

FABIO MONTEIRO DE REZENDE

CARACTERIZAÇÃO DE REBANHOS LEITEIROS ATRAVÉS DA
TIPIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES

RECIFE
PERNAMBUCO - BRASIL
2010

FABIO MONTEIRO DE REZENDE

CARACTERIZAÇÃO DE REBANHOS LEITEIROS ATRAVÉS DA
TIPIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte dos pré-requisitos para obtenção
do título de Mestre em Zootecnia, área Produção Animal.

Orientador: Severino Benone Paes Barbosa, D.Sc

Co-orientador: Manoel Adrião, D.Sc

RECIFE
PERNAMBUCO - BRASIL
2010

Ficha catalográfica

R467c Rezende, Fabio Monteiro de
Caracterização de rebanhos leiteiros através da
tipificação de marcadores moleculares / Fabio Monteiro de
Rezende. -- 2010.
34 f. : il.

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

Referências.

1. PCR/RFLP 2. Proteínas láteas 3. Qualidade do leite
4. Polimorfismo I. Barbosa, Severino P., orientador II. Título

CDD 636.2082

FABIO MONTEIRO DE REZENDE

Dissertação defendida e aprovada em, 29/03/2010, pela Banca Examinadora.

Orientador:

Prof. Severino Benone Paes Barbosa, D. Sc.
Professor - UFRPE

Examinadores:

Manoel Adrião Gomes Filho, D.Sc.
Professor – UFRPE

Kléber Régis Santoro, D. Sc.
Professor – UFRPE/UAG

Maria de Mascena Diniz Maia, D. Sc
Professora – UFRPE

RECIFE
PERNAMBUCO - BRASIL
2010

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Considerações Gerais	07
Revisão da Literatura _____	07
Literatura Citada _____	12
CAPÍTULO 2: Caracterização de rebanhos leiteiros da raça holando-gir através da tipificação de marcadores moleculares para kapa-caseína _____	15
Resumo _____	16
Abstract _____	17
Introdução _____	18
Metodologia _____	20
Resultados e Discussão _____	25
Conclusões _____	30
Literatura Citada _____	31

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – *Caracterização de rebanhos leiteiros da raça holando-gir através da tipificação de marcadores moleculares para kappa-caseína*

Tabela 1. Descrição das etapas da PCR. _____ 23

Tabela 2. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas dos animais Holando-Gir ($\frac{1}{2}$, $\frac{5}{8}$ e $\frac{3}{4}$) e de Qui-quadrado (0,05) para as frequências genótípicas. _____ 27

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 - *Caracterização de rebanhos leiteiros da raça holando-gir através da tipificação de marcadores moleculares para kappa-caseína*

Figura 1. Fragmento de DNA amplificado (1050pb), contendo a região do gene *kappa-casein* exons 3-5 da k-caseína bovina, M: Marcador DNA-Ladder 50bp, 1 e 55 animais $\frac{1}{2}$ H, 25 e 70 animais $\frac{5}{8}$ H e 36 animal $\frac{3}{4}$ H. _____ 25

Figura 2. Genotipagem em bovinos da Kappa-caseína, usando a reação em cadeia de polimerase (PCR) seguido pela ação da enzima de digestão Hind III. _____ 26

Capítulo 1- Considerações Gerais

REVISÃO DA LITERATURA

O desenvolvimento de novas técnicas na área da biologia molecular tem facilitado o estudo da composição genética dos indivíduos, tornando possível a realização da seleção em animais, plantas e microorganismos baseados em características genotípicas. Em bovinos leiteiros, estas técnicas vêm sendo utilizadas através do uso de marcadores moleculares para estudar genes que afetam a composição corporal, o ganho de peso e a produção de leite. A vantagem do uso dos marcadores moleculares é permitir a determinação do potencial de um animal com maior precisão, uma vez que não são afetados pelo meio e podem ser utilizados precocemente, até mesmo na fase embrionária (RACHAGANI et al., 2006). Trabalhos recentes têm demonstrado melhoramento das características genotípicas/fenotípicas de interesse zootécnico através da análise comparativa entre diferentes modelos biológicos.

Tendo como objetivo o melhor conhecimento das variações das características quantitativas, os avanços da biologia molecular e da genética permitem a identificação e a localização dos efeitos de *loci* de maior influência nas características desejadas e a melhor compreensão das suas interações (SPELMAN e GARRICK, 1997). Esses *loci*, denominados de QTL (*quantitative trait loci*), ou seja, *loci* controladores de características quantitativas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996), dependendo de parâmetros como herdabilidade e variância genética da característica, tempo e forma de seleção, entre outros, podem ser incluídos como marcadores genéticos em programas de melhoramento.

A tendência mundial na criação de rebanhos leiteiros comerciais se projeta para incrementar a produção por vaca e estabelecer sistemas de melhorias na qualidade do leite, fundamentalmente, em proteínas e sólidos não-gordurosos. Nos últimos anos, a inclusão da genética molecular tem proporcionado a busca de regiões cromossômicas responsáveis pelo determinismo genético desses caracteres produtivos, com vista a manipulá-los, em função de se lograr melhores rendimentos e qualidade nessas características (MARTIN et al., 2002).

A produção industrial de leite tem se baseado em identificar uma eficiente e econômica via para o aumento da produção de leite e de seus constituintes com o aumento do rebanho. A seleção de animais com genótipos desejados e a manutenção deles para reprodução das próximas gerações tem sido a base para a sustentabilidade e eficiência dessa indústria (RACHAGANI et al., 2006). Por isso, aplicar a informação molecular à seleção artificial de rebanhos bovinos leiteiros consiste no que se tem chamado de *seleção assistida por marcadores* (MAS). Os diversos estudos realizados através deste método têm permitido analisar a incidência da incorporação da informação de marcadores aos planos de melhoramento genético. O resultado obtido tem demonstrado que o uso de marcadores na seleção reduz o intervalo de geração, possibilita o conhecimento do genótipo do animal, desde o estado embrionário, e aumenta a precisão na avaliação, já que existem mais informações fenotípicas e genotípicas para o caráter em questão, aumentando, assim, o progresso genético entre 1,5% e 38% por geração, dependendo da espécie, incrementando, desta maneira, a eficiência da seleção artificial. (GONYON et al., 1987) Um dos resultados mais relevantes neste campo é, sem dúvida, a identificação das variantes genéticas para as proteínas lácteas e o efeito que elas proporcionam sobre o rendimento lácteo em gordura e proteína.

As diferenças genéticas representam, aproximadamente, 25% da variação total na produção de leite, e 50% nas variações dos teores de gordura, proteína e sólidos não-gordurosos (GONYON et al., 1987). Essas características, além de apresentarem herança complexa, que envolve a presença ou ausência de numerosos alelos no mesmo *locus*, requerem avaliação minuciosa, sendo o mérito genético da vaca conhecido somente quando ela finaliza sua primeira lactação ou, no caso do reprodutor, até que existam informações a respeito de sua progênie.

A inclusão do estudo dos componentes lácteos como proteína, caseína e sólidos não-gordurosos, unida à investigação do polimorfismo genético através de marcadores moleculares relacionados com as características produtivas, contribuirão para estabelecer as bases e melhorar a eficiência da seleção para rendimentos e qualidade do leite nos rebanhos, especialmente em proteína e, com isso, dar o passo inicial para implementação de um futuro programa de

melhoramento genético assistido por marcadores, alcançando, assim, o progresso genético de rebanhos leiteiros.

O marcador genético pode ser definido como qualquer variação estável e herdável que pode ser mensurado ou identificado por metodologia apropriada e ser utilizado, conseqüentemente, para detectar a presença de genótipo ou fenótipo específico, que de outra forma não seriam mensuráveis ou muito difíceis de serem detectados. Em ruminantes existem seis genes relacionados às proteínas do leite; α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e as quatro caseínas em várias formas moleculares (α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína e k-caseína) com alelos variando para cada tipo (MEDRANO e AGUILAR-CORDOVA, 1990; MARTIN, et al., 2002; UFFO et al., 2006).

A k-caseína (k-Cn) é essencial para a formação e estabilização das micelas e tem um efeito importante sobre as propriedades do leite (teores de gordura, lactose e proteínas – Tsiaras et al., 2005). Já a 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. Para a formação do coalho na produção de queijo, é necessária a digestão da k-Cn, produzindo a precipitação das micelas. Em bovinos são descritas seis variedades (A, B, C, E, F, e G) da k-Cn (Kaminski et al., 1996). Vários estudos têm sido descritos com relação ao genótipo BB da k-Cn, que determina uma melhor propriedade do leite para a produção de queijo (NG-KWAI-HANG, 1998; VIANA et al., 2001; SORIA et al., 2003; SULIMOVA et al., 2007a; SULIMOVA et al., 2007b). Em particular, este genótipo está associado ao coalho mais firme, com uma redução do tempo necessário para a formação do coalho e com um maior rendimento da produção de queijo.

Segundo Lodish et al., (2002) os polimorfismos genéticos são variações na sequência de DNA que podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e parecem estar associados a apenas uma base. A frequência de alelos heterozigotos para o polimorfismo genético ocorre em mais de 2% da população. Algumas dessas alterações ocorrerão em sequências não codificadoras do gene, que na maioria dos casos terão efeito em suas características de produção, o que no ponto de vista da atividade pode ser positiva ou negativa.

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

Wal (2001) e Hoz Caballer et al. (2004) atribuem os fatores alergênicos às caseínas 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 Imunoglobulina E (IgE), pois 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 em uma concentração inferior ao leite de vaca (PINA et al., 2005).

Para identificação de certos caracteres, como as proteínas do leite, pode-se recorrer à técnica de RFLP (*restriction fragment length polymorfism*), que se baseia na presença de sítios 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), com uma ou mais endonucleases de restrição.

O desenvolvimento da técnica de PCR por Mullis, em 1983, proporcionou um grande avanço para o melhoramento genético animal, servindo como uma ferramenta precisa para o processo de seleção. Essa técnica baseia-se na amplificação *in vitro* de regiões específicas de DNA, com o auxílio de *primers* complementares às sequências específicas (localizadas em uma das extremidades do segmento a ser amplificado), ao final da PCR, milhões de cópias do segmento de DNA amplificado são obtidas.

Pode-se recorrer, também, a algumas técnicas de uso corrente como, por exemplo, o mapeamento genético com análise de regiões microssatélites do maior número possível de indivíduos de grandes famílias originárias de acasalamentos direcionados (HALEY, 1995) ou à busca de genes principais ou candidatos, em que se objetiva estudar os mecanismos fisiológicos envolvidos com a manifestação de características desejáveis, na tentativa de pesquisar variações de genes específicos entre indivíduos que apresentam genótipos diferentes (WOMACK, 1993)

Os criadores de gado de leite brasileiros iniciaram, na década de 40, os cruzamentos entre animais das raças Gir e Holandês, com o objetivo de explorar a rusticidade e produtividade dessas raças, na tentativa de se criar animais com alta capacidade produtiva em ambientes tropicais e subtropicais. A multiplicação desses animais ocorreu de forma intensa, o que levou à distribuição desse gado leiteiro mestiço por grande parte do território nacional. Entretanto, essa multiplicação ocorreu de forma desordenada e sem critérios técnicos, o que gerou uma população de animais mestiços muito rústicos, mas de baixa produtividade (FREITAS, 2003).

A região Nordeste, no entanto, não é uma grande produtora de leite, se comparada a sua produção anual em relação ao número de habitantes. A falta de especialização dos rebanhos leiteiros é outro aspecto negativo que caracteriza a pecuária leiteira nordestina, considerando que, a despeito de sua baixa produção, é a segunda do país em número de vacas ordenhadas, o que demonstra a baixa produtividade do plantel (NOGUEIRA FILHO et al., 2001).

O Estado de Pernambuco produziu 398 milhões de litros de leite em 2004, o que representou 14,7% da produção da região nordeste e 1,7% da produção nacional, sendo que o Agreste Pernambucano, região intermediária entre a Zona da Mata e o Sertão, foi responsável por 73% da produção do estado entre 2004 e 2006 (MONTEIRO et al., 2007). Deste modo, o Agreste de Pernambuco, historicamente, foi e continua sendo uma região produtora de leite, produzindo excedentes que contribuem para o abastecimento de todo o Estado.

LITERATURA CITADA

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. (EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20), 220 p. 1996.

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

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

HALEY, C. S. Livestock QTLs: bringing home the bacon? **Trends Genet.**, v.11(12), p.488-492, 1995.

HOZ CABALLER, B., GONZÁLEZ MENDIOLA, R., MUÑOZ MARTÍN, T. et al. Selective allergy to sheep's and goat's milk proteins. **Allergol et Immunopatho**, v. 32(1), p. 39-42, 2004.

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

LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL J. Análise genética em biologia molecular. In: Nader HB, editor. *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Revinter, p.255-93, 2002.

MARTIN, P. **La composition protéique du lait de chèvre: ses particularités**. In: Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre, Les Colloques n°81. Editions INRA, Paris. p. 27-50, 1997.

MARTIN P., SZYMANOWSKA M., ZWIERZCHOWSKI L. et al. (2002). The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milk. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.42(5), p. 433-459, 2002.

MEDRANO, J.F., AGUILAR-CÓRDOVA E. (1990). Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. **Bio/Technology**, v. 8(2), p. 144-146.

MONTEIRO, A. A.; TAMANINI, R.; DA SILVA, L.C.C.; DE MATTOS, M.R.; MAGNANI, D.F.; D'OVIDIO, L. et al. Características da Produção Leiteira da Região do Agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 4, p. 665-674, out./dez. 2007.

NG-KWAI-HANG, K.F. Genetic polymorphism of milk proteins: relationships with production traits, milk composition and technological properties. **Can. J. Anim. Sci.**, v.78, p.131-147. (Suppl.), 1998.

NOGUEIRA FILHO, A.; PIMENTEL, J.C.M.; CARVALHO, J.M.M.; RODRIGUES, M.T.; EVANGELISTA, F.R. A produção dentro do sistema agroindustrial do leite no Nordeste. **XXXIX Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural**. Recife, PE. 2001.

NOUAILLE, S., BERMÚDEZ-HAMURÁN, L.G., ADEL-PATIENT, K. et al. (2005). Improvement of bovine β -lactoglobulin production and secretion by *Lactococcus lactis*. **Braz. J. of Med. and Biol. Res.**, v.38(3), p. 353-359, 2005.

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

RACHAGANI S., GUPTA I.D., GUPTA, N., et al. Genotyping of β -lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. **BMC Genetic**, v. 7, p.31-34, 2006.

SORIA L. A., IGLESIAS G.M., HUGUET M. J. et al. A PCR-RFLP test to detect allelic variants of the bovine kappa-casein gene. **Anim. Biotechnol.**, v. 14(1), p. 1-5, 2003.

SPELMAN, R., GARRICK, D. Utilization of markers assisted in a commercial dairy cow population. **Livest. Prod. Sci.**, v.47, p. 139-147, 1997.

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

_____. K-casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. **Russian J. Genet.**, v. 43, (1), p. 73-79, 2007b.

TSIARAS A. M., BARGOULI G. G., BANOS G. et al. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. **J. Dairy Sci.**, v. 88(1), p. 327-334, 2005.

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

VIANA, J. L., FERNÁNDEZ, A., IGLESIAS, A. et al. Análises de los genótipos más frecuentes de la k-caseína em la raza vacuna Rubia Gallega mediante PCR/RFLPs. **Archivos de Zootecnia**, v.50, p. 91-96, 2001.

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

WOMACK, J. E. The goat and status of the bovine gene map. **J. Dairy Sci.**, v.76(4), p.1199-1203, 1993.

Capítulo 2

Caracterização de rebanhos leiteiros da raça holando-gir do Agreste e Zona da Mata Norte de Pernambuco através da tipificação de marcadores moleculares para kapa-caseína

*Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Zootecnia

Caracterização de rebanhos leiteiros da raça holando-gir do Agreste e Zona da Mata Norte de Pernambuco através da tipificação de marcadores moleculares para kapa-caseína

RESUMO

A seleção genética de animais para reprodução das próximas gerações tem sido a base para a sustentabilidade e eficiência da produção alimentícia de origem animal. A identificação de variantes das proteínas lácteas pode ser uma alternativa para a expansão produtiva de leite. Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o genótipo da kapa-caseína em 144 vacas holando-gir (30 $\frac{1}{2}$ holando-gir, 38 $\frac{3}{4}$ holando-gir, 76 $\frac{5}{8}$ holando-gir) do Estado de Pernambuco, utilizando a técnica de PCR-RFLP. Foram coletadas amostras de sangue total de bovinos da raça holando-gir e seus graus de sangue ($\frac{1}{2}$ holando-gir, $\frac{3}{4}$ holando-gir, $\frac{5}{8}$ holando-gir), desse material foi extraído o DNA. Desse DNA foi determinado uma região que foi amplificada, e seu produto sofreu ação da enzima de restrição HindIII para observar os possíveis polimorfismos. Foi encontrado as frequências dos genótipos AA(0,59) AB(0,25) BB(0,06) BC(0,02) CC(0,02) e AC(0,05) e também a frequência dos alelos A(0,74) B(0,20) e C(0,06) apontando que selecionar rebanhos para produção de tipos de leite específicos pode contribuir no beneficiamento do produto pela indústria.

Palavras-chave: PCR/RFLP, proteínas lácteas, qualidade do leite, polimorfismo

Characterization of holando-gir dairy heard through molecular markers typefication for kappa-casein

ABSTRACT

The animal breeding for reproduction of next generation has being the support for sustainability and efficiency in animal protein food production. The identification of different kind of milk protein can be an alternative for milk yield expansion. This study has the issue of characterize the genotype of kappa-casein in holando-gir cows ($\frac{1}{2}$ holando-gir, $\frac{3}{4}$ holando-gir, $\frac{5}{8}$ holando-gir) of Pernambuco State utilizing the PCR-RFLP technique. It was collected blood sample of bovine of holando-gir breed and its types ($\frac{1}{2}$ holando-gir, $\frac{3}{4}$ holando-gir, $\frac{5}{8}$ holando-gir). From these material, was extruded the DNA. It was determined a region of this DNA and this region was amplified, and on the product, was added the restriction enzyme HindIII, that act and made it possible to observed the possible polymorphisms. It was found the genotype frequencies AA(0,59) AB(0,25) BB(0,06) BC(0,02) CC(0,02) e AC(0,05) and also the allelic frequencies A(0,74) B(0,20) e C(0,06) showing that selecting herds for specifics kinds of milk can contribute on processing milk by the industry.

Key-words: kappa-casein, molecular markers, PCR/RFLP, polymorphism

INTRODUÇÃO

A tendência mundial na criação de rebanhos leiteiros comerciais se projeta para incrementar a produção por vaca e estabelecer sistemas de melhorias na qualidade do leite (proteínas e sólidos não-gordurosos). Nos últimos anos, a inclusão da genética molecular tem proporcionado a busca de regiões cromossômicas responsáveis pelo determinismo genético desses caracteres produtivos, com vista a manipular suas frequências, em função de se lograr melhores rendimentos e qualidade nesses parâmetros.

A indústria do leite tem se baseado em identificar uma eficiente e econômica via para o aumento da produção de leite e de seus constituintes. A seleção de animais com genótipos desejados e a manutenção deles para reprodução das próximas gerações, tem sido a base para a sustentabilidade e eficiência desta indústria (RACHAGANI et al., 2006). Por isso, aplicar a informação molecular à seleção artificial consiste no que se tem chamado de seleção assistida por marcadores (MAS). O seu uso na seleção reduz o intervalo de geração, possibilita o conhecimento do genótipo do animal e aumenta a precisão na avaliação, aumentando, assim, o progresso genético entre 1,5% e 38% por geração e incrementa a eficiência da seleção artificial. Um dos resultados mais relevantes neste campo é a identificação das variantes genéticas para as proteínas lácteas e o efeito que elas proporcionam sobre o rendimento lácteo em gordura e proteína.

A k-caseína (k-Cn) é essencial para a formação e estabilização das micelas e tem um efeito importante sobre as propriedades do leite (TSIARAS et al., 2005). Para a formação do coalho na produção de queijo é necessária a digestão da k-Cn, produzindo a precipitação das micelas. Em bovinos são descritas seis variedades (A, B, C, E, F, e G) da k-Cn (Kaminski et al., 1996). Vários estudos têm sido descritos com relação ao

genótipo BB da k-Cn, que determina uma melhor propriedade do leite para a produção de queijo (SULIMOVA et al., 2007b). Este genótipo está associado com o coalho mais firme, com uma redução do tempo necessário para sua formação e com maior rendimento da produção de queijo.

A maior parte dos trabalhos realizados nessa área foi com animais holandeses e animais mestiços de diversos países. No caso do Brasil, a base da bovinocultura de leite são todos os graus de sangue do cruzamento holando-gir, inclusive a $\frac{5}{8}$ que foi fixada como a raça sintética Girolando. Esses animais têm uma grande importância na produção de leite, principalmente no Estado de Pernambuco, devido, especialmente, a sua rusticidade. Já o interesse da indústria por leite desses animais se resume a seus altos teores de sólidos, quando comparados com a raça Holandesa.

Para identificação de certos caracteres, como as proteínas do leite, pode-se recorrer à técnica de RFLP (*restriction fragment length polymorfism*) que se baseia na presença de sítios 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), com uma ou mais endonucleases de restrição.

Objetivos

Investigar o genótipo kapa-caseína em vacas holando-gir ($\frac{1}{2}$ holando-gir, $\frac{3}{4}$ holando-gir, $\frac{5}{8}$ holando-gir) do Estado de Pernambuco utilizando a técnica de PCR-RFLP.

2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar polimorfismo no gene kapa-caseína.

b) Estabelecer a frequência alélica do gene kapa-caseína no rebanho estudado.

c) Estabelecer a frequência genotípica do gene kapa-caseína no rebanho estudado.

METODOLOGIA

Local de realização

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada - FAMA, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Animais

Foram utilizados para esse estudo 144 animais, sendo 30 animais $\frac{1}{2}$ holando-gir, 38 animais $\frac{3}{4}$ holando-gir e 76 animais $\frac{5}{8}$ holando-gir, oriundos de duas fazendas particulares e de duas fazendas experimentais pertencentes ao IPA (Instituto Agrônômico de Pernambuco), localizadas nas regiões da Zona-da-Mata Norte e Agreste Central e Agreste Meridional, do Estado de Pernambuco.

Coleta do material biológico e processamento das amostras

Foram colhidas amostras de 10 ml de sangue total (tubos para coleta de sangue a vácuo contendo EDTA), de fêmeas cruzadas Holando-Gir, clinicamente sadias, criadas de maneira semi-intensiva, provenientes de propriedades localizadas na bacia leiteira do Estado de Pernambuco, região da Zona-da-Mata e Agreste.

As amostras foram acondicionadas imediatamente em recipiente contendo gelo. Os leucócitos foram obtidos por centrifugação (3000 rpm por 10 min) e lavados com solução salina (0,9% em NaCl), repetida por três vezes, até as células (eritrócitos e

leucócitos) estarem bem lavadas. Em seguida, com auxílio de uma pipeta, a camada das células brancas foi aspirada, para ser acondicionada em tubo *ependorf* de 1,5ml e armazenada a -20°C

Extração de DNA dos leucócitos

A extração do DNA leucocitário foi realizada através do método modificado descrito por Maniatis et al. (1989). Em um tubo *ependorf* de 1,5ml, devidamente identificado, foi adicionado para uma amostra contendo: 100µl da amostra de leucócito, 50µl de TE (Tris 10 mM – EDTA 1 mM pH 8,0) e 50µl de fenol equilibrado pH 8,0. A amostra foi homogeneizada por 1 minuto através de vórtex e, em seguida, centrifugada a 14000rpm por 5min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo *ependorf* de 1,5ml devidamente identificado, onde 50µl de fenol-clorofórmio (1:1) foi adicionado. Este material foi homogeneizado por 1min através de vórtex e centrifugado a 14000rpm por 5min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo *ependorf* de 1,5ml, devidamente identificado, no qual foi adicionado 100µl de clorofórmio e onde foi homogeneizado por 1min através de vórtex, e centrifugado a 14000rpm por 5min. Em outro tubo *ependorf* de 1,5ml, devidamente identificado, foi adicionado nesta ordem: 1º - 10µl de acetato de amônia 3M; 2º - 100µl do sobrenadante do tubo anterior (onde se encontra os DNAs) e 3º - 100µl de isopropanol. Os tubos foram submetidos ao vórtex por 1min e incubados por, no mínimo, 30min no *freezer*. Em seguida, esse material foi centrifugado a 14000rpm por 15min. O sobrenadante foi desprezado, o pellet foi lavado com 500µl de etanol 70% e submetido à centrifugação a uma rotação de 14000rpm durante 5min a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi deixado à temperatura ambiente para secagem. Em seguida, 30µl de TE (Tris-EDTA pH 8,0) foram utilizados para ressuspender o *pellet*. O DNA extraído foi

analisado e quantificado no espectrofotômetro. Uma amostra desse DNA foi avaliada através de uma corrida de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo. A visualização das bandas foi feita através de luz ultravioleta e fotografado para verificação de sua qualidade.

Dosagem do DNA extraído

Após a extração do DNA, as amostras foram padronizadas quanto à concentração. Para isso, um espectrofotômetro foi utilizado para fazer a dosagem de DNA. Uma concentração-padrão de 50ng/μl foi estipulada em um volume de 20μl para todas as amostras, a fim de se ter uma quantidade padronizada de DNA extraído nas reações de PCR

Reações de amplificação PCR (reação de polimerização em cadeia)

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25μl. Cada reação foi constituída de 4,5μl de MgCl₂, 2μl (100ng) do DNA, 0,5μl do *Primer A* e 0,5μl do *Primer B* (usa-se um *Primer* específico para cada *Loci*), 2,5μl de DNTP, 2,5μl de Tampão, 0,1μl (2 unidades) da enzima Taq DNA polimerase e 12,4μl de água ultra pura. As reações foram efetuadas em um termociclador (Termociclador – Eppendorf Mastercycler personal).

Para as amplificações por PCR do lócus do terceiro exon do gene da kapa-caseína (CSN3), entre os nucleotídeos 10592 e 11466 desse gene (ALEXANDER et al. 1988), foi utilizado o seguinte oligonucleotídeo:

A 5'-GTGCTGAG(T/C)AGGTATCCTAG-3'

B 5'-GTAGAGTGCAACAACACTGG-3'

Os ciclos de temperatura foram testados e ajustados, para a reação, com base nas análises prévias de temperatura de anelamento proposto pelos seguintes autores: Pinder et al., (1991); Bonifácio et al., (2001); Angiolollo, A. et al., (2002); Lien et al., (1993); Sulimova et al., (2007a), Osta et al., (1995); Medrano e Aguilar-Cordova (1990); Udina al., (2001); Mitra et al., (1995). O ciclo utilizado foi para a reação está na tabela 1:

Tabela 1. Descrição das etapas da PCR.

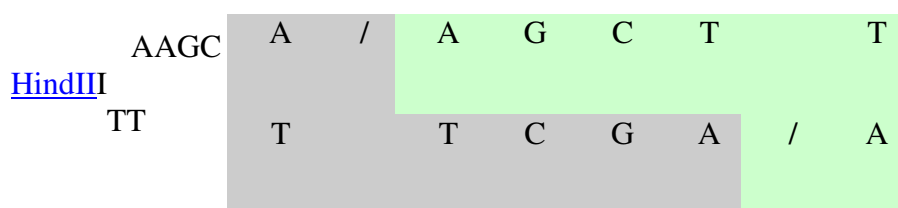
	Temperatura	Tempo
Passo 1 (Desnaturação inicial)	95°	5:00 min
Passo 2 (Desnaturação)	97°	0:15 min
Passo 3 (Anelamento)	56°	1:00 min
Passo 4 (Extensão das fitas)	72°	1:30 min
Passo 5 (10 repetições dos passos 2 à 4)	-	-
Passo 6 (Desnaturação)	95°	0:30 min
Passo 7 (Anelamento)	56°	1:00 min
Passo 8 (Extensão das fitas)	72°	1:30 min
Passo 9 (25 repetições dos passos 6 à 8)	-	-
Passo 10 (Extensão final)	72°	10:00 min
Passo 11 (Final)	4°	∞

Para conferir os produtos de amplificação do PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose 2%. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado utilizando-se, como marcador, fragmentos de pesos moleculares conhecidos (50pb DNA ladder – SAMBROOK et al., 1989; BERGER e KIMMEL, 1987); em seguida foi realizada a foto documentação.

PCR-RFLP (Reação de polimerização em cadeia – polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição)

A reação de corte do DNA amplificado com a enzima de restrição HindIII para kapa-caseína: (ANGIOLILLO et. al., 2002) foi realizada com um volume final de 15µl. Para cada reação foi preparada uma mistura contendo 8,5µl de água ultra pura, 1,0µl de tampão da enzima, 0,5µl (3 unidades) das enzimas de restrição, que foram homogeneizados através de vórtex por 1 mim. Adiciona-se 10µl da mistura em um tubo para PCR contendo 5µl do DNA amplificado (produto de PCR) por 4 horas, a 37°C, em condições de tamponamento; em seguida à digestão, foi realizada a inativação da enzima, conforme recomendação do fabricante, sendo a HindIII a 80 °C por 20min.. Após a digestão enzimática, o DNA digerido foi analisado em gel de agarose a 2%, com marcador de peso molecular DNA-Ladder 50bp, corado com brometo de etídeo, visualizado em luz ultravioleta e fotografado para verificação dos alelos.

A enzima utilizada, segundo New England Biolabs, possui o seguinte ponto de corte:



Análises estatísticas

Para os resultados de polimorfismo foram utilizadas análises descritivas e de dispersão de frequências. As amostras foram agrupadas pelo grau de sangue. As frequências dos alelos dos genes em estudo foram calculadas por meio de contagem direta.

Foram estudadas as frequências perante o teorema do equilíbrio de Castle Hardy-Weinberg, tanto para cada grupo genético quanto para o conjunto de todos os animais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amplificações dos alelos CSN3 da kapa-caseína com os primers específicos *forward*: 5' GTGCTGAG(T/C)AGGTATCCTAG 3' e *revers* : 5' GTAGAGTGCAACAACACTGG 3', apresentaram o mesmo padrão de amplificação com 1000 pb (Figura 1).

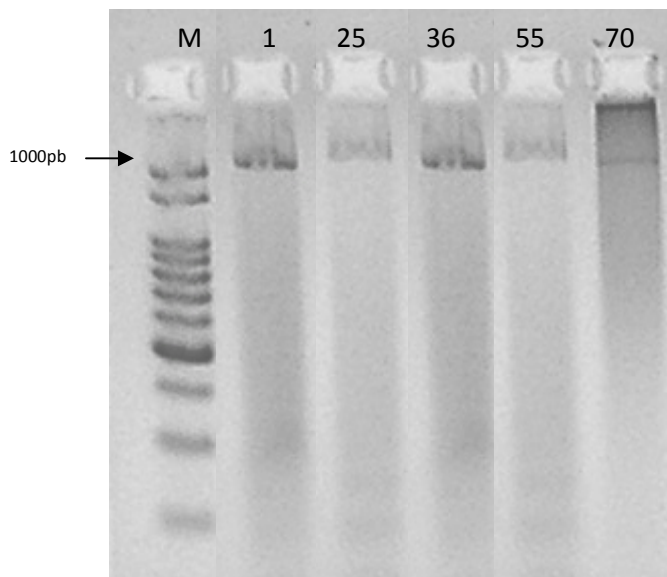


Figura 1. Fragmento de DNA amplificado (1000pb), contendo a região do gene *kappa-casein* exons 3-5 da k-caseína bovina, M: Marcador DNA-Ladder 50bp, 1 e 55 animais $\frac{1}{2}H$, 25 e 70 animais $\frac{5}{8}H$ e 36 animal $\frac{3}{4}H$.

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

Quando os fragmentos amplificados dos DNAs foram digeridos com a enzima de restrição Hind III, a uma temperatura de 37°C durante 4 horas, apresentaram polimorfismo característico de cada raça.

Os resultados dos cortes da ação enzimática, para os três cruzamentos estudados, apresentaram maior frequência dos alelos A e B, como já constatado em outros trabalhos (PINDER et al.,1991, TSIARAS et al., 2005, UFFO et al., 2006, COMIN et al., 2008 e OTAVIANO, 2006) porém, também foi observado o alelo C, como mostra a Figura 2.

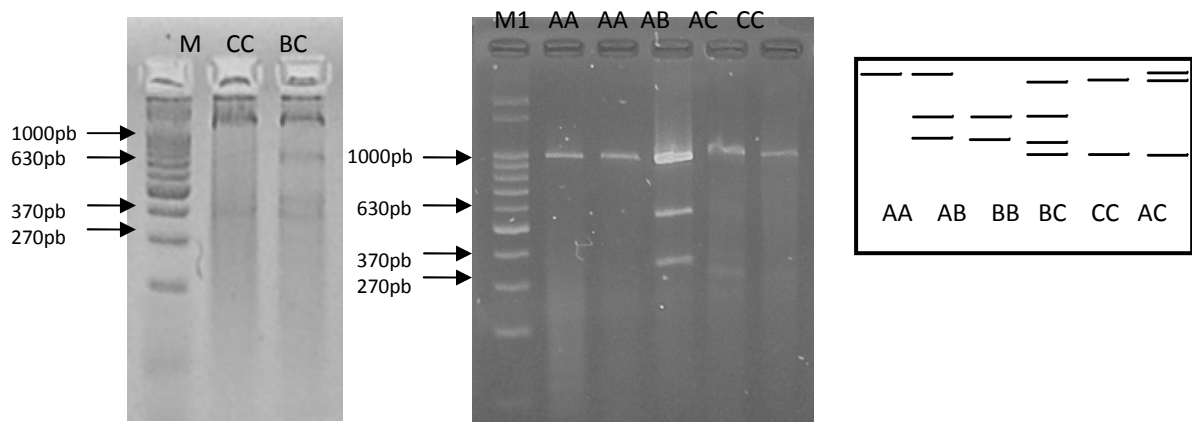


Figura 2. Genotipagem em bovinos da kapa-caseína, usando a reação em cadeia de polimerase (PCR) seguido pela ação da enzima de digestão Hind III.

M: Marcador de 50pb

M1: Marcador de 100pb

Frequência genotípica e alélica.

As frequências genotípicas e alélicas foram estimadas por contagem simples dos genótipos visualizados na eletroforese, obtida com o uso da técnica de PCR-RFLP (Figura 1), e os padrões de migração se repetiram, evidenciando a detecção do

polimorfismo. As frequências obtidas para esta região do gene da kapa-caseína nos animais avaliados nesse estudo estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos animais Holando-Gir (½, ⅝ e ¾) e de Qui-quadrado (0,05) para as frequências genotípicas.

Frequências	Alélicas			Genotípicas						χ^2
	A	B	C	AA	AB	BB	BC	CC	AC	
1/2	0,73	0,20	0,07	0,53	0,33	0,03	0,00	0,03	0,07	6,93
5/8	0,74	0,22	0,04	0,66	0,14	0,13	0,04	0,01	0,01	31,09*
3/4	0,75	0,17	0,08	0,58	0,26	0,03	0,03	0,03	0,08	2,99
Geral	0,74	0,20	0,06	0,59	0,25	0,06	0,02	0,02	0,05	26,08*

As frequências genotípicas esperadas de acordo com o teorema de Castle-Hardy-Weinberg foram 0,55 para o genótipo AA, 0,29 para o genótipo AB e 0,04 para o genótipo BB, 0,02 para o genótipo CC, 0,007 para o genótipo BC, 0,09 para o genótipo AC.

Quando comparamos as frequências observadas com as esperadas pelo teste Qui-quadrado, ao nível de significância de 0,05 podemos afirmar que a população geral encontra-se em desequilíbrio, assim como os animais 5/8. Já os grupos genéticos ½ e ¾ estão em equilíbrio.

A frequência obtida nesse experimento de 0,74 para o alelo A e 0,20 para o alelo B estão próximos do encontrado por Pinder et al. (1991), quando estudavam animais Holandeses. O mesmo foi verificado por Uffo et al. (2006) em animais Criolos de Cuba, que também demonstraram que em animais Siboney de Cuba, as frequências variaram

de 0,7 a 0,8 para o alelo A e 0,2 a 0,3 para o alelo B. No entanto, em nenhum desses trabalhos foi identificado o alelo C. Além disso, em trabalho realizado com vacas Holandesas de linhagem Italiana (COMIN et al. 2008), os alelos A e B também foram os mais observados, porém, nesse mesmo estudo o autor observou também o alelo E mesmo que com uma baixa frequência (0,06).

Por outro lado, os dados encontrados nesse estudo discordam dos encontrados por Tsiaras et al. (2005), que identificaram em vacas holandesas a frequência de 88,5 para o genótipo AA e 11,5 para o AB, não encontrando o genótipo BB. Segundo Sulimova et al. (2007b), o genótipo BB é o mais importante para a fabricação de queijos devido às propriedades do coalho desse tipo específico de leite. Já Postiglioni et al. (2002) encontraram frequências genótípicas também diferentes, porém, em seu estudo foi relatado uma maior frequência para o genótipo AB de 0,5, já para o genótipo AA, foi encontrado 0,25 e para o genótipo BB 0,24, o que nesse caso se apresenta como uma melhor ocorrência de leite para a fabricação de queijo.

Otaviano (2006) realizou um experimento com diferentes raças de bovinos e os valores encontrados para o gado holandês foram o que mais se aproximaram com o observado no presente estudo, encontrando 0,62 para o genótipo AA, 0,26 para AB e 0,12 para BB, também não encontrando o alelo C.

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

Outra característica que é possível de relacionar com os alelos A e B da k-Cn é a produção de leite. Lin et al (1989), verificaram que vacas com genótipo BB produzem

mais do que as de genótipo AA e AB, em animais das raças Holandesa, Ayrshire e seu cruzamento. Em contraste, Gonyon et al (1987) observaram efeito significativo oposto: vacas Holandesas AA apresentaram, em média, 180Kg a mais de leite do que vacas BB. Bovenhuis et al (1992) demonstraram que vacas com genótipo BB produzem 173Kg menos de leite do que vacas com genótipo AA. Ainda, outros pesquisadores, como Aleandri *et al* (1990); McLean *et al* (1987) e McLean *et al* (1984) relataram que não há efeito de cada alelo na produção de leite.

CONCLUSÃO

O presente estudo teve sucesso em caracterizar o genótipo da kapa-caseína nos animais holando-gir estudados. Os resultados possibilitaram identificar um polimorfismo pouco encontrado na literatura, a forma CC, AC e BC do gene da Kapa-caseína.

Outro ponto importante deste estudo foi quantificar a frequência que o genótipo BB aparece na população de vacas holando-gir em regiões de Pernambuco e a frequência do alelo B, uma vez que esse genótipo interfere positivamente no processamento do leite. Esse resultado sugere que seja implantado em rebanhos específicos programa de seleção genética que vise aumentar a frequência do genótipo em questão no rebanho, o que proporcionará ganhos para a indústria no processamento do leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALEXANDER L.J., STEWART A.F., MACKINLAY A.G., KAPELINSKAYA T.V., TKACH T.M. & GORODETSKY S.L. Isolation and characterization of the bovine K-casein gene. **European Journal of Biochemistry** 178, 395-401, 1988.

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

BERGER, S. L., KIMMEL, A. R. **Methods in Enzymology, Volume 152: Guide to Molecular Cloning Techniques.** Academic Press New York. 812p, 1987.

BONIFÁCIO, C.; SANTOS, I. C.; BELO, C.; CRAVADOR, A. single-strand conformation polymorphism (sscp) analysis of α s1-casein genes in charnequeira portuguese indigenous goat bred. **Arquivo Zootecnia**, v. 50, p-105-111, 2001

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

COMIN, A., CASSANDRO, M., CHESSA, S., OJALA, M., DAL ZOTTO, R., DE MARCHI, M., CARNIER, P., GALLO, L., PAGNACCO, G., BITTANTE, G. Effects of Composite β - and κ -Casein Genotypes on Milk Coagulation, Quality, and Yield Traits in Italian Holstein Cows. **Jornal of Dairy Science.** v. 91, p. 4022–4027, 2008.

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

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

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

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

LIEN S., KAMINSKI S., ALESTRON P., ROGNE S. A simple and powerful method for linkage analysis by amplification of DNA from single sperm cell. **Genomics**, v. 16(1), p. 41-44, 1993.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F; SAMBROOK, J. **Molecular cloning a laboratory manual**. v. 1-3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,. 3 v., 1989.

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

_____. Effects of milk protein genetic variants and composition on heat stability of milk. **J. Dairy Res.** v.54, p. 219-235, 1987.

MEDRANO, J. F., AGUILAR-CÓRDOVA E. (1990). Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. **Anim. Biotechnol.**, v. 1(1), p. 73-77, 1990.

MITRA, A., SCHLEE, P., BALAKRISHNAN, C. R. Polymorphisms at growth hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. **J. Anim. Breeding and Genet.**, v. 112, p. 71-74, 1995.

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

OSTA, R., GARCÍA-MURO, E., ZARAZAGA, I. A MspI polymorphism at the bovine alpha-lactalbumin gene. **Anim. Genet.**, v. 26(3), p.204-205, 1995.

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

POSTIGLIONO, A., RINCON, G., KELLY, L., LLAMBI, G., FERNANDEZ, G., D'ANGELO, M., GAGLIARDI, G., TRUJILLO, J., BETHENCOURT, M., GUEVARA, K., CASTELLANO, A., ARRUGA, M. V. Biodiversidad genética en bovinos criolos del Uruguay, análisis con marcadores molecular. **Archivos de zootecnia.**, v51, p. 195-202, 2002.

RACHAGANI S., GUPTA I.D., GUPTA, N., et al. Genotyping of β -lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. **BMC Genetic**, v. 7, p.31-34, 2006.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1,2,3, 1989.

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

_____. K-casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. **Russian J. Genet.**, v. 43, (1), p. 73-79, 2007b.

TSIARAS A. M., BARGOULI G. G., BANOS G. et al. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. **J. Dairy Sci.**, v. 88(1), p. 327-334, 2005.

UDINA, I. G., TURKOVA, S. O., KOSTYUCHENKO, M. V. et al. Polymorphism of bovine prolactin gene: Microsatellites, PCR-RFLP. **Russian J. Genet.**, v. 37(4), p. 407-411, 2001.

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