIMA, A. L.; MASSOLINI, LAUREANO, M. M.; BERMAL COSTA, R.; MENDONZA SANCHEZ, G.; MORETTI, M. H.; BARALDI THOMAZINE, R.; OLIVEIRA SENO, L. Intron VIII do gene da alfa s1 caseína de búfalas descrito pela técnica de SSCP (Polimorfismo de conformação de cadeia). *Biotam Nueva Serie*, p. 279-281, 2005.

RAMUNNO, L.; COSENZA, G.; PAPPALARDO, M.; PASTORE, N.; GALLO, D.; DI GREGORIO, P.; MASINA, P. Identification of the goat CSN1S1 allele by means of PCR-RFLP method. *Animal Genetics*, v. 31, p.333-346, 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): a population genetic software for exact tests and ecumeinism. *Journal of Heredity*, v. 86, p. 248-249, 1995.

RIBEIRO, F. L. A importância das cabras mestiças na produção de leite. Bahia: (s. n.), 2004. Disponível em: <<http://www.accoba.com.br/ap>> Acesso em: 20 dez. 2008

RICORDEAU, G.; MAHÉ, M. F.; AMIGUES, Y.; GROSCLAUDE, F.; MANFREDI, E. Fréquence dês allèles de la caséine alphas1 em race Poitevine. *Animal Genetic Resources Information*, v. 17, p. 103-108. 1996.

SILVA, A. A.; ADRIÃO, M.; JIMENEZ, G. C.; SANTOS, M. C. R.; WISCHRAL, A.; AFONSO, J. A. B. Estudo do polimorfismo genético da α S1 caseína em cabras, no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Scietiarium Animal Sciences*, v. 29, n. 3, p. 255-259, 2007.

SILVA, F. L. R.; ARAÚJO, A. M. Desempenho produtivo em caprinos Mestiços no Semi Árido do Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 4, p. 1028-1035, 2000.

THREADGILL, D. W.; WOMACK, J. E. Genomic analysis of the major bovine protein genes. *Nucleic Acid Research*, v. 18, p. 6935-6942, 1990.

WANDER, A.E.; MARTINS, E.C. Viabilidade Econômica da caprinocultura leiteira. IV SEMANA DA CAPRINOCULTURA E OVINOCULTURA BRASILEIRAS - Embrapa Caprinos - Sobral, 20 a 24 de Setembro de 2004. Disponível em: <<http://www.freewebs.com/awander/WanderAE.pdf>> Acesso em: 02 de março de 2009.

Estudo do polimorfismo genético da κ - caseína em cabras do Semi - Árido do Nordeste Brasileiro *

Eleonora de Figueiredo Moraes¹, Jeice Kelle Ferreira de Andrade¹, Carlos Adriano de Santana Leal¹, Clarissa Neuman Ramos Cesar¹, Manoel Adrião Gomes Filho¹ e Aurea Wischral²

*¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. ²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. . *Autor para correspondência. E-mail: eleonorafg@yahoo.com.br*

RESUMO. O Nordeste brasileiro, em especial o semi-árido, durante séculos, tem sido uma área de vocação pecuária, principalmente para a exploração dos ruminantes domésticos, como os caprinos. A kappa-caseína (κ -caseína) é a proteína do leite que determina o tamanho e funções específicas das micelas e sua clivagem pela quimosina é responsável pela coagulação do leite, sendo uma característica interessante para a indústria queijeira. Objetivando realizar a genotipagem de cabras Moxotó e Sem Raça Definida (SRD) provenientes do Semi Árido do Nordeste brasileiro, por meio da técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorfism), estudou-se o polimorfismo do gene da κ -caseína. A extração do DNA do sangue foi realizada com a utilização do protocolo fenol-clorofórmio, e o gene da κ -caseína foi amplificado por meio da PCR (Polymerase Chain Reaction). Em seguida, foi utilizada a enzima de restrição HaeIII para obter o perfil das raças estudadas para os alelos da κ -caseína. Observou-se a presença exclusiva do genótipo A/A da κ -caseína tanto nos animais Moxotó como nos SRD de rebanhos do Semi Árido do Nordeste Brasileiro. Com isso, demonstrou-se a uniformidade do rebanho estudado, e a proximidade genética com base na estabilidade da composição de bases do gene estudado entre as fêmeas Moxotó e SRD, decorrente de cruzamentos aleatórios.

PALAVRAS-CHAVE: DNA, leite, PCR-RFLP.

* Formatado para a Revista Acta Scientiarum Animal Sciences

ABSTRACT. Study about the genetic polymorphism of the κ - casein in goats from the Brazilian Northeast Semi Arid. The Brazilian Northeast, especially, the semi-arid, during centuries, has been an area with a vocation for cattle raising, mainly for the exploration of the domestic ruminants, such as the goats. The κ -casein is the protein of the milk that determines the size and functions specific from the micellae and their cleavage by the chymosin; it is responsible for the coagulation of the milk, being an interesting characteristic for cheese industry. With the objective of proceeding a genotype test of Moxotó and mixed-breed races from the Brazilian Northeast semi-arid through the PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) technique, it was studied the polymorphism of the kappa-casein gene. The DNA extraction of the blood was made by using the phenol-chloroform protocol, and the κ -casein gene was amplified by the PCR (Polymerase Chain Reaction). After that, it was used the restriction enzyme HaeIII to obtain the profile of the studied races for the allele of the κ -casein. It was observed the exclusive presence of the genotype A/A of the κ -casein in both Moxotó and mixed-breed animals from the Brazilian Northeast semi-arid herd. Thus, it is demonstrated the uniformity of the studied herd and the genetic proximity among Moxotó and mixed-breed race females, derived from random mixing.

KEY-WORDS: DNA, milk, PCR-RFLP.

Introdução

A espécie caprina tem como uma de suas aptidões a produção de leite, caracterizado por apresentar glóbulos graxos menores do que o leite de vaca e a presença das proteínas (caseínas) variáveis, de acordo com os alelos presentes no locus. O leite dos ruminantes contém seis proteínas que podem ser classificadas em dois grupos: caseínas e proteínas do soro. A caseína, principal fração protéica do leite de ruminantes, é um dos componentes mais valiosos em função de seu valor nutricional e propriedades tecnológicas (GIOIA et al., 1998).

A kappa caseína (κ -caseína) é a proteína do leite que determina o tamanho e funções específicas das micelas e sua clivagem pela quimosina é responsável pela coagulação do leite (YAHYAOUÏ et al., 2001). O gene da κ -caseína caprina (CSN3) compreende 5 exons, estando a região codificante para a proteína, contida nos exons 3 (9 aminoácidos) e 4 (171 aminoácidos) (YAHYAOUÏ et al., 2003).

Este locus passou a ser considerado polimórfico quando Di Luccia et al. (1990) relataram variações (alelos A e B) em um rebanho italiano. Estudos posteriores, em caprinos, demonstraram que o gene da κ -caseína é extremamente polimórfico (CAROLI et al., 2001; YAHYAOUÏ et al., 2001; ANGIOLILLO et al., 2002). Devido à importância da κ -caseína nas propriedades tecnológicas do leite, vários pesquisadores analisaram esta proteína em cabras na busca de variantes genéticas, descrevendo a existência de polimorfismos (DI LUCCIA et al., 1990; JAUBERT; MARTIN, 1992; LAW; TZIBOULA, 1993; RECIO et al., 1997).

O polimorfismo genético das caseínas caprinas tornou-se uma área de pesquisa de interesse, em virtude de sua relação com a composição do leite e características tecnológicas importantes para fabricação de queijos e outros produtos lácteos (BALTRENAITÉ et al., 2007). Além disso, o interesse na variabilidade dos genes do leite caprino foi incentivado pela grande variabilidade observada na espécie bovina e a associação das variantes com a produção de leite, propriedades tecnológicas e saúde humana (LODES et al., 1996; FREYER

et al., 1999; MCLACHLAN, 2001). O estudo do polimorfismo genético da κ -caseína, de animais criados nas condições zoonitárias e de bioclimatologia do Nordeste brasileiro, permitirá o conhecimento da síntese protéica do leite de cabras de diferentes raças, o que, a partir de um programa de melhoramento genético, utilizando animais com características desejadas, permitirá melhorias nos sistemas de produção de leite.

O objetivo neste estudo foi caracterizar os diferentes alelos da κ -caseína, usando a técnica PCR-RFLP e a enzima HaeIII, em cabras nativas da raça Moxotó e Sem Raça Definida (SRD), em rebanhos do Semi-Árido do Nordeste brasileiro, visto que a identificação das caseínas do leite, mediante o emprego da biologia molecular, pode contribuir para o ajuste de programas de melhoramento animal, em relação ao tipo de emprego/produção a que se destina um determinado tipo de caseína.

Material e Métodos

Coleta de material biológico

Foram colhidas amostras de 5 mL de sangue total, de caprinos adultos da raça Moxotó e mestiços (215 animais), do sexo feminino, clinicamente saudáveis, criados de maneira extensiva; provenientes de regiões do semi-árido do Nordeste do Brasil, especificamente dos estados do Ceará, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte.

Extração do DNA

O sangue foi centrifugado (10 min. a 825 g) e lavado com solução salina (0,9% em NaCl), repetida por três vezes para obtenção dos leucócitos. O DNA genômico foi extraído de uma alíquota de 100 μ L de leucócitos, usando 100 μ L de TE (Tris 10 mM – EDTA 1 mM pH 8,0) e 100 μ L de fenol equilibrado pH 8,0, por centrifugação (5 min. a 18.000 g). A uma alíquota de 100 μ L do sobrenadante foi adicionado 100 μ L de fenol-clorofórmio (1:1) (centrifugação por 5 min. a 18.000 g), em seguida, a uma alíquota de 100 μ L do sobrenadante foi adicionado 100 μ L de clorofórmio (novamente centrifugado por 5 min. a 18.000 g). Para precipitação do DNA, foi utilizado 10 μ L de acetato de amônio 3 M, 100 μ L do sobrenadante (DNA) e 100 μ L de isopropanol, esta mistura foi incubada por, no mínimo, 60 min em freezer a -20°C e posteriormente centrifugada por 5 min. a 18.000 g). O pellet foi lavado com 500 μ L de etanol 70% mediante centrifugação (5 min. a 17.968 g) e o DNA extraído foi quantificado e avaliado, mediante leitura em espectrofotômetro (Bionate 3 - Thermo Scientific).

Amplificação e Polimorfismo da κ -caseína (PCR-RFLP)

O gene da κ -caseína foi amplificado usando a reação de polimerase em cadeia e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) (ANGIOLILLO et al., 2002). Cada PCR foi realizada em volume final de 25 μ L contendo 100 ng de DNA genômico, 2,5 μ L de tampão 10X PCR, 1,75 μ L de MgCl₂ (50 mM), 10 pmol de cada primer (direto 5' TCCCAATGTTGTACTTTCTTAACATC 3', reverso 5' GCGTTGTCCTCCTCTTTGATGTCTCCTTAG 3'), 2,5 μ L de cada dNTP (0,4 mM de cada base - Invitrogen), 1,0 U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e 16,15 μ L de água pura.

O protocolo de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 min., 10 ciclos de 97 °C por 15 s, 63 °C por 1 min. e 72 °C por 1 min. e 30 s, seguidos de 25 ciclos de 95 °C por 30 s, 63 °C por 1 min. e 72 °C por 1 min. e 30 s, com uma extensão final de 72 °C por 10 min. no final do ciclo.

O fragmento amplificado de 645 pb foi digerido em volume final de 15 μ L: 5 μ L do produto de PCR, 8,4 μ L de água pura, 1,5 μ L de tampão da enzima, 1,0 U da enzima HaeIII (New England – Biolabs), por quatro horas a 37 °C; em seguida, a enzima foi inativada a 65°C por 20 minutos.

Os produtos dos fragmentos digeridos foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (10 ng / μ L, usando marcador de peso molecular (50 bp DNA-Ladder – LGC Biotecnologia).

Resultados e Discussão

As amplificações dos alelos CSN3 da κ -caseína ocorreram em todos os animais estudados e apresentaram o mesmo padrão de amplificação com 645 pb. (Figura 1). Os resultados da digestão enzimática (HaeIII) demonstraram a presença, na população estudada, de apenas um padrão de pares de bases com o alelo A (416 + 229pb) (Figura 2).

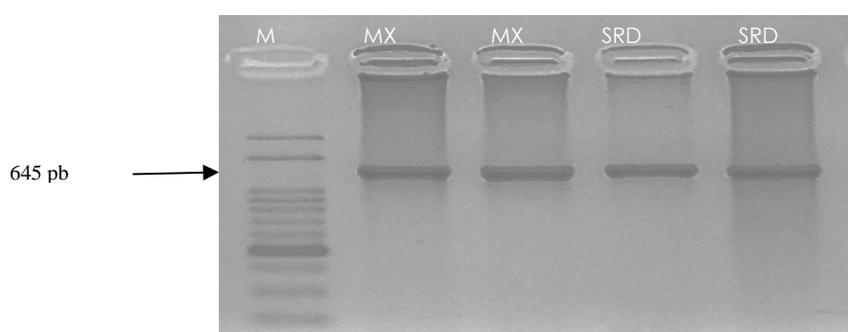


Figura 1. Fragmento de DNA amplificado (645pb), contendo a região do gene CSN3 da κ -caseína caprina em cabras da raça Moxotó (MX) e Sem Raça Definida (SRD). M: Marcador DNA-Ladder 50 bp.

Figure 1. DNA amplified fragment (645bp) containing the CSN3 gene of κ -casein in Moxotó (MX) and without defined breed (SRD) goats. M - DNA-Ladder 50 bp.

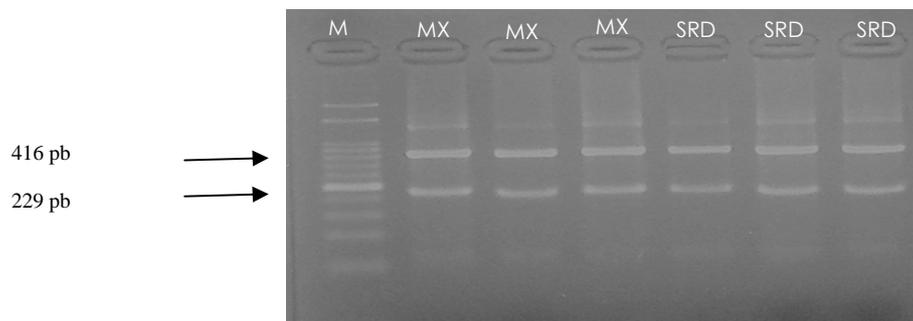


Figura 2. Padrão eletroforético obtido por digestão com endonuclease HaeIII da região do DNA que contém o gene CSN3 em cabras da raça Moxotó (MX) e Sem Raça Definida (SRD). M: Marcador DNA-Ladder 50 pb.

Figure 2. DNA electrophoretic patterns obtained after digestion with HaeIII endonuclease of the DNA region containing the goat CSN3 gene in Moxotó (MX) and without defined breed (SRD) goats. M – DNALadder 50 pb.

Vários estudos têm identificado polimorfismos no gene da κ -caseína caprina, mas apenas recentemente as variantes genéticas foram caracterizadas. Sete sítios polimórficos foram identificados (YAHYAOUÏ et al., 2001) que resultam em três alelos da κ -caseína (CAROLI et al., 2001). Por meio do presente estudo, o gene CSN3 foi amplificado com primers específicos e os fragmentos, gerados pela digestão da endonuclease HaeIII, de 416 e 229 pb estão próximos dos observados por Angiolillo et al. (2002). Estes fragmentos caracterizam o genótipo A/A, sendo encontrado em 100% dos animais deste estudo, na raça nativa Moxotó e nos animais Sem Raça Definida (SRD).

A semelhança genética, pela digestão com a enzima HaeIII, entre os animais Moxotó e SRD observada neste estudo, caracteriza a presença da raça nativa (Moxotó) nos cruzamentos que deram origem os animais SRD. De acordo Ribeiro (2004), a raça Moxotó encontra-se disseminada, sofrendo diluição genética pela participação em cruzamentos com raças exóticas ou outras nativas, dando origem ao rebanho Sem Raça Definida (SRD).

Yahyaoui et al. (2001) detectaram e caracterizaram três variantes do gene CSN3 (designados A, B e C) em rebanhos da Espanha e da França. Angiolillo et al. (2002)

detectaram a presença do alelo G em rebanhos caprinos da Itália (Teramana, Garganica, Girgentana, Sarda e Cilentana nera), da Espanha (Murciano-Granadina e Canaria) e da França (Saanen e Alpina). Yahyaoui et al. (2003), analisando a associação entre as diferentes mutações, identificaram duas variantes designadas de κ -caseína F e G, que estão presentes nos rebanhos caprinos italianos Teramana, Girgentana e Sarda. Pimenta et al. (2006) detectaram a predominância dos alelos A e B, com maior percentual do alelo B, durante a genotipagem do gene CSN3 de raças caprinas nativas portuguesas (Serrana, Bravia, Serpentina, Algarvia e Charnequeira) com a utilização do método rápido de polimorfismos no gene da κ -caseína caprina, que facilitou a pesquisa das sete variantes alélicas descritas .

Apesar do polimorfismo detectado por outros autores em cabras nativas de outros países, os animais deste estudo apresentaram apenas um alelo pela técnica empregada, o que a princípio pode significar uma homogeneidade dos animais estudados da raça Moxotó para este gene, bem como a grande influência que esta raça tem na formação dos animais SRD.

Em ovinos, a κ -caseína é considerada monomórfica (MOIOLI et al., 1998) enquanto que nos bovinos a k-CN tem seis variantes, sendo a A e B as mais comuns. (KAMINSKI, 1996). O leite de vacas que contém o alelo B em sua composição genética, possui micelas menores e mais homogêneas, com uma elevada concentração de κ -caseína no leite resultando em um maior rendimento de queijo (NG-KWAI HANG, 1998).

Conclusão

Com base nos resultados do presente trabalho, observa-se a presença exclusiva do genótipo A/A da κ -caseína tanto em animais da raça Moxotó como naqueles SRD, de rebanhos do Semi Árido do Nordeste Brasileiro. Com isso, demonstra-se a homogeneidade da raça Moxotó nos rebanhos dos diferentes Estados do Nordeste do Brasil e a proximidade genética, nesse locus estudado, entre esta raça e os animais SRD, decorrente de cruzamentos aleatórios.

Referências

ANGIOLILLO, A.; YAHYAUI, M. H.; SANCHEZ, A.; PILLA, F., FOLCH, J. M. Short communication: Characterization of a new genetic variant in the caprine k-casein gene. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 2679-2680, 2002.

BALTRENAITĖ, L.; KRIAUSIENĖ, J.; MIVIKIENĖ, I. Goat kappa casein gene polymorphism. *Veterinarija ir Zootechnika*, v. 38, n. 60, p. 9-12, 2007.

CAROLI, A.; JANN, O.; BUDELLI, E.; BOLLA, P.; JAGER, S.; ERHARDT, G. Genetic polymorphism of goat k-casein in different breeds and characterization at DNA level. *Animal Genetics*, v.32, p. 226-230, 2001.

DI LUCCIA, A. et al. K-casein polymorphism in caprine milk. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casaria*, v. 41, p. 305-314, 1990.

FREYER, G.; LIU, Z.; ERHARDT, G.; PANICKE, L. Casein polymorphism and relation between milk production traits. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 116, p. 89-97, 1999.

GIOIA, LA D. et al. Identificação dos alelos e genótipos da α s1-caseína em caprinos leiteiros. Botucatu, 1998. Disponível em: <www.sbz.org.br/anais_1998/megea_010.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2009.

JAUBERT, A.; MARTIN, P. Reverse phase HPLC analysis of goat caseins. Identification of as1 and as2 genetic variants. *Lait*, v. 72, p. 235-247, 1992.

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

LAW, A. J. R., TZIBOULA A. Fractionation of caprine k-casein and examination of polymorphism by HPLC. *Milchwissenschaft*, v. 48, p. 68-71, 1993.

LODES, A.; BUCHBERGER, J.; AUMANN, J.; KLOSTERMEYER, H. The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk. 1. Casein micelle size and the content of non-glycosylated kappa casein. *Milchwissenschaft*, v. 51, p. 368-373, 1996.

MCLACHLAN, C.N. Beta-Casein A ischaemic heart disease mortality and other illnesses. *Medical Hypothesis*, v. 56, p. 262-272, 2001.

MOIOLI, B.; PILLA, F.; TRIPALDI, C. Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*, v.27, p.185-195, 1998.

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

PIMENTA, J.; LOPES, A.; GAMA, L.; SILVA, F.; CAROLINO, I. Detecção simultânea por método rápido de polimorfismos no gene da K Caseína (K-CN) caprina em raças autóctones. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v. 101, n. 559-560, p. 269-271, 2006.

RECIO, I.; PEREZ-RODRIGUEZ, M. L.; AMIGO, L.; RAMOS, M. Study of the polymorphism of caprine milk caseins by capillary electrophoresis. Journal of Dairy Research, v. 64, p. 515-523, 1997.

RIBEIRO, F. L. A importância das cabras mestiças na produção de leite. Bahia: (s. n.), 2004. Disponível em: <<http://www.accoba.com.br/ap>> Acesso em: 20 dez. 2008

YAHYAOU, M. H.; COLL, A.; SANCHEZ, A.; FOLCH, J.M. Genetic polymorphism of the caprine kappa casein gene. Journal of Dairy Research, v. 68, p. 209-216, 2001.

YAHYAOU, M. H.; ANGIOLILLO, A.; PILLA, F.; SANCHEZ, A.; FOLCH, J. Characterization and genotyping of the caprine k-casein variants. Journal of Dairy Science, Barcelona, v. 86, p. 2715-2720, 2003.

5. Considerações Finais

Através do presente estudo constatou-se a presença exclusiva do genótipo A/A da κ -caseína tanto em animais da raça Moxotó como naqueles SRD, de rebanhos do Semi-Árido do Nordeste Brasileiro. Com isso, demonstra-se a homogeneidade da raça Moxotó nos rebanhos dos diferentes Estados do Nordeste do Brasil e a proximidade genética entre a raça Moxotó e os animais SRD com base na estabilidade da composição de bases do gene estudado, caracterizando a origem similar destes animais. Além disso, diante da detecção da maior presença do alelo B (forte) do gene da α S1-caseína nos animais estudados, admite-se a possibilidade de que fenotipicamente esses animais venham a exibir a característica de uma forte produção de proteínas, característica importante para o leite destinado à produção de queijos, favorecendo a caprinocultura da região. Outros estudos quanto à presença do gene da α S1-caseína em outras populações caprinas nativas devem ser realizados para uma avaliação mais ampla, já que foi constatada a presença do alelo D, embora em menor proporção, que deve ter sido introduzido pelo cruzamento de animais nativos com outros de raças exóticas para formar os produtos SRD.

