



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO
ANIMAL**

**POLIMORFISMO NO GENE DA BETA-CASEÍNA EM
REBANHOS ZEBUÍNOS LEITEIROS NO ESTADO DO
RIO GRANDE DO NORTE**

TÁBATA CRISTINE CHAVES DE LIMA

**MACAÍBA/RN – BRASIL
Junho/2014**

TÁBATTA CRISTINE CHAVES DE LIMA

**POLIMORFISMO NO GENE DA BETA-CASEÍNA EM
REBANHOS ZEBUÍNOS LEITEIROS NO ESTADO DO
RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Rio Grande do Norte – UFRN,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel

MACAÍBA/RN – BRASIL
Junho/2014

**POLIMORFISMO NO GENE DA BETA-CASEÍNA EM
REBANHOS ZEBUÍNOS LEITEIROS NO ESTADO DO RIO
GRANDE DO NORTE**

por

TÁBATA CRISTINE CHAVES DE LIMA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL (PPGPA) UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA A OBTENÇÃO DO GRANDE DE

MESTRE

JUNHO, 2014

© TÁBATA CRISTINE CHAVES DE LIMA
TODOS OS DIREITOS RESERVADOS

O autor aqui designado concede ao curso de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte permissão para reproduzir, distribuir, comunicar ao público, em papel ou meio eletrônico, esta obra, no todo ou em parte, nos termos da Lei.

Assinatura do Autor: _____

APROVADA POR: _____

Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel

Prof. Dr.^a Lilian Giotto Zaros de Medeiros

Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho

Prof.^a Dr.^a Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto

TÁBATA CRISTINE CHAVES DE LIMA

**POLIMORFISMO NO GENE DA BETA-CASEÍNA EM
REBANHOS ZEBUÍNOS LEITEIROS NO ESTADO DO
RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Rio Grande do Norte – UFRN,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Produção Animal.

APROVADA EM ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel - UFRN
Orientador

Prof.^a Dr.^a Lilian Giotto Zaros de Medeiros - UFRN
Membro interno

Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho - ESALQ/USP
Membro externo

Prof.^a Dr.^a Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto - EMBRAPA
Membro externo

Aos meus pais, Carlos e Efrilda, por todo amor, carinho, incentivo e apoio em minhas escolhas.

Dedico.

“Tudo é possível àquele que crê.”

Jesus Cristo

AGRADECIMENTOS

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me fortalecer interiormente para superar as dificuldades e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e acreditaram na minha capacidade. Por tanto amor e dedicação, sempre preocupados em dar o melhor de si para mim. Obrigado por me apoiarem em todos os momentos e em todas as decisões.

Ao meu irmão, por todo seu companheirismo e apoio durante todos esses anos. E por sempre comemorar todas as minhas conquistas.

Ao meu namorado Ezio, por todo carinho e compreensão, sempre dando força e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas da pós, pelos vários momentos compartilhados durante esse tempo, pelas alegrias e tristezas, altos e baixos. Cada um de vocês tem um espaço em meu coração, são muito importantes para mim.

Ao meu orientador Dr. Adriano Rangel e a minha co-orientadora Dr^a. Lillian Zaros, pela paciência, orientação, amizade e profissionalismo.

Ao professor Dr. Luis Henrique Fernandes Borba por todos os ensinamentos e auxílio na análise estatística deste trabalho.

A todo corpo docente do PPGPA, que foram essenciais para minha formação.

A toda equipe do LABOLEITE, pela amizade e ajuda na elaboração deste trabalho.

À equipe do laboratório de Biotecnologia do departamento de Zootecnia da Universidade de São Paulo – ESALQ, em especial ao professor Dr. Luiz Lehmann Coutinho e aos técnicos Nirlei e Jorge por me receberem tão bem, ajudarem e participarem deste trabalho.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte, pela disponibilidade e apoio para realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pela concessão da bolsa de estudos, e ao Conselho Nacional de Pesquisa

(CNPq) através da casadinha com o Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (Procad) pelo apoio no financiamento da pesquisa e intercâmbio na ESALQ/USP.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para concretização deste trabalho, a minha sincera gratidão. Pessoas que permitiram iniciar, continuar e finalmente, terminar um trabalho que considero uma vitória.

POLIMORFISMO NO GENE DA BETA-CASEÍNA EM REBANHOS ZEBUÍNOS LEITEIROS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE

Lima, Tábatta Cristine Chaves. POLIMORFISMO NO GENE DA BETA-CASEÍNA EM REBANHOS ZEBUÍNOS LEITEIROS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE. 2014. 43f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal: Sistema de Produção no Semiárido) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Macaíba, 2014.

RESUMO

Diversos problemas de saúde humana vêm sendo relacionados ao consumo de leite bovino, destacando-se entre eles aqueles relacionados a constituintes alergênicos, ocasionados pela reação imunológica do corpo às proteínas lácteas. Sabendo-se disto e da importância do leite como fonte de proteína de origem animal, encontrar soluções para minimizar a ocorrência de tais reações é extremamente necessário. Estudos apontam que as raças zebuínas apresentam alta frequência do alelo A2 da β -caseína. Este alelo, em homozigose, propicia um leite menos nocivo à saúde humana, mostrando a importância fisiológica de sua detecção. Neste contexto, este estudo teve como objetivo identificar a presença das variantes alélicas A1 e A2 do gene da β -caseína, bem como avaliar as características produtivas em rebanhos zebuínos leiteiros. Foram utilizados 156 animais zebuínos leiteiros (68 da raça Gir e 88 da raça Guzerá) provenientes do rebanho da Estação Experimental Felipe Camarão - EMPARN. As extrações de DNA foram feitas a partir do folículo piloso dos animais. O gene foi amplificado e sequenciado em sequenciador automático ABI 3100. As sequências obtidas foram submetidas à análise no programa Geneious 5.6.5[®]. Para análise estatística utilizou-se o programa Statistical Analysis System (SAS, 2002). O procedimento ANOVA foi utilizado para análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey no nível de 5% de significância. As frequências alélicas e genotípicas dos animais Gir e Guzerá foram, respectivamente, 98% e 97% para o alelo A2; e 0,96 e 0,93 para o genótipo A2A2. As médias das características produtivas do Gir e Guzerá se encontram dentro dos valores observados para as raças, porém diferiram-se entre elas significativamente nos teores de proteína, lactose e extrato seco desengordurado. Para os animais da raça Gir, obteve-se correlação positiva com o teor de gordura e sólidos totais, enquanto que para a raça Guzerá verificaram-se as correlações entre as seguintes variáveis: gordura e sólidos totais, proteína e sólidos totais, e lactose e extrato seco desengordurado. Os resultados mostram a alta frequência do alelo A2 nas raças Gir e Guzerá, portanto, pode-se afirmar que para esta proteína o leite das raças zebuínas Gir e Guzerá na população estudada e constitui indicativo de que o leite destas raças possa ser mais saudável. Este trabalho é de grande importância para a produção leiteira, pois são raras as pesquisas no país desenvolvidas sobre o tema, principalmente com as raças zebuínas, e sinaliza para a perspectiva de seleção destas raças visando ao aumento da frequência do alelo desejável, despontando como uma alternativa viável para a produção de um leite não alergênico.

Palavras-chave: alergia, CSN2, leite A2, Gir, Guzerá, produção de leite

POLYMORPHISM OF THE BETA-CASEIN GENE IN THE ZEBU DAIRY CATTLE OF RIO GRANDE DO NORTE STATE

Lima, Tábatta Cristine Chaves. POLYMORPHISM IN BETA-CASEIN GENE IN ZEBU DAIRY CATTLE IN RIO GRANDE DO NORTE STATE.2014. 49p. Dissertation (Master Science Degree in Animal Science: Production System in the Semiarid) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Macaíba-RN, 2014.

ABSTRACT

Various human health problems have been related to the consumption of bovine milk, foremost among them those related to allergenic constituents, caused by the body's immune response to milk proteins. Knowing this and the importance of milk as a source of animal protein, find solutions to minimize the occurrence of such reactions is extremely necessary. Studies indicate that Zebu breeds have a high frequency of A2 allele of β -casein. This allele, homozygous, provides a less harmful to human health milk, showing the physiological importance of their detection. In this context, this study aimed to identify the presence of allelic variants A1 and A2 of the β -casein gene, as well as evaluate the production characteristics in dairy zebu cattle. EMPARN - 156 Zebu dairy animals (68 Gir and 88 Guzera) from the herd of the Experimental Station Felipe Shrimp were used. DNA extractions were made from animal hair follicle. The gene was amplified and sequenced in ABI 3100 automated sequencer, the sequences obtained were subjected to analysis in Geneious 5.6.5® program. Statistical analysis was performed using the Statistical Analysis System (SAS, 2002) program. The ANOVA procedure was used for analysis of variance and comparison of means by Tukey test at 5% significance. The allelic and genotypic frequencies of Gir and Guzera were, respectively, 98% and 97% for the A2 allele; and 0.96 and 0.93 for genotype A2A2. The means of production characteristics of Gir and Guzera are within the values observed for the races, but it differed significantly between them in the protein, lactose, and solids nonfat. For animals Gir, obtained positive correlation with fat and total solids, while for Guzera there were correlations between the following variables: fat and total solids, protein and total solids, and lactose and total solids. The results show the high frequency of the A2 allele in Gir and Guzera, therefore, can be said that for this protein milk from zebu breeds Gir and Guzera in the population studied and is indicative of the milk of these breeds can be more healthy. This work is of great importance for dairy production because very little research carried out in the country on the topic, especially with the zebu breeds, and signals the prospect of selecting these races in order to increase the frequency of desirable allele, emerging as one viable alternative for the production of a non-allergenic milk.

Key words: allergy, CSN2, milk A2, Gir, Guzera, milk production

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. IMPORTÂNCIA DA BOVINOCULTURA LEITEIRA	17
2.2. ALERGIA À PROTEÍNA DO LEITE DE VACA (APLV)	20
2.3. PROTEÍNAS DO LEITE	21
2.4. BETA-CASEÍNA (CSN2)	24
2.5. MARCADORES GENÉTICOS	26
2.6. POLIMORFISMOS NO GENE DA β -CASEÍNA.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. LOCAL E REBANHO DO ESTUDO	30
3.2. COLETA DE AMOSTRAS	30
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA	31
3.4. <i>PRIMERS</i> CSN2.....	31
3.5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO	32
3.6. SEQUENCIAMENTO DO PRODUTO AMPLIFICADO	33
3.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS DO POLIMORFISMO.....	34
3.8. DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DAS RAÇAS.....	34
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. EXTRAÇÃO DE DNA	36

4.2. AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS PARA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	36
4.3. SEQUENCIAMENTO	37
4.4. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS	39
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA.....	40
5. CONCLUSÃO	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção de leite no mundo desde 2008 – em milhões de litros	18
Figura 2 – Produção brasileira de leite desde 2008 – bilhões de litros	18
Figura 3 – Clivagem da β -caseína 1 e formação da BCM-7	25
Figura 4 – Localização do SNP (A/C) na sequência consenso do gene CSN2 de bovinos	25
Figura 5 – Coleta, acondicionamento e identificação de amostras de pêlos da vassoura da cauda de bovinos	31
Figura 6 – Gradiente de temperatura (1: 61,0 °C; 2: 60,5 °C; 3: 59,6 °C; 4: 58,3 °C; 5: 56,7 °C; 6: 54,0 °C), marcador molecular (M), animal A (A), animal B (B), controles negativos (CN) e controle positivo (CP) para amplificação dos fragmentos do gene CSN2	37
Figura 7 – Purificação pelo kit AGENCOUT [®] AMPURE [®] (PCR purification) a partir da amplificação de 10 amostras para o gene da CSN2 (M: marcador molecular; 2-12: animais)	37
Figura 8 - Imagem do SNP CSN2, obtidas do software Geneious [®]	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ranking dos maiores produtores de leite em 2011	17
Tabela 2 – Comparativo entre as principais proteínas do leite humano e do leite de vaca	21
Tabela 3 – Porcentagem de sensibilização às frações protéicas	22
Tabela 4 – Sequência dos <i>primers</i> e tamanho do produto amplificado	31
Tabela 5 – Frequências alélicas e genótípicas para os alelos A1 e A2 nas raças Gir e Guzerá	39
Tabela 6 - Estatística descritiva para as características gordura (GORD), proteína (PROT), lactose (LACT), sólidos totais (ST), extrato seco desengordurado (ESD) em porcentagens (%) e produção de leite (PROD) em litros para a raça Guzerá	40
Tabela 7 - Estatística descritiva para as características gordura (GORD), proteína (PROT), lactose (LACT), sólidos totais (ST), extrato seco desengordurado (ESD) em porcentagens (%) e produção de leite (PROD) em litros para a raça Gir	40
Tabela 8 - Médias obtidas para gordura (GORD), proteína (PROT), lactose (LACT), sólidos totais (ST), extrato seco desengordurado (ESD) e produção de leite (PROD) das raças Gir e Guzerá	41

LISTA DE ABREVIATURAS

APLV – Alergia à Proteína do Leite de Vaca

ASBIA – Associação Brasileira de Inseminação Artificial

BCM – Betacasomorfina

CNS2 – Beta-caseína

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo Trifosfato

LM – Leite Materno

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RIISPOA – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

SNP – Polimorfismo de um Único Nucleotídeo

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, e higiênica, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002).

O leite bovino é um alimento de grande importância na alimentação humana, devido ao seu elevado valor nutritivo. É um alimento rico em proteínas, gorduras, carboidratos, minerais e vitaminas. A sua composição pode variar de acordo com os seguintes fatores: raça, fatores climáticos, estágio de lactação, idade do animal, alimentação, e do genótipo do animal (OTAVIANO, 2006).

Atualmente, Estados Unidos, Índia, China e Brasil se enquadram, nessa ordem, nas primeiras colocações do ranking mundial de produção de leite (SIQUEIRA et al., 2012). No Brasil, cerca de 80% do leite é produzido por animais mestiços oriundos de acasalamento de uma raça taurina (predominantemente Holandês) com uma zebuína (predominantemente o Gir Leiteiro). Do total de sêmen produzido e comercializado no Brasil para a produção de leite, a raça Gir Leiteiro é responsável por cerca de 48% (ASBIA, 2011).

Conforme projeção do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de leite no Brasil deve aumentar 5% em 2014. Se confirmado o aumento, a produção deve chegar a 36,75 bilhões de litros em um ano. Em 2013, a produção leiteira foi de 35 bilhões de litros, sendo 35% a mais que os 26 bilhões contabilizados em 2007 (IBGE, 2013). Com o aumento da produção e do consumo, surge também a preocupação com a qualidade do produto que chega aos consumidores, principalmente quando o produto é relacionado a vários problemas de saúde humana, como a alergia a proteína do leite de vaca.

Uma das principais proteínas do leite é a caseína, ela se apresenta como a segunda maior fração protéica do leite e a que ocasiona maior sensibilidade nos indivíduos. É um grupo de proteínas que compõem cerca de 80% de todas as proteínas do leite, sendo divididas em quatro grupos: alfa s1, alfa s2, beta e kappa. A caseína contém proteínas que ao serem digeridas transformam-se em compostos opiáceos denominados de β -casomorfina (BCM). A BCM liga-se ao alelo A1 da β -caseína e acredita-se que a ingestão de leite contendo a presença desse alelo

ocasiona alergia e outras doenças no corpo humano. Em contrapartida, o alelo A2 da β -caseína não tem ligação alguma com tais problemas de saúde (WOODFORD, 2008).

A APLV é o tipo mais comum de alergia alimentar, acometendo normalmente crianças, principalmente as recém-nascidas. O uso abusivo do leite de vaca como substituto do leite humano levou ao aumento da incidência dessa doença (CARVALHO JR., 2001). Na APLV, o organismo da criança não reconhece uma ou mais proteínas do leite de vaca (caseína, alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina) e reage imunologicamente a elas. Por isso, nos últimos anos várias empresas vêm investindo na busca de marcadores moleculares, ou genéticos, para auxílio ao agronegócio do leite bovino, já que o conhecimento do papel dos genes é importante para o desempenho em características bioeconômicas no sistema de produção relacionadas à qualidade do leite.

Tal fato, fez com que as pesquisas na área da genética molecular com as raças bovinas zebuínas evidenciassem aquelas que apresentavam maior frequência alélica e genotípica do alelo A1 e A2. Desde então, as raças que apresentavam uma alta frequência do alelo A1, passaram a produzir o leite A1, um leite alergênico e que propicia algumas doenças a pessoas com predisposição. E as raças com alta frequência do alelo A2, passaram a produzir o leite A2, um leite que não ocasiona doenças e que pode ser ingerido por pessoas que apresentam a APLV (GARCIA, 2009).

Assim, este estudo teve como objetivo identificar a presença e frequência das variantes alélicas A1 e A2 do gene da β -caseína em rebanhos zebuínos leiteiros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A BOVINOCULTURA LEITEIRA

A bovinocultura leiteira exerce um significativo papel na economia de países em desenvolvimento, principalmente nas regiões onde o setor agropecuário predomina (VIANA & FERRAS, 2007). Em 2010, o valor bruto da produção agropecuária foi de 257,6 bilhões de reais. Deste total, aproximadamente 98 bilhões de reais são provenientes de produtos pecuários, tendo o leite posição de destaque, que contribui com o valor de 22 bilhões de reais, ou 22,4% do valor bruto da produção pecuária, superado apenas pelo valor da produção da carne bovina (PEDROSO et al., 2011).

Em 2011, os países que tiveram os maiores aumentos na produção de leite de vaca, em termos absolutos, foram: Índia, Estados Unidos, Turquia e Brasil com 2,54; 1,54; 1,38 e 1,37 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2013). Com isso, o *ranking* dos maiores produtores de leite neste ano foi: EUA, Índia, China, Brasil e Rússia, os quais são evidenciados na Tabela 1.

Tabela 1 - Ranking dos maiores produtores de leite em 2011.

País	Produção (Mil toneladas)
Estados Unidos	89.015.200
Índia	52.500.000
China	36.928.901
Brasil	32.091.000
Rússia	31.385.700
Alemanha	30.301.400
França	24.426.500
Nova Zelândia	17.893.800
Reino Unido	14.246.000
Turquia	13.802.400

Fonte: adaptado de FAO (2013).

Segundo Pila (2013), a produção mundial de leite está crescendo desde 2010. Em 2009, após a crise mundial, o mercado nacional e internacional, sentiu os

reflexos da menor demanda e queda de preços, como consequência os investimentos na atividade (benfeitorias, qualidade do rebanho, alimentação, etc.) diminuíram, e a produção não foi alavancada naquele ano. Considerando a produção desde 2008, o maior incremento ocorreu em 2011, quando o volume produzido aumentou 2,7% em relação ao ano anterior. Para 2013, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) estimou um aumento de 1,5% na produção mundial em comparação com 2012 (Figura 1).

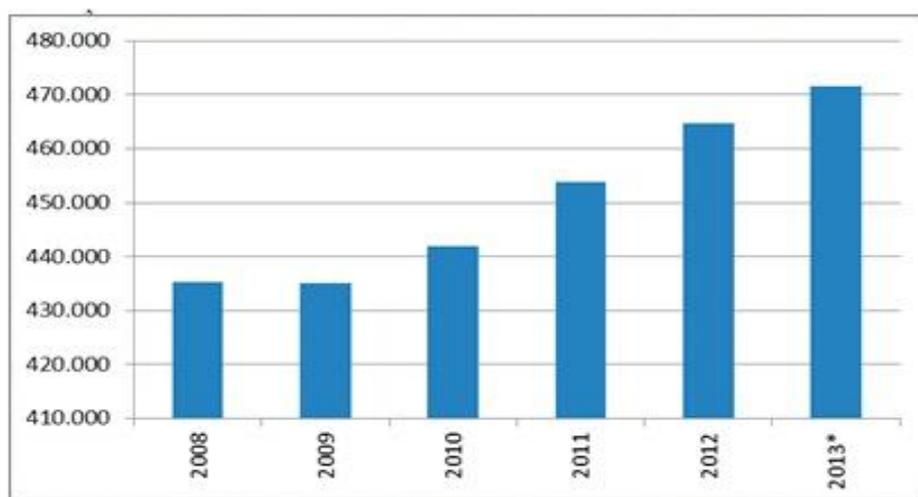


Figura 1 - Produção de leite no mundo desde 2008 – em milhões de litros.

Fonte: USDA / Elaboração Scot Consultoria – www.scotconsultoria.com.br, 2013
*estimativa

A produção de leite brasileira vem acompanhando o crescimento da produção mundial (Figura 2).

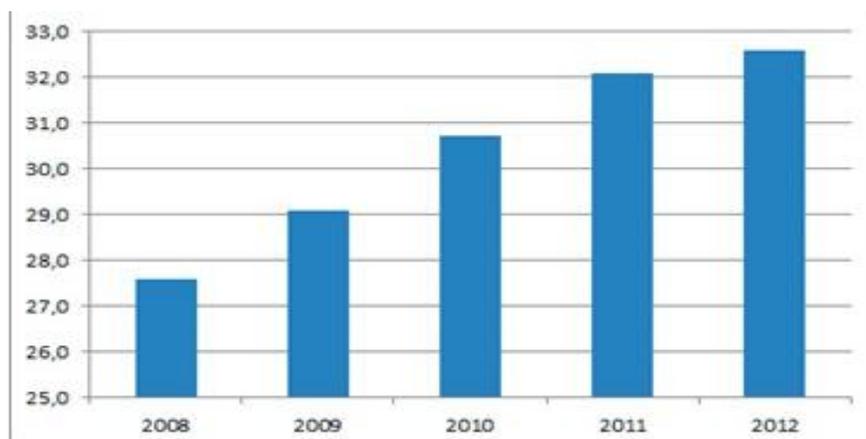


Figura 2 - Produção brasileira de leite desde 2008 – bilhões de litros.

Fonte: IBGE / Elaboração Scot Consultoria – www.scotconsultoria.com.br, 2013

Nos últimos cinco anos, a produção nacional cresceu, em média, 4,3% ao ano (PILA, 2013). Entre os maiores produtores mundiais, o Brasil é o primeiro em crescimento no efetivo de vacas por fazenda, com 5,3% por ano e o primeiro em crescimento relativo da produção por estabelecimento, sendo apontado como um país promissor no crescimento em tecnologia e produção de leite (VILELA, 2011).

O leite está entre os seis primeiros produtos mais importantes da agropecuária brasileira, superando produtos tradicionais como café beneficiado e arroz (COSTA et al., 2009). Os avanços nas técnicas relacionadas às etapas de produção, processamento e distribuição de leite têm favorecido ainda mais o seu consumo, particularmente no que se refere ao leite bovino. Segundo Pereira (2001), há cada vez mais interesse do consumidor por alimentos de qualidade e isto reflete na comercialização dos produtos de origem animal, aumentando a procura de produtos diferenciados, tais como leites processados com componentes específicos e que satisfaçam necessidades fisiológicas e sociais. Com a evolução constante da tecnologia de alimentos, que tem adaptado o leite às necessidades do consumidor, vêm-se criando produtos para as necessidades em cada fase da vida (CTENA & PIROLI, 1999).

De acordo com Pedroso et al. (2011), a indústria de laticínios tem potencializado o valor nutritivo do produto, disponibilizando no mercado uma série de bebidas lácteas enriquecidas com vitaminas, minerais e ômega, assim como leites especiais para as pessoas que não conseguem digerir a lactose. A indústria de leite, além de satisfazer os anseios do mercado consumidor, está também interessada em mudanças na composição do leite que possam alterar o seu valor como matéria-prima para elaboração de derivados (SANTOS & FONSECA, 2004).

É correto afirmar que os ganhos de produtividade advêm, basicamente, da adoção de tecnologias que melhoram a eficiência do uso dos fatores de produção. Os avanços no melhoramento genético de nossos rebanhos leiteiros, na alimentação e na saúde animal, tiveram importantes participações nesta evolução. No melhoramento genético, houve nos últimos anos, aumento da participação das raças mestiças oriundas do cruzamento, hoje predominantemente mestiço Holandês x Zebu, assim como uma extraordinária evolução no melhoramento do Zebu para leite, particularmente das vacas Gir e o Guzerá (PEDROSO et al., 2011).

As transformações socioeconômicas verificadas nos cenários nacionais e internacionais levaram o setor agroindustrial brasileiro e, em particular, a cadeia produtiva do leite, a buscar uma reestruturação que permita alcançar níveis de eficiência que garantam a sua competitividade e sustentabilidade, principalmente porque o produto (leite) está relacionado à saúde humana (VILELA, 2011).

Por mais que o leite bovino atenda às necessidades alimentares, quando se fala em nutrientes, existem algumas pessoas que são impossibilitadas de tê-lo como fonte de alimentos, pois apresentam-se intolerantes a lactose ou por serem alérgicas à proteína do leite (GASPARIN et al., 2010).

2.2. ALERGIA À PROTEÍNA DO LEITE DE VACA (APLV)

A APLV é provocada pelas proteínas presentes no leite, que são identificadas pelo sistema imunológico como um agressor, um agente estranho, que precisa ser combatido. A partir da ingestão destas proteínas, o sistema imunológico desencadeia um mecanismo de reação, que é responsável pelos seguintes sintomas – diarreia, distensão abdominal, flatulência e ainda, lesões na pele, como urticária e coceira, sintomas respiratórios, inflamação da mucosa intestinal e até pequenos sangramentos intestinais (CRUCINSKY, 2008).

Essa alergia tem sido reconhecida como a alergia alimentar mais frequente na primeira infância, afetando cerca de 2 a 5% dos lactentes. Tem uma incidência máxima aos três meses, sendo raro o seu aparecimento após os seis meses de vida. O fato das proteínas do leite de vaca (PLV) constituírem os primeiros antígenos alimentares introduzidos na dieta do lactente pode explicar parcialmente o porquê desta alergia alimentar ser a mais frequente e precoce (BENHAMOU et al., 2009; ORSI et al., 2009; KNEEPKENS & MEIJER, 2009). Em lactentes a apresentação clínica é geralmente ligeira a moderada, o que pode ser atribuído à concentração de PLV no leite materno (LM), que é cerca de 100.000 vezes inferior à concentração existente nas fórmulas para lactentes, principalmente as caseínas (VANDENPLAS et al., 2007) (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparativo entre as principais proteínas do leite humano e do leite de vaca.

Proteína	Humano (mg/mL)	Vaca (mg/mL)
α-lactoalbumina	2,2	1,2
Caseína-α-s1	0	11,6
Caseína-α-s2	0	3,0
β-caseína	2,2	9,6
κ-caseína	0,4	3,6
γ-caseína	0	1,6
Imunoglobulinas	0,8	0,6
Lactoferrina	1,4	0,3
β-lactoglobulina	0	3,0
Lisozima	0,5	Traços
Albumina sérica	0,4	0,4
Outros	0,8	0,6

Fonte: Adaptado de Crittenden & Bennett, 2005.

Vários fatores predisponentes à APLV têm sido propostos, mas nenhum, até agora, foi confirmado. Parece existir uma predisposição genética, visto que cerca de dois terços das crianças com APLV têm antecedentes familiares, ou seja, relatos de indivíduos propensos em familiares do primeiro grau. Também fatores ambientais, como antecedentes neonatais que alteram a formação da flora intestinal, tais como a prematuridade, a antibioticoterapia nos primeiros meses de vida, ou o contato precoce e esporádico com PLV no útero da mãe, através do LM ou através de fórmula para lactentes administrado ocasionalmente, parecem predispor ao aparecimento de APLV. O aleitamento materno exclusivo durante quatro a seis meses parece ser um fator protetor, tanto desta como de outras alergias alimentares (BENHAMOU et al., 2009; ORSI et al., 2009; DIAS et al., 2009; VANDENPLAS et al., 2007).

2.3. PROTEÍNAS DO LEITE

O leite é uma secreção característica da glândula mamária de todos os mamíferos. Por causa de sua função nutricional para animais muito jovens, o leite é um alimento rico em minerais, vitaminas, gorduras e proteínas, sendo um

indispensável ao seu desenvolvimento. A composição do leite difere entre as espécies na porcentagem de seus constituintes, podendo variar também por fatores climáticos e fisiológicos tais como estágio de lactação, idade do animal e de seu próprio genótipo (OTAVIANO, 2006).

Segundo Gigante & Costa (2008), o leite de vacas sadias contém em média 87,1% de água (85,3-88,7%), 4,0% de gordura (2,5-5,5%), 3,25% de proteína (2,3-4,4%), 4,6% de lactose (3,8-5,35%) e 0,7% de cinzas e vitaminas. Esse produto fornece proteínas de elevada qualidade e em quantidade significativa, de 3 a 3,5g de proteínas por 100g de leite. Depois das proteínas sanguíneas, as proteínas do leite são provavelmente as mais bem caracterizadas do ponto de vista físico-químico e genético. Elas apresentam a vantagem de serem as proteínas de origem animal de custo mais baixo, além de possuírem alto valor biológico. São utilizadas como ingredientes em vários produtos cosméticos e alimentares e, individualmente, podem exibir várias funções benéficas ao organismo, como o aumento da absorção de cálcio e da função imunológica, a diminuição da pressão arterial e do risco de câncer (GALLO, 2011).

As proteínas lácteas dividem-se em várias classes de cadeias polipeptídicas, tendo como principais: a caseína, a beta-lactoglobulina e a alfa-lactoalbumina. Segundo Koda & Barbieri (1984), o leite contém mais de 20 componentes protéicos dotados de diferentes graus de atividade antigênica e vários estudos com indivíduos alérgicos ao leite revelaram que a sensibilidade dos mesmos a cada fração protéica obedece às frequências citadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Porcentagem de sensibilização às frações protéicas.

Fração Protéica	% de indivíduos sensíveis
Beta-lactoglobulina	66-82
Caseína	43-60
Alfa-lactoalbumina	41-53
Globulina sérica bovina	27
Albumina sérica bovina	18

Fonte: Koda & Barbieri (1984).

Koda & Barbieri (1984) apresentam as caseínas como a segunda fração protéica que ocasiona maior sensibilidade nos indivíduos. De acordo com Gasparin

et al. (2010), a alergia ao leite resulta de reações contra o antígeno, que neste caso são as proteínas do leite, mediadas pelo sistema imunológico gerando sinais e sintomas após a ingestão do alimento. De forma diferente à alergia, tem-se a intolerância causada pela lactose, em que o açúcar do leite, na ausência da ação da enzima lactase, não é absorvido, resultando em desconfortáveis reações clínicas.

O grupo das caseínas representa cerca de, 75% a 85% das proteínas lácteas e quase todas se encontram associadas a cálcio e fósforo, em micelas de 20 a 300 µm de diâmetro, que refletem completamente a luz, originando a coloração branca característica do leite. Pelo seu excelente valor nutricional, a caseína é usada por muitos autores como proteína de referência para avaliar a qualidade proteica dos alimentos lácteos. Essas se dividem em quatro grupos: alfa s1 (30-46% das caseínas), alfa s2 (8-11%), beta (25-35%) e kappa (8-15%) e são codificadas por genes presentes no cromossomo 6 bovino (VERCESI FILHO et al., 2012).

Na década de 1970, determinou-se a sequência de aminoácidos das quatro caseínas. Nessa mesma década, descobriram-se as variantes genéticas responsáveis pela síntese de cada umas delas, diferenciando-as em um aminoácido ou um grupo deles. Todas as caseínas contêm quantidade elevada de aminoácidos apolares, o que resultaria em uma reduzida solubilidade em água, mas a relativa abundância de grupos fosfatos, a escassez de enxofre e a presença de um grupo carboidrato as tornam muito polares (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Ordóñez et al. (2005), explica ainda que as caseínas são ricas em prolina. A α -s1 contém 17 resíduos, a α -s2 10, a β 35 e a κ 20. A elevada quantidade de resíduos de prolina faz com que o grau de estruturação dessas proteínas seja menor que o de outras. A menos organizada é a beta-caseína. Cerca de 70% de seus resíduos não formam estrutura secundária. Essa desorganização tem consequências interessantes, como:

- ✓ São mais facilmente proteolisáveis do que as proteínas globulares em estado nativo. Ou seja, as caseínas são digeridas com mais facilidade, fator fundamental para o lactente. Também têm importância tecnológica, especialmente no queijo, já que os fenômenos proteolíticos que ocorrem durante sua maturação serão decisivos nas características sensoriais do produto acabado;

- ✓ A estrutura aberta, junto com a natureza dipolar das caseínas, faz com que tenham boa capacidade emulsificante e espumante;
- ✓ A estrutura aberta faz com que sejam resistentes a diversos agentes desnaturadores, especialmente ao calor. Pode-se assegurar de que o leite se esteriliza sem perder substancialmente seus atributos sensoriais, graças à desorganização inerente às caseínas.

2.4. BETA-CASEÍNA (CSN2)

A beta-caseína é a segunda proteína mais abundante no leite, além de ser crucial para a estrutura micelar da caseína (THREALDGILL & WOMACK, 1990). Apresenta estado polimórfico e constitui-se de 209 aminoácidos, que se dividem em 13 variantes: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G. As variantes A1 e A2 são descritas como sendo as mais comumente encontradas variantes alélicas da beta-caseína em vacas leiteiras (FARRELL et al., 2004; VERCESI FILHO et al., 2012).

As variantes A1 e A2 se diferenciam pela mudança de um nucleotídeo na posição 67 da cadeia (histidina A1 e prolina A2). Estudos indicaram que, inicialmente, toda população bovina continha apenas o alelo A2 e que através de uma mutação surgiu o alelo A1 (VERCESI FILHO et al., 2012). Embora a diferença na estrutura seja sutil, estas variantes de beta-caseína são digeridas de forma diferente. Para beta-caseína A2, a hidrólise enzimática não ocorre ou ocorre em uma taxa muito baixa, gerando o peptídeo beta-casomorfina-9 (BCM-9). Em contraste, a digestão da beta-caseína A1 pode produzir o peptídeo exógeno opióide chamado beta-casomorfina-7 (BCM-7) (ROGINSKY, 2003; KOSTYRA et al., 2004; EFSA, 2009; SODHI et al., 2012).

Acredita-se que a BCM-7 (Figura 3) é um importante causador de problemas relacionados à saúde humana (TROMPETTE et al., 2003), sendo o consumo de leite A1 associado a um grande aumento de doenças, tais como: diabetes mellitus tipo I (ELLIOTT et al., 1999; THORSODOTTIR et al., 2000), doença coronária (McLACHLAN, 2001), arteriosclerose (TAILFORD et al., 2003), síndrome da morte súbita infantil (SUN et al., 2003), esquizofrenia e autismo (WOODFORD, 2008), como também de alergia (GOBETTI et al., 2002). Por outro

lado Kaminski et al. (2007) afirmam que o alelo A2 não tem nenhuma ligação com tais problemas de saúde.

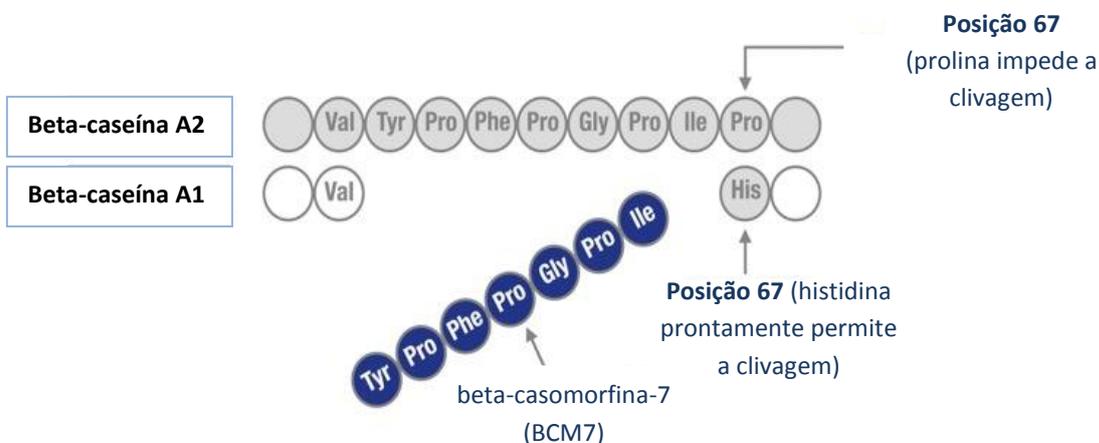


Figura 3 – Clivagem da β -caseína 1 e formação da BCM-7.

Fonte: Adaptado de Woodford, 2008.

De acordo com Vercesi Filho et al. (2012), a CSN2 é codificada por genes presentes no cromossomo 6 bovino. Na figura 4, é apresentada a localização do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP), onde existe uma única substituição de base na sequência (GUIMARÃES & COSTA, 2002). Essa substituição é denominada transversa, pois há uma substituição de uma purina (CSN2-A1) por uma pirimidina (CSN2-A2) ou vice-versa (VIGNAL et al., 2002).

1-60	AACCAAACCAAATGGAAGATTTTCTTTCTCTCTTCTCACTGAATTATGTTTTAAAAAGAG
61-120	GAGGATAATTCATCATGAATAACAATTATAACTGGATTATGGACTCAAAGATTTGTTTTTC
121-180	CTTCTTTCCAGGATGAACTCCAGGATAAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAG
181-240	TCTATCCCTTCCCTGGGCCATCC [A/C] TAACAGCCTCCCACAAAACATCCCTCCTTACTC
241-300	AAACCCCTGTGGTGGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAGTGA
301-360	AGGAGGCTATGGCTCCTAAGCACAAAGAAATGCCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCT
361-362	TT

Figura 4 – Localização do SNP (A/C) na sequência consenso do gene CSN2 de bovinos.

2.5. MARCADORES GENÉTICOS

Segundo Goes et al. (2012), uma das grandes ferramentas relacionadas à biotecnologia, que vem proporcionando uma maior produção com qualidade e menores custos, são os marcadores moleculares. Estas marcas possuem alterações na sequência de nucleotídeos na molécula de DNA denominadas de polimorfismos em regiões codificadoras e não-codificadoras. O genoma é composto por aproximadamente 90% de sequências não-codificadoras, ou seja, que carregam uma sequência de nucleotídeos que não será transcrita em RNA mensageiro, nem traduzida em proteína, sendo a maioria dessas alterações estáveis e não acarretam em mudanças fenotípicas (DIAS-SALMAN et al., 2009).

Ferreira & Grattapaglia (1998) citam que os marcadores moleculares, também denominados de marcadores genéticos, são originados das variações no código do material genético (genoma) dos indivíduos segregando pelas gerações no padrão de herança Mendeliana, relacionadas a características monogênicas ou que apresentam distribuição compatível com as esperadas em características poligênicas. A identificação de variantes de interesse ao melhoramento genético permitiria promover mudanças genéticas em um ritmo cada vez mais acelerado dentro da população (BARENSDE et al., 2001).

O uso de biotecnologias representa uma oportunidade e um desafio, pois há necessidade de produzir animais com maior eficiência e menor custo. Esta técnica se torna amplamente aplicada à produção animal. O uso de marcadores moleculares, principalmente de DNA, permite que o potencial genético de um animal seja determinado com maior precisão, antes mesmo da expressão do seu fenótipo. Mas a capacidade de produção de um animal (fenótipo) é o reflexo da interação de seu material genético (genótipo) com o ambiente. Assim, a identificação dos efeitos de genes sobre os fenótipos será tão mais difícil quanto mais variáveis forem as condições de ambiente e seus efeitos (REGITANO & COUTINHO, 2001).

As principais vantagens no uso de marcadores moleculares estão relacionadas à precocidade de avaliação dos animais para características específicas, uma vez que esta tecnologia emprega amostras de DNA, permitindo análises imediatamente após o nascimento, ou até mesmo durante a fase

embrionária pré-implantação, podendo ser inclusive incorporada a programas de produção *in vitro* transferência de embriões, otimizando os sistemas de seleção genética e produção animal (GARCIA, 2001; GARCIA & PORTO-NETO, 2006).

O simples conhecimento dos genes importantes para as características bioeconômicas no sistema de produção pode oferecer importantes benefícios à agroindústria (KAPPES, 1999). O estudo do polimorfismo no genoma de espécies domésticas, mais especificamente em genes que estão relacionados a processos metabólicos, vem sendo utilizado por pesquisadores para correlacionar diferenças genéticas com características produtivas dos animais (FERRAZ et al., 2006). Os polimorfismos gênicos podem se refletir em alteração da função do gene, contribuindo para variações fenotípicas entre os animais. As alterações em um locus incluem aquelas que mudam a sequência de DNA, mas não mudam a sequência da proteína, aquelas que mudam a sequência da proteína sem mudar a sua função, aquelas que criam proteínas com diferentes atividades e aquelas que criam proteínas mutantes que não são funcionais. Uma população pode ter um polimorfismo extensivo em nível de genótipo. Muitas variantes de sequência diferentes podem existir em um determinado locus; algumas delas são evidentes, porque afetam o fenótipo, mas outras estão ocultas, porque não têm efeito visível (SCAPIN, 2009).

O conhecimento de genes importantes para as características bioeconômicas, no sistema de produção, pode oferecer benefícios à agroindústria (MARANHÃO, 2000; SCAPIN, 2009). Segundo Maranhão (2000), estes estudos têm sido feitos na área de biologia molecular caracterizando marcadores genéticos associados às características produtivas, que podem ser utilizados para identificar raças, linhagens ou até mesmo indivíduos geneticamente superiores, pela análise da sequência do DNA. A existência de genes polimórficos no genoma dos indivíduos é um dos passos utilizados para alcançar este objetivo. A identificação de alelos polimórficos relacionados à produção de leite, teor de gordura no leite e porcentagem de proteína pode levar o produtor a direcionar melhor os acasalamentos em seus rebanhos, para que haja assim, uma frequência maior do polimorfismo desejado para a característica.

O uso de marcadores de DNA pode auxiliar o planejamento de estratégias de cruzamento para raças controladas em programas de melhoramento, auxiliando

na determinação da composição genética dos rebanhos e sua associação às características de interesse. Por isso, a possibilidade de genotipar as proteínas do leite e identificar suas variantes tem permitido a identificação das caseínas bovinas (BURZINSKA & TOPZEWSKI, 1995; OTAVIANO, 2006).

Alexander et al. (1998), enfatiza a importância da identificação de alelos polimórficos relacionados à produção de leite, teores de gordura e proteína, pois este conhecimento pode auxiliar o produtor na seleção de genótipos e direcionar os acasalamentos em seu rebanho para que ocorra um aumento na frequência gênica ou genotípica desejada.

2.6. POLIMORFISMOS NO GENE DA β -CASEÍNA

Em um estudo com a raça Vermelha Norueguesa encontrou-se associação genética favorável do alelo A2 com maior produção de leite e proteína (NILSEN et al., 2009). Resultado semelhante foi obtido por Olenski et al. (2010), que encontraram associação positiva entre o alelo A2 e o valor genético para produção de leite e proteína e negativa entre este gene e o valor genético para percentagem de gordura em touros Holstein na Polônia. Assim sendo, além de um valor agregado para a saúde humana, o alelo A2 da beta-caseína pode estar relacionado com maior produção de leite e proteína em bovinos. Atualmente na Nova Zelândia e no Brasil, há laticínios que comercializam apenas leite com proteína A2 (o chamado leite A2) devido às suposições dessa variante não ser tão nociva à saúde humana como a variante A1 (VERCESI FILHO et al., 2012).

Uma pesquisa desenvolvida na USP de São Carlos com animais da raça Gir demonstrou que esses animais produzem leite A2 (Quadro 1) em sua quase totalidade, sendo a mutação A1 rara na população estudada. Além das características já conhecidas de rusticidade e resistência a parasitos externos, o leite produzido pelos animais da raça Gir pode ser menos alergênico para a β -caseína. Nas raças taurinas (européias) apenas a raça Guernsey, que já foi à raça leiteira mais criada no Brasil, apresenta uma alta frequência do alelo A2, ficando a raça Jersey em segundo lugar, com 75% da proteína β -caseína A2 e 25% da proteína β -caseína A1, e a raça holandesa com 50% da β -caseína A1 e 50% da β -caseína A2 (GARCIA, 2009).

Quadro 1 – Distribuição da frequência alélica da β -caseína em diferentes raças.

Raça	Nº de animais	Frequência alélica da β -caseína				Referência
		A ¹	A ²	B	Outro	
Angus	77 (EUA)	0,95		0,05		Cadwellet al., 1971
Braham	59 (EUA)	0,99*		0,01		Caldwell et al., 1971
Guernsey	196 (EUA)	0,01	0,98	0,02		Aschaffenburg, 1963
Guernsey	40 (EUA)		0,96		C:0,04	Van Eenennaam & Medrano, 1991
Gir	385 (Brasil)	0,115	0,885			Vercesi Filho et al., 2012
Holstein	260 (Austrália)	0,63	0,35	0,02		McLean et al., 1984
Holstein	1383 (Itália)	0,58	0,40	0,02		Aleandri et al., 1997
Holstein	1152 (EUA)	0,43	0,55	0,02		Van Eenennaam & Medrano, 1991
Jersey	37 (EUA)	0,22	0,49	0,29		Kiddy et al., 1966
Jersey	47 (Reino Unido)	0,09	0,63	0,28		Aschaffenburg, 1968
Jersey	308 (Austrália)	0,07	0,57	0,36		McLean et al., 1984
Jersey	157 (Dinamarca)	0,07	0,58	0,35		Bech & Kristiansen, 1990
Jersey	172 (EUA)	0,17	0,50	0,33		Van Eenennaam & Medrano, 1991
Jersey	? (Canada)	0,19	0,50	0,31		Ng-Kwai-Hang & Kim, 1994
Jersey	116 (Irlanda)	0,30	0,41	0,28	A ³ :0,01	O'Hara, 1995
Jersey	1328 (N. Zelândia)	0,123	0,591			Winkelman & Wickham, 1997

* as variantes genéticas da β -caseína A não foram distinguidas em variantes A¹, A² e A³.

? número de animais em estudo não determinado.

Fonte: adaptado da EFSA, 2009.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LOCAL E REBANHO DO ESTUDO

O trabalho foi realizado na Estação Experimental Felipe Camarão, Fazenda Rockefeller, pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN), localizada no município de São Gonçalo do Amarante - RN, distante 13 km da capital Natal. A propriedade possui uma área de 430 ha e situa-se na região litorânea do Estado do Rio Grande do Norte, com clima predominantemente tropical chuvoso (EMPARN, 2012).

O rebanho estudado era composto de 156 animais puros de origem (PO) ao total, sendo 88 da raça Guzerá e 68 da raça Gir, entre bezerros (as), novilhas/garrotes, vacas e touros. Na estação experimental, utilizou-se o sistema de produção a pasto e suplementação com concentrado. A dieta de volumoso difere de acordo com a estação do ano: no período chuvoso, trata-se de pasto de Braquiária ou Mott e no período seco, pasto remanescente mais silagem (geralmente sorgo ou milho com capim elefante). Em ambos os períodos a dieta é suplementada com concentrado à base de farelo e casquinha de soja, milho em grão, torta de algodão. A ordenha é realizada duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas (4h e 16h).

3.2. COLETA DE AMOSTRAS

Os pelos foram retirados da vassoura da cauda do animal, colocados em envelopes, identificados e armazenados a temperatura ambiente até a extração de DNA (Figura 5).

Com o intuito de interferir o mínimo possível no manejo da fazenda e evitar o estresse excessivo dos animais, as amostragens foram realizadas durante o procedimento de registro genealógico, quando os animais eram levados para o tronco de contenção. Os pelos foram retirados laçando-se entre 15 e 25 pêlos nos dedos da mão e puxando-os com firmeza. Como a coleta ocorreu no período chuvoso, foi realizada, previamente, a limpeza, seguida da secagem dos pelos. Em seguida, foi verificado se os mesmos apresentavam os bulbos intactos, ou seja, se eles não foram quebrados antes da raiz.

O material coletado (pelo) foi enviado para o Laboratório de Biotecnologia Animal – ESALQ/USP para extração do DNA e genotipagem. Os dados das

características produtivas foram fornecidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte – EMPARN.



Figura 5 – Coleta, acondicionamento e identificação de amostras de pelos da vassoura da cauda de bovinos

3.3. EXTRAÇÃO DE DNA

As extrações de DNA foram feitas a partir dos folículos pilosos de cada animal experimental, totalizando 156 amostras. De acordo com o protocolo “Extração de DNA de bulbos capilares do Laboratório de Biotecnologia Animal – ESALQ/USP” (Anexo A).

As etapas de extração consistiram da lise das células, desproteinização e concentração do DNA. O método de extração de DNA escolhido é um método não-invasivo, caracterizando-se por ser de baixo custo e de fácil aplicação para as amostras de material biológico.

3.4. PRIMERS CSN2

O par de *primers* CSN2 foi previamente delineado por Vercesi Filho et al. (2012) e compreende uma região parcial do íntron 6 e éxon 7. O número de acesso ao *GenBank*, sequência dos *primers* e o tamanho do fragmento amplificado, podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 – Sequência dos *primers* e tamanho do produto amplificado.

Iniciador	Sequências dos iniciadores (5'-3')	Acesso GenBank	Tamanho Fragmento
CSN2	D - CTGGCTTTCAGTAAAGGGCTCAACTG	JN051275 e	362 pb
	R - TGACCCCAATTTCTTAACCAAACCAA	JN051276*	

*JN051275 = CSN2-A1; JN051276 = CSN2-A2.

Os *primers* foram diluídos em uma concentração final de 2pmol/μL, e as condições de temperatura de anelamento foram estabelecidas para o par de *primers* através de gradientes de temperatura.

3.5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

Para a reação de PCR foram utilizados 5 μL de DNA, adicionados a 20 μL do *mix* de reação composto pelos seguintes reagentes: 2,5 μL de tampão 10x (50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9,0), 0,75 de MgCl₂ (50 mM), 0,5 μL de dNTP (10 mM), 1,0 μL de cada *primer* (2,0 pmol/μL), 0,1 μL de enzima *Platinum*[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (*Invitrogen*) e água Mili-Q completando para um volume final de 25 μL.

O programa utilizado para amplificação dos fragmentos do gene da beta-caseína seguiu os seguintes ciclos: desnaturação inicial por 2 minutos a 95 °C, seguindo-se de uma nova desnaturação por 30 segundos a 95 °C, anelamento a 60°C por 30 segundos e a extensão a 72 °C por 30 segundos, seguindo-se de uma extensão final a 72 °C por 2 minutos. Foram realizados 32 ciclos da reação. As especificidades dos produtos amplificados foram verificadas em gel de agarose 1%.

Para a amplificação do DNA, foi feito um teste de gradiente, pois a temperatura de anelamento é um fator importante na otimização de uma PCR. Segundo Pértille (2013), temperaturas inadequadas tornam o pareamento *primer*-DNA menos seletivo e específico, aumentando o aparecimento de produtos indesejáveis.

A otimização da amplificação dos fragmentos de aproximadamente 362pb utilizada para o sequenciamento foi através da PCR e a visualização do gradiente

utilizado na reação foi realizada pela observação das bandas formadas pelo GelRed[®] intercalado ao DNA que fluoresce quando submetido à luz ultravioleta, depois da eletroforese em gel de agarose 1%

Após a amplificação dos fragmentos foram realizadas as purificações dos produtos de PCR pelo Protocolo de Purificação de PCR para Sequenciamento utilizando AGENCOURT[®] AMPURE[®] XP através de Beads magnéticas (Anexo B). A purificação do DNA amplificado visa eliminar esses resíduos aumentando a qualidade das sequências produzidas, além de ser indispensável para a preservação dos capilares do Sequenciador Automático de DNA (FIGUEIREDO et al., 2003). As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% juntamente com o padrão Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) para verificar a concentração e qualidade de DNA existente em cada amostra. A purificação dos produtos, consistiu na retirada dos resíduos de *primers*, dNTP e *Taq* DNA polimerase da reação, para obtenção de sequências de melhor qualidade nos cromatogramas após o seqüenciamento.

3.6. SEQUENCIAMENTO DO PRODUTO AMPLIFICADO

A reação de seqüenciamento foi realizada de acordo com o protocolo do Kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*[®] (Life Technologies). Para cada reação foram utilizados: tampão Save Money, *primers* (direto e reverso separadamente), Kit Big Dye, água mili-Q e DNA. O programa utilizado na reação de seqüenciamento compreendeu as seguintes fases: desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto, seguindo-se de uma nova desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 50 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 2 minutos, totalizando 35 ciclos (Anexo C). Foram preparadas duas reações de seqüenciamento para cada indivíduo, uma utilizando o *primer* direto e outra o reverso.

Para a purificação foi utilizado o protocolo de purificação da reação de seqüenciamento (LifeTech) (Anexo D). E posteriormente, as amostras foram aplicadas no seqüenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyser[®] (AppliedBiosystems).

3.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS DO POLIMORFISMO

As leituras das sequências de nucleotídeos do fragmento amplificado pelos iniciadores para o gene da beta-caseína A1 e A2, foram alinhadas e editadas, para confirmação das mutações e para obtenção das figuras foi utilizado o programa Geneious 5.6.5[®] (DRUMMOND et al., 2011).

3.8. DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DAS RAÇAS

a) Frequência alélica

As frequências alélicas (x_i) para os alelos da beta-caseína (i), e genotípicas para o genótipo (ii), foram estabelecidas, pelas Equações 1 e 2:

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

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

Em que n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados no alelo i, respectivamente; e n corresponde ao número de indivíduos analisados.

b) Teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg

Pelo teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genotípicas esperadas, em equilíbrio, podem ser estimadas a partir da expansão do binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_ix_j + x_j^2$$

Em que x_i^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo i; $2x_ix_j$ = frequência esperada para heterozigotos ij; x_j^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo j.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os animais submetidos à análise estatística foram somente aqueles que apresentaram o genótipo A2A2 e que estavam em lactação. Foi utilizado o programa Statistical Analysis System (SAS, 2002). O procedimento CORR foi utilizado para análise da associação entre as variáveis (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado e produção de leite) e comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA extraído foi submetido à reação de PCR e visualizado em gel de agarose. Algumas amostras de DNA tiveram que ser reextraídas devido à baixa quantidade de DNA obtida. Salman & Laureano (2006), utilizaram a mesma metodologia de extração de DNA e afirmaram que o método utilizado mostrou-se muito rápido e simples em relação a outras metodologias, além do menor custo, mas não foi eficiente do ponto de vista técnico, já que resultou em uma amostra de DNA de baixa qualidade e com muitas contaminações, as quais foram observadas pela amplificação por PCR de várias bandas inespecíficas.

4.2. AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS PARA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Observa-se na Figura 6 que os fragmentos de DNA amplificaram em todas as temperaturas de anelamento testadas (variando de 54 °C a 60 °C), sendo escolhida a de 60 °C como melhor temperatura de anelamento para os fragmentos.

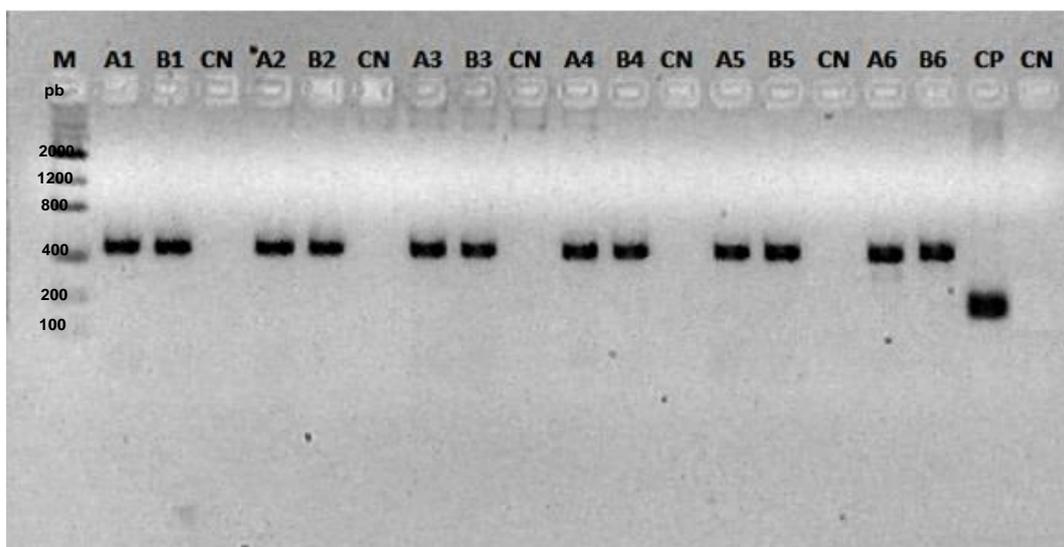


Figura 6 – Gradiente de temperatura (1: 61,0 °C; 2: 60,5 °C; 3: 59,6 °C; 4: 58,3 °C; 5: 56,7 °C; 6: 54,0 °C), marcador molecular (M), animal A (A), animal B (B), controles negativos (CN) e controle positivo (CP) para amplificação dos fragmentos do gene CSN2.

Após a purificação dos produtos, observou-se em gel de agarose 1% a qualidade do DNA, sendo as bandas mais intensas como de melhor qualidade (Figura 7).

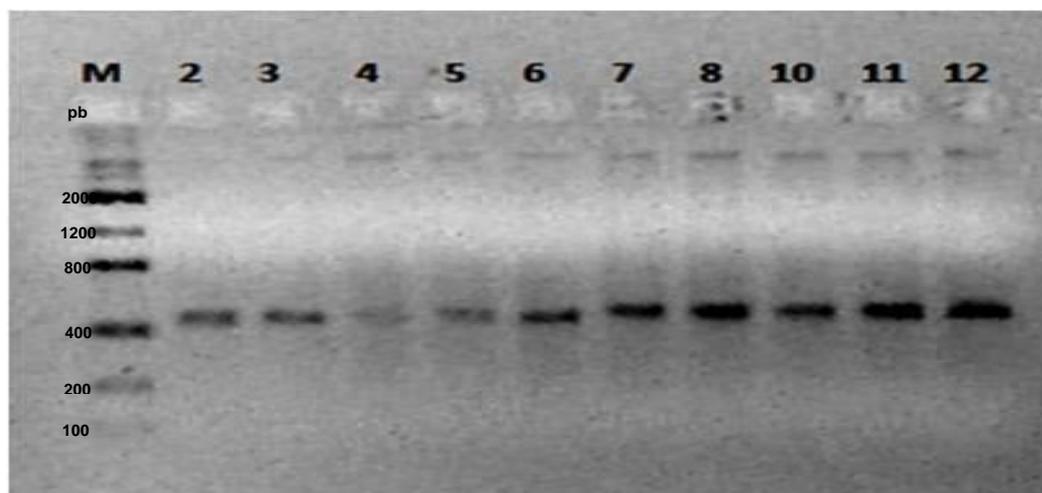


Figura 7 – Purificação pelo kit AGENCOUT[®] AMPURE[®] (PCR purification) a partir da amplificação de 10 amostras para o gene da CSN2 (M: marcador molecular; 2-12: animais).

4.3. SEQUENCIAMENTO

Os 156 animais da raça Gir e Guzerá foram sequenciados para identificação de polimorfismos no gene CSN2. Realizou-se duas reações de sequenciamento para cada indivíduo, uma utilizando o *primer* direto e outra o reverso para confirmação dos polimorfismos encontrados. Após a reação de sequenciamento, ocorreu à purificação da reação de sequenciamento, e em seguida as amostras foram aplicadas no sequenciador automático *ABI 3100 Applied Biosystems*.

Na Figura 8, observa-se a presença de um SNP no gene da CSN2. Dos quatro animais mostrados na imagem, um apresentou o alelo A1 (TT), sendo este heterozigoto (A1A2). Pode-se explicar a heterozigose, já que existe a presença de dois picos sobrepostos no cromatograma, enquanto que no polimorfismo homozigoto não há a sobreposição dos picos.

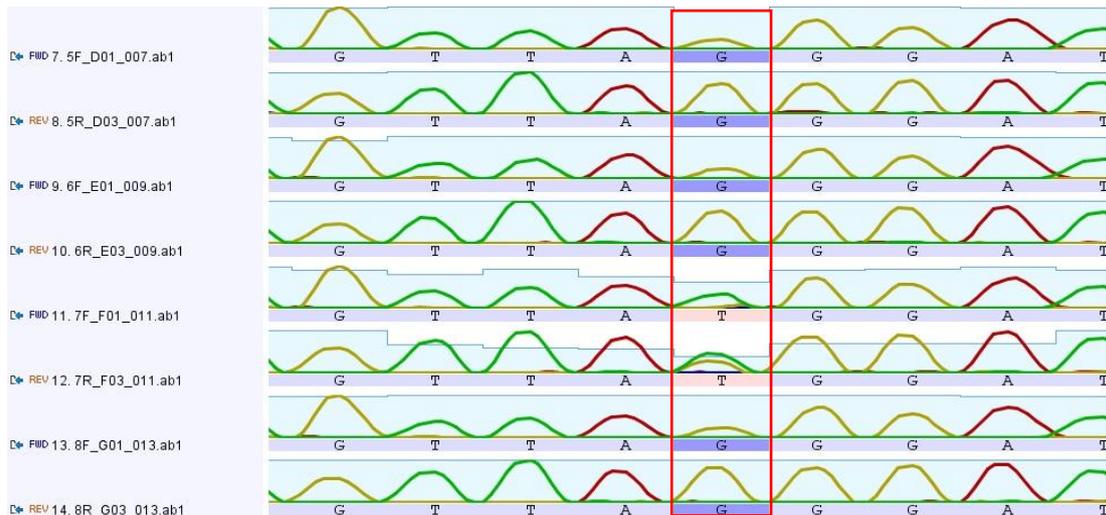


Figura 8 – Imagem do SNP CSN2, obtidas do software Geneious®.

Dos 156 animais estudados, somente nove apresentaram heterozigose (A1A2), enquanto que a maioria mostrou-se homozigoto para o A2. Em relação às raças, a Guzerá obteve uma maior quantidade de animais heterozigotos, com seis, contra três da raça Gir. Nenhum animal apresentou homozigose para o A1, esse fato pode ser explicado por Garcia (2009), pela alta frequência do alelo A2 nas raças zebuínas. Segundo Ayres et al. (2010), no Brasil foram realizados, por muitos anos, cruzamentos entre fêmeas taurinas e machos zebuínos para obtenção de animais mais adaptados às condições tropicais dos sistemas de produção nacionais. Posteriormente, utilizaram-se os cruzamentos absorventes com animais zebuínos para restaurar a composição zebuína. Portanto, embora os animais puros de origem (PO) gerados por estes cruzamentos possuam DNA nuclear de origem zebuína, o DNA mitocondrial é de origem taurina. Esse fato pode explicar a presença do alelo A1 nas raças zebuínas.

4.4. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

As frequências alélicas e genotípicas associadas ao polimorfismo da CSN2 são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Frequências alélicas e genotípicas para os alelos A1 e A2 nas raças Gir e Guzerá.

CSN2	Frequências alélicas		Frequências genotípicas			
	Raças	A1	A2	A1A1	A1A2	A2A2
Gir		0,02	0,98	-	0,04	0,96
Guzerá		0,03	0,97	-	0,07	0,93

As frequências alélicas observadas demonstraram que o alelo A2 encontra-se com frequência superior ao alelo A1 nas duas raças. Concomitante, não se observou a presença do genótipo A1A1 em nenhuma das raças e a frequência do genótipo A2A2 prevaleceu sobre o genótipo A1A2. Estes resultados se assemelham aos obtidos por Otaviano (2006), que encontrou 100% da frequência alélica (A2) e genotípica (A2A2) nas mesmas raças. Todavia, Vercesi Filho et al. (2012), em trabalho com a raça Gir, encontrou frequência de 0,885 para o alelo A2, e 0,084, 0,062 e 0,854 para o genótipo A1A1, A1A2 e A2A2, respectivamente. Apesar das duas pesquisas mostrarem resultados distintos, é preciso salientar que os autores trabalharam com outra amostra populacional e que as frequências alélicas e genotípicas são propriedades de cada população, portanto as diferenças, embora pequenas, existem.

Os resultados deste trabalho assim como dos trabalhos citados anteriormente confirmam a alta frequência das raças zebuínas para o alelo A2. Sendo assim, a maioria dos animais estudados pode produzir o leite A2, sendo este um produto que pode ser ingerido com maior segurança pelos indivíduos que apresentam sensibilidade a proteína β -caseína. Este fato é de grande importância para uma parte da população que apresenta a APLV, já que muitas pessoas

alérgicas à proteína β -caseína poderão consumir este leite bovinos em reações adversas.

Este estudo trouxe várias evidências e perspectivas sobre a qualidade do leite zebuíno, no entanto há necessidade de mais pesquisas nas raças zebuínas que correlacione esse polimorfismo com características de interesse zootécnico, com o intuito de comprovar o potencial desse locus como marcador genético em programas de melhoramento, e assim alavancar a produção de leite para produtos diferenciados no mercado leiteiro.

4.5. ESTATÍSTICA DESCRITIVA

O número de observações e as estimativas de médias, desvios-padrão, mínimos e máximos obtidos para as características produtivas dos rebanhos para o genótipo A2A2, estão ilustrados na Tabela 6 e 7.

Tabela 6 – Estatística descritiva para as características gordura (GORD), proteína (PROT), lactose (LACT), sólidos totais (ST), extrato seco desengordurado (ESD) em porcentagens (%) e produção de leite (PROD) em litros para a raça Guzerá.

Variável	N	Média	D.V.	C.V.	Mínimo	Máximo
GORD (%)	29	4,28	0,47	10,98	3,52	5,43
PROT (%)	29	3,43	0,22	6,41	3,02	3,81
LACT (%)	29	4,55	0,28	6,15	3,51	4,86
ST (%)	29	13,27	0,66	4,97	11,79	14,79
ESD (%)	29	8,99	0,39	4,34	8,08	9,70
PROD (L)	29	11,13	3,66	32,88	2,00	20,14

N: Número de observações; D.V.: Desvio-padrão; C.V.: Coeficiente de variação.

Tabela 7 – Estatística descritiva para as características gordura (GORD), proteína (PROT), lactose (LACT), sólidos totais (ST), extrato seco desengordurado (ESD) em porcentagens (%) e produção de leite (PROD) em litros para a raça Gir.

Variável	N	Média	D.V.	C.V.	Mínimo	Máximo
GORD (%)	24	4,21	0,64	15,20	2,84	5,09
PROT (%)	24	3,28	0,21	6,40	3,03	3,68
LACT (%)	24	4,61	0,19	4,12	4,12	4,93
ST (%)	24	13,04	0,74	5,68	11,79	14,62
ESD (%)	24	8,77	0,35	3,99	7,93	9,54
PROD (L)	24	12,79	5,01	39,17	2,98	26,83

N: Número de observações; D.V.: Desvio-padrão; C.V. Coeficiente de variação.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ribeiro et al. (2005) estudando a produção e composição do leite de vacas Gir e Guzerá no Rio Grande do Norte, que encontraram as seguintes médias para a raça Guzerá, $4,93 \pm 0,48$ (GORD); $3,91 \pm 0,20$ (PROT); $4,48 \pm 0,07$ (LACT); $9,52 \pm 0,23$ (ESD) e $6,86 \pm 1,31$ (PROD). Já para a raça Gir, as médias foram: $4,20 \pm 0,62$; $3,46 \pm 0,23$; $4,60 \pm 0,15$; $9,19 \pm 0,33$ e $8,58 \pm 2,10$ para gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e produção de leite, respectivamente.

Na tabela 8 é possível observar que houve diferença significativa nas porcentagens de proteína, lactose e extrato seco desengordurado entre as raças Gir e Guzerá.

Tabela 8 - Médias obtidas para as características gordura (GORD), proteína (PROT), lactose (LACT), sólidos totais (ST), extrato seco desengordurado (ESD) e produção de leite (PROD) das raças Gir e Guzerá.

Variável Raças	GOR	PROT	LACT	ST	ESD	PROD
Gir	4,21 ^a ±0,64	3,28 ^b ±0,21	4,61 ^a ±0,19	13,04 ^a ±0,74	8,77 ^b ±0,35	12,79 ^a ±5,01
Guzerá	4,28 ^a ±0,47	3,43 ^a ±0,22	4,55 ^b ±0,28	13,27 ^a ±0,66	8,99 ^a ±0,39	11,13 ^a ±3,66

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey a 5%.

As raças Gir e Guzerá se diferenciaram na correlação entre as características produtivas. Na raça Gir, a gordura e os sólidos totais apresentaram significativa correlação linear ($p < .0001$); enquanto para a raça Guzerá, houve uma expressiva correlação nas seguintes variáveis: gordura e sólidos totais, proteína e sólidos totais, e lactose e extrato seco desengordurado.

5. CONCLUSÃO

A frequência alélica do A2 e genotípica do A2A2 para o gene da β -caseína no rebanho estudado é alta, mostrando assim que as raças zebuínas podem produzir um leite menos alergênico para os indivíduos sensíveis à proteína β -caseína.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEANDRI, R.; et al. Effect of bovine milk protein polymorphism at two loci on cheese producing ability. **International Dairy Federation**.1997.
- ALEXANDER, L.J.; DAS GUPTA, N.A.; BEATTIE, C.W. Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. **Europe Journal Biochemical**.1998.
- ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. 2011. Disponível: <<http://www.asbia.org.br/novo/home/>>. Acesso em: 19/11/2012.
- ASCHAFFENBURG, R.; SEN, A.; THOMPSON, M.P. Genetic variants of casein in Indian and African Zebu cattle. **Comp Biochem Physiol** **25**. 1968.
- AYRES, H.; et al. Origem materna do zebu brasileiro. Beefpoint. O ponto de encontro da cadeia produtiva da carne. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/reproducao/origem-materna-do-zebu-brasileiro-63758/>>. Acesso em: 20/06/2014.
- BARENDSE, W. et al. The TG5 DNA Marker Test for marbling capacity in Australian Feedlot Cattle. **CSIRO Molecular Genetics Centre Level 3**, Australia, 2004.
- BECH, A.M. & KRISTIANSEN, K.R. Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield. **Journal of Dairy Research** **57**. 1990.
- BENHAMOU, A.H.; et al. An overview of cow's milk allergy in children. *Swiss Med Wkly*, 2009.
- BRASIL. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal - RIISPOA. 2002. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/setor/leite-e-derivados/o-setor/legislacao/RIISPOA-Dec.30691-52.pdf>>. Acesso em: 19/11/2012.
- BURZINSKA, B. & TOPZEWSKI, J. Genotyping of Bison *bonasus*κ-casein gene following DNA sequence amplification. **Animal Genetics**. 1995.

CALDWELL, J.; WESELI, D. F.; CARTWRIGHT, T. C. Occurrence of {alpha} s1- and {beta}-casein types in five breeds of beef cattle. **Journal of Animal Science** **32** (4): 601. 1971.

CARVALHO JR., F.F. Apresentação clínica da alergia ao leite de vaca com sintomatologia respiratória. **Jornal de Pneumologia**. v.27. n.1. p.17-24. 2001.

COSTA, R.G.; QUEIROGA, R.C.R.; PEREIRA, R.A.G. Influência do alimento na produção e qualidade do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.38, p.307- 321, 2009.

CRITTENDEN, R.G. & BENNETT, L.E. Cow's milk allergy a complex disorder. **J Am Cool Nutr**. 2005.

CRUCINSKY, J. Alergia *versus* Intolerância alimentar. 2008. Disponível em: <<http://www.esteticabr.com/alergia-x-intolerancia-alimentar/>>. Acesso em: 28/11/2013.

CTENA, M.L.B. & PIROLI, M. Leite Longa Vida: Indispensável na cozinha saudável. São Paulo: Editora e Consultoria em Nutrição Ltda, p. 158. 1999.

DIAS, A.; SANTOS, A.; PINHEIRO, J.A. Persistence of cow's milk allergy beyond two years of age. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2009.

DIAS-SALMAN, A.K.; et al. Marcadores moleculares na bovinocultura de corte. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinária** 10, 1-16. 2009.

DRUMMOND, A.; et al. **Geneious**, Auckland, v.5, p.4, 2011.

EFSA. European Food Safety Authority. Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. **Scientific Report of EFSA**. 2009.

ELLIOTT, R.B.; et al. Type I (insulin dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. **Diabetologia**. 1999.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/>>. Acesso em: 28/11/2013.

FARRELL JR., H.M.; et al. Nomenclature of the proteins of cow's milk-sixth revision. **Journal of Dairy Science**. 2004.

FERRAZ, A.L.; et al. Identification and characterization of polymorphisms within the 5' flanking region, first exon and part of first intron of bovine GH gene. **Journal Animal Breed Genetics**. 2006.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília, DF: EMBRAPA, 220 p. 1998.

FIGUEIREDO, E.; et al. Genetic gain in body weight feed conversion and carcass traits in White Plymouth Rock broiler strain Embrapa 021. **Proceedings of IX World Conference on Animal Production**. Porto Alegre: WAAP; ALPA; SBZ; UFRGS. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION. Porto Alegre - RS. 2003.

GALLO, L.A. As proteínas lácteas. Aditivos & Ingredientes. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ. São Paulo – SP. 2011. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/luagallos/proteinas2.pdf>>. Acesso em: 30/11/2012.

GARCIA, J. F. Practical considerations of embryo manipulation: Preimplantation genetic typing. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1393-1399, 2001.

GARCIA, J. F.; PORTO-NETO, L. P. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, Supl. 1, p. 197-203, 2006.

GARCIA, J.L.M. O leite A. 2009. Disponível em: <<http://girbrasilartigos.blogspot.com.br/2009/04/o-leite.html>>. Acesso em: 21/11/2012.

GASPARIN, F.S.R.; TELES, J.M.; ARAÚJO, S.C. Alergia à proteína do leite de vaca versus intolerância à lactose: As diferenças e semelhanças. **Revista Saúde e Pesquisa**. v.3. n.1. Maringá – PR. 2010.

GIGANTE, M.L.; COSTA, M.R. A nova pecuária leiteira brasileira. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. **Anais...** Recife - PE. 2008.

GOBETTI, M.; et al. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 2002.

GOES, P.R.N.; et al. Disponibilidade, usos e limitações do marcadores moleculares em espécies de animais de produção. **Iniciação Científica**. CESUMAR. v.14, n.1, p.5-16. 2012.

GUIMARÃES, P.E.M. & COSTA, M.C.R. SNPs: Sutis diferenças de um código. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 26, p.24-27, 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Estatística da produção pecuária. 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201303_publ_completa.pdf>. Acesso em: 15/02/2014.

KAMINSKI, S.; CIESLINSKA, A.; KOSTYRA, E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of Applied Genetic**. 2007.

KAPPES, S. M. Utilization of gene mapping information in livestock animals. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 136-147, 1999.

KIDDY, C.A.; PETERSON, R.F.; KOPFLER, F.G. Genetic control of the variants of 3-casein. **J. Dairy Sci** **49**. 1966.

KNEEPKENS F.C.M. & MEIJER Y. Clinical practice. Diagnosis and treatment of cow´s milk allergy. **Eur J Pediatr**, 2009.

KODA, Y.K.L. & BARBIERI, D. Alergia à proteína do leite de vaca. **Revisões e Ensaios**. São Paulo. 1984.

KOSTYRA, E.; et al. Opioid peptides derived from milk proteins. **Polish Journal of Nutrition Science**. 2004.

MARANHÃO, A.M. Níveis plasmáticos de IGF-I e polimorfismo no gene do GH como possíveis indicadores do potencial produtivo em bovinos. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista. Botucatu – SP. 2000.

McLACHLAN, C.N. Beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Medical Hypotheses*. 2001.

McLEAN, D.M.; et al. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. **The Journal of Dairy Research** **51**. 1984.

NG-KWAI-HANG, K.F. & KIM, S. 1994. Genetic polymorphism of milk proteins in Ayrshire, Jersey, Brown Swiss and Canadienne. **Brief communications of the XXIV International Dairy Congress**. 1994.

NILSEN, H.; et al. Casein haplotypes and their associations with milk production traits in Norwegian Red cattle. *Genetics Selection Evolution* **41**, 1-12. 2009.

O'HARA, H. M. Genetic variants of milk proteins and their effect on the composition and processing properties of bovine milk. **MSc Thesis, National University of Ireland**. 1995.

OLENSKI, K.; et al. Polymorphism of the beta-casein gene and its association with breeding value for production traits of Holstein-Frisian bulls. **Livestock Science**. 2010.

ORDÓÑEZ, J.A.; et al. Tecnologia de alimentos: Alimentos de origem animal. Volume 2. Artmed. Porto Alegre – RS. 2005.

ORSI, M.; et al: Alergia a la proteína de leche de vaca: Proposta de guia para manejo de lo niños con alergia a la proteína de leche de vaca. **Arch Argent Pediatric**, 2009.

OTAVIANO, A.R. Polimorfismo dos genes das caseínas e sua utilização na detecção de misturas de leite bovino e bubalino. **Tese de doutorado**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal – SP. 2006.

PEDROSO, A.M.; et al. Tecnologia para produção de leite na Região Sudeste do Brasil: Importância econômica. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora – MG. 2011. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistemaproducao/12import%C3%A2nciaecon%C3%B4mica>>. Acesso em: 28/11/2013.

PEREIRA, A.M., et al. Influência da Fonte de Proteína da Dieta Total na Composição do Leite de Vacas Holandesas. **Ciência Agrotécnica**. Lavras - MG. 2001.

PÉRTILLE, F. Identificação de polimorfismo associados às características de desempenho de carcaças no cromossomo 4 da galinha (*Gallus gallus*). Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP. Piracicaba – SP. 2013.

PILA, J. Panorama da produção de leite no Brasil e no mundo. Scot Consultoria. Bebedouro – SP. 2013. Disponível em: <<http://www.scotconsultoria.com.br/noticias/artigos/29440/panorama-da-producao-de-leite-no-brasil-e-no-mundo.htm>>. Acesso em: 28/11/2013.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. Biologia molecular aplicada à produção animal. Brasília, DF: EMBRAPA, 213 p. 2001.

RIBEIRO, A.B.; et al. Produção e composição do leite de vacas Gir e Guzerá nas diferentes ordens de parto. **Revista Caatinga**, v.22, n.3, p.46-51. 2005. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/2371/237117837008.pdf>>. Acesso em: 12/01/2014.

ROGINSKY, H. Encyclopedia of Dairy Sciences. **Academic Press**. 2003.

SALMAN, A.K.D. & LAUREANO, M.M.M. Protocolos para extração de DNA genômico de amostras de pelo de bovinos. Circular Técnica 87. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Porto Velho – RO. 2006.

SANTOS, M.V. & FONSECA L.F.L. Curso on-line: Monitoramento da Qualidade do Leite. Agripoint. 2004.

SAS Institute Inc. Statistical Analysis System user's guide. Version 9.0. Cary, Statistical Analysis System Institute. 513p. 2002.

SCAPIN, F. Polimorfismos genéticos. 2009. Disponível em: <http://genetica.ufcspa.edu.br/biomedic/conteudo/genetica_molecular/polimorfgen.PDF>. Acesso em: 02/12/2012.

SIQUEIRA, K.B.; et al. Panorama do leite. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora – MG. 2012. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_02_PanoramaLeite.pdf>.

Acesso em: 28/11/2013.

SODHI, M.; et al. Screening of taurine and crossbred breeding bulls for A1/A2 variants of β -casein gene. **Indian Journal of Animal Sciences**. 2012.

SUN, Z.; et al. Relation of beta casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. **Peptides**. 2003.

TAILFORD, K.A.; et al. A casein variant in cow's milk is atherogenic. **Atherosclerosis**. 2003.

THORSODDOTTIR, I; et al. Different (beta-casein) fractions in Icelandic versus Scandinavian cow's milk may influence diabetogenicity of cow's milk in infancy and explain low incidence of insulin dependent diabetes mellitus in Iceland. **Pediatrics**. 2000.

TROMPETTE, A.; et al. Milk bioactive peptides and b-casomorphins induce mucus release in rat jejunum. **The Journal of Nutrition**. 2003.

USDA. United States Department of Agriculture. 2013. Disponível em: <<http://www.usdabrazil.org.br/portugues/>>. Acesso em: 30/01/2014.

VAN EENENNAAM, A.L. & MEDRANO. J.F. Differences in allelic protein expression in the milk of heterozygous beta-casein cows. **Journal of Dairy Science**. 1991.

VANDENPLAS Y; et al. Guidelines for diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. **Arch Dis Child**, 2007.

VERCESI FILHO, A.E.; et al. Identificação de alels A1 e A2 para o gene da beta-caseínas na raça Gir Leiteiro. In: IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. **Anais...** João Pessoa – PB. 2012.

VIANA, G. & FERRAS, R.P.R. Um estudo sobre a organização da cadeia produtiva do leite e sua importância para o desenvolvimento regional. **Revista Capital Científico do Setor de Ciências Sociais Aplicadas**, v. 5, n. 1, 2007.

VIGNAL, A.; et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v.34, p.275-305, 2002.

VILELA, D. Sistemas de produção de leite para diferentes regiões do Brasil. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora – MG. 2011. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistemaproducao/>>. Acesso em: 28/11/2013.

WINKELMAN, A.M. & WICKHAM, B.W. Associations between milk protein genetic variants and production traits in New Zealand dairy cattle.*in: Proceedings of the IDF Seminar, Milk Protein Polymorphism*. 1997.

WOODFORD, K. A1 beta-casein, type 1 diabetes and links to other modern illnesses. An invited plenary paper to the International Federation Western Pacific Congress. 2008.

ANEXOS

ANEXO A–PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BULBOS CAPILARES

Operador:

Data: __/__/____

Extração de DNA de bulbos capilares:

- 1) Cortar 5 bulbos capilares com + ou – 0,5cm dos pelos e colocar em tubos de 1,5 mL devidamente marcados.
- 2) Acrescentar 100 µl de solução de lise, ressuspender no vortex (até formar espuma) e centrifugar por 10 segundos à 13000 rpm.
- 3) Incubar à 95°C por 10 minutos.
- 4) Adicionar 100 µl de solução neutralizadora e conservar à -20°C.

soluções:

- A) Solução de lise: NaOH 200 mM
- B) Solução neutralizadora: HCl 200 mM
Tris-HCl100mM pH 8,5

ANEXO B – PROTOCOLO PURIFICAÇÃO PCR PARA SEQUENCIAMENTO AGENCORT® AMPURE® XP

1. Colocar 10 µl de PCR em uma placa
2. Agite suavemente o frasco de AgencourtAMPure XP para ressuspender as partículas magnéticas que possam ter precipitado (Geladeira Lab Central).
3. Adicionar 18 µl de AgencourtAMPure XP de acordo com a tabela.

PCR Reaction Volume (µL)	AMPure XP Volume (µL)
10	18
20	36
50	90
100	180

O volume de AgencourtAMPure XP para uma determinada reação pode ser derivado da seguinte equação (Volume AgencourtAMPure XP por reação) = 1,8 x (Volume Reaction)

4. Misturar a reação 10X usando uma micropipeta. Deixe as amostras misturadas 5 minutos em temperatura ambiente para a recuperação máxima. Esta etapa liga os produtos PCR 100bp e maiores às esferas magnéticas. Misturar com a micropipeta é preferível pois tende a ser mais eficaz. A cor da mistura deverá aparecer marrom depois da mistura homogênea.
5. A partir deste passo até o passo 7 fazer na placa magnética. Coloque a placa de reação em uma Super Placa Magnética (AgencourtSPRIPlate 96) por 2 minutos para separar esferas da solução. Nesse momento as esferas se ligam a placa magnética formando uma bolinha, deixando a solução límpida.
6. Descarte o sobrenadante cuidadosamente sem tocar nas esferas, elas não devem ser descartadas. Se for difícil a separação, deixe alguns microlitros para o próximo passo.
7. Pipetar 200 µl de etanol 70% em cada poço da placa de reação e incubar por 1 minuto à temperatura ambiente. Descartar o etanol cuidadosamente sem tocar nas esferas.
8. Repita o passo 7 a para um total de duas lavagens. Nesse é importante retirar todo o sobrenadante.

9. Retirar da placa de reação da placa magnética secando à temperatura ambiente por aproximadamente (15' – 30') até secar completamente.
10. Ressuspender as amostras em 12µl de água mili Q, misturando com a pipeta 10x até que a solução fique de cor marrom.
11. Coloque a placa de reação na placa magnética por 2 minutos para separar esferas da solução.
12. Transferir somente 10 µl do sobrenadante límpido para uma nova placa, com cuidado para não pegar as esferas junto.
13. Aplicar 1 µl das amostras no gel de agarose a 1%, usando 2 µl do marcador de peso molecular (Lowmassladder – Invitrogen), para visualização e quantificação do produto de PCR purificado.
14. Armazenar a -20 °C.

Materiais:

1. Produto de PCR
2. AgencourtAMPure XP (PN A63881 – marca BeckmanCoulter – Representante ESalab)
3. PlacaAgencourtSPRIPlate 96 Super Placa Magnet. (PN AM10027 – Ambion – Life tech)
4. Ethanol 70% Merck
5. Micropipetamulticanal P10/P50/P300
6. Ponteira P10 e P200
7. Placa PCR
8. Gel de agarose
9. Marcador de peso molecular Low Mass Ladder (Invitrogen N. cat. 10068-013)

**ANEXO C - PROTOCOLO SEQUENCIAMENTO DE DNA –
LABORATÓRIO MULTIUSUÁRIO – ALUNOS LBA**

DATA: __/__/__

USUÁRIO:

A) REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Reagentes Mix		1X	___X
Tampão 5x ABI (Sala Genoma)		1 µL	
BigDye v3 (Sala Genoma)		0,5 µL	
Primer (5 pmol/ul) (aluno)		1 µL	
2.1.3.4.2 Sub total		2,5µ l	
Água MQ (aluno)	Y	___ µL	
2.1.3.4.3 DNA (aluno) - consultar gráfico	X	___µL	
	Total	10 uL	

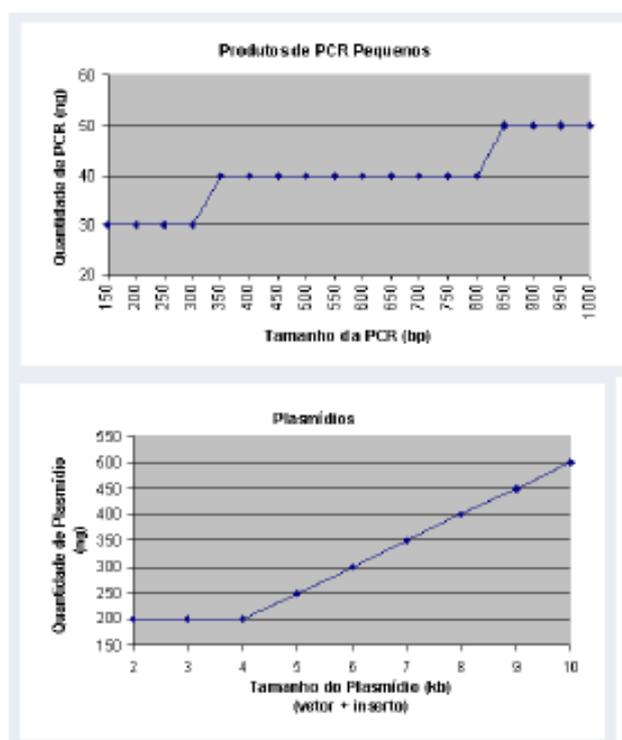
Obs: Sempre seqüenciar 1 amostra do PGEM como controle positivo do seu seqüenciamento.

- 1) Faça o cálculo do seu mix. Identifique sua placa na borda (ex. Debora Placa 1).
***Identificação da placa somente na borda. Nunca risque a placa com canetinha para marcar as posições, isso pode comprometer o capilar.
- 2) Retire os reagentes para descongelar e mantenha-os no gelo. Deixar o Big Dye no freezer só retire na hora de usar.
- 3) Preparar o mix usando as micropipetas para mix de PCR (Armário Lab. Central) com ponteira com barreiras para evitar a contaminação dos reagentes. Agite bem no vortex e de um spin.
- 4) Distribuir o mix na placa. Pode usar uma micropipeta comum. Nesse momento se for o mesmo primer pode usar a mesa ponteira. A distribuição na placa é por coluna e não por linha.
- 5) Distribuir o DNA não esquecendo de trocar as ponteiras para não contaminar as amostras (consulte gráfico 1).
- 6) Cubra a placa com o tapetinho e leve ao termociclador.

Programa no Termociclador: Seq-Appli (duração 2h e 23min).

1	Step 1	95°C	1 minuto		Denaturacao
1	Step 2	95°C	15 segundos		Denaturacao
2*	Step 3	50°C	15 segundos	P/todos os primers	Anelamento
3	Step 4	60 °C	2 minutos		Extensão
4	Step 5	Go to Step 2	35 more times		
5	Step 6	4°C	Forever		
End	Step7	End			

B) Gráfico 1: Concentração de produtos de PCR ou Plasmídeo



É obrigatório anexar a foto do gel identificando as amostras. Salvar com fundo branco e bandas pretas.

ANEXO D - PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO (LifeTech)

(Retirar placa de Seq 10 µl do termociclador dar Spin. Se não for purificar em seguida guardar no freezer -20 °C). Após seq purificar em até 48 hrs.

- 1- Adicionar 2,5 µl de EDTA 125 mM em cada pocinho, (fica na primeira prateleira do freezer do genoma), misturar bem com a pipeta homogeneizado.
(Lembre-se de trocar de pipeta a cada amostra).
- 2- Adicionar 60 µl de Etanol Absoluto (Você pode usar a mesma ponteira se não tocar no pocinhos).
- 3- Selar a placa com adesivo e agitar no vortex por 2 min.
- 4- Incubar a temperatura ambiente por 15 min.
- 5- Centrifugar 45 min / 4000 rpm / 4°C.
- 6- Spin com a placa invertida sobre um papel toalha dobrado / 15 segundos ou até chegar a 800 rpm.
- 7- Adicionar 60 µl Etanol 70%.
- 8- Centrifugar 15 min / 4000 rpm / 4°C.
- 9- Spin com a placa invertida sobre um papel toalha dobrado / 15 segundos ou até chegar 800 rpm.
- 10-Secar a temperatura ambiente / 1 hora / no escuro.
- 11-Selar a placa com adesivo, embalar em papel alumínio e armazenar em freezer -20°C, devidamente identificada na primeira prateleira do freezer sala genoma.
- 12-Preencher o formulário de requisição de serviço, anexar a foto do gel, colocar na mesa da Nirlei.
- 13-Importante o resultado será enviado em até 5 dias úteis. Favor aguardar.

A partir desse passo é realizado pelo operador do equipamento

- 14-Retirar a placa do freezer -20°C, acrescentar 10 µl de formamidaHi-Di da AppliedBiosystems. Agitar no vortex por 2 minutos.
- 15-Denaturar à 95°C por 5 minutos e colocar no gelo por 5 minutos, verificar se não tem bolhas, se tiver dar spin. Levar ao seqüenciador ABI 3130.