

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**POLIMORFISMO DOS GENES DAS CASEÍNAS E SUA UTILIZAÇÃO NA
DETECÇÃO DE MISTURAS DE LEITE BOVINO E BUBALINO**

MSc. ANTONIO ROBERTO OTAVIANO

Orientador: Prof. Dr. HUMBERTO TONHATI

Co-Orientadora: Prof. Dra. JANETE APARECIDA DESIDÉRIO SENA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal – UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
AGOSTO – 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: POLIMORFISMO DOS GENES DAS CASEÍNAS E SUA UTILIZAÇÃO
 NA DETECÇÃO DE MISTURA DE LEITE BOVINO E BUBALINO

AUTOR: ANTONIO ROBERTO OTAVIANO
ORIENTADOR: Dr. HUMBERTO TONHATI
 Co-Orientador(a): DRA. JANETE APPARECIDA DESIDERIO SENA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em ZOOTECNIA pela Comissão Examinadora:


 Dr. HUMBERTO TONHATI

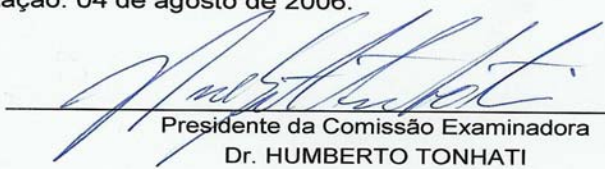

 Dra. MARIÂNGELA CRISTOFANI


 Dra. LÚCIA REGINA MARTELI


 Dr. JOÃO ADEMIR DE OLIVEIRA


 Dra. LÚCIA GALVAO DE ALBUQUERQUE

Data da realização: 04 de agosto de 2006.


 Presidente da Comissão Examinadora
 Dr. HUMBERTO TONHATI

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANTONIO ROBERTO OTAVIANO – filho de Benedito Marcos Otaviano e Ângela Maria Donizetti Laguna Otaviano, nascido em 14 de Julho de 1977, na cidade de Santa Rita do Passa Quatro – SP. Em março de 1997, ingressou no Curso de Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Barão de Mauá, na cidade de Ribeirão Preto – SP. No ano de 1998, transferiu o curso para o Centro Universitário Hermínio Ometto, na cidade de Araras – SP, concluindo o curso em Dezembro de 2000. Em 1998, foi estagiário do Laboratório de Biotecnologia em Citrus, no Apta Citrus na cidade de Cordeirópolis - SP, onde iniciou com bolsa de Iniciação Científica, concedida pelo CNPq, no ano de 2001, passou a bolsa de capacitação técnica da FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), onde trabalhou no projeto genoma. Em outubro de 2001, foi selecionado pelo programa de Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal, para o curso de mestrado, ingressando em março de 2002 no curso, concluindo em fevereiro de 2003. Em março de 2003, teve início ao curso de doutorado, tornado-se bolsista FAPESP em julho do mesmo ano foi contemplado com a bolsa de doutorado. Em Agosto de 2006, completou seu doutorado.

“Depois de algum tempo aprendemos a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma.

Aprendemos que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança.

Aprendemos que beijos não são contratos e nem promessas.

Passamos a aceitar as derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante.

Depois de um tempo, aprendemos que o sol queima se a ele ficarmos expostos por muito tempo.

Aprendemos que não importa o quanto importemos algumas pessoas simplesmente não se importam.

Acreditamos que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai nos ferir de vez em quando e precisamos perdoá-la por isso.

Descobrimos que é necessário certo tempo para construir confiança, e poucos segundos para destruí-la.

Aprendemos que é possível fazer coisas em um instante das quais nos arrependemos pelo resto da vida.

Descobrimos que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias.

E que o importante não é o que temos na vida, mas quem temos.

Aprendemos que as circunstâncias e os ambientes influenciam sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.

Aprendemos que se não controlamos nossos atos, eles nos controlarão, e que ser flexível, não significa ser fraco, ou não ter personalidade.

Aprendemos que heróis são pessoas que fizeram o que era preciso fazer, enfrentando conseqüências.

Aprendemos que quando estamos com raiva temos o direito de ter raiva, mas isso não nos dá o direito de ser cruel.

Descobrimos que só por que alguém não nos ama do jeito que queremos, não significa que esse alguém não nos ame com tudo que pode.

Aprendemos que o tempo não volta. E aprendemos o que realmente podemos suportar.

Também, percebemos que a vida tem valor e que temos valor diante dela.”

Autor Desconhecido

À minha família maravilhosa que amo, e sem ela não estaria aqui e em lugar algum: Benedito Marcos Otaviano, Ângela Maria Donizetti Laguna Otaviano, Kelly Cristina Otaviano e Marcos Rodrigo Otaviano.

DEDICO ESTE TRABALHO

A todos os brasileiros, que mesmo indiretamente, contribuíram para minha formação intelectual, com suas contribuições pelos impostos.

OFEREÇO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

Aqui, pretendo expressar a minha gratidão por aqueles que de alguma forma colaboraram para execução desse trabalho.

- ❖ A DEUS e a todos os ESPIRITOS SUPREMOS, que sempre estiveram de meu lado, em todos os meus passos no caminho da vida.
- ❖ Ao meu amigo e orientador Prof. Dr. Humberto Tonhati, pela amizade, ajuda e compreensão e consideração ao longo destes anos de trabalho.
- ❖ A Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena, por ajudar com seus conhecimentos e também por nos aceitar em seu laboratório por um período de desenvolvimento do projeto.
- ❖ A todos os professores que contribuíram para a formação de mais uma etapa de minha carreira.
- ❖ Ao meu eterno Amigo André (Murotte), sempre esteve junto, em todos os momentos de alegria e tristeza, conseguimos superar e continuarmos com força.
- ❖ À minha eterna Amiga Momyka (Paty Maionese), que sempre esteve ao meu lado também, nos momentos alegres e tristes e que de alguma forma tiramos resultados bons disso.
- ❖ Aos meus estagiários Lívia, Fernanda, Renan (Margarida), Matheus (Fedo) e Gregório, muito obrigado pela colaboração e amizade construída e o relacionamento em grupo por nós realizado. Todos possuem um grande potencial, aproveitem.
- ❖ Às minhas duas amigas Luciana (Lulu) e Priscilla (Flor), as quais estimo e tenho muito carinho e o mais puro sentimento de AMIZADE. Pode passar horas, dias, semanas, meses, anos, séculos..... nossas almas serão eternas amigas, e abençoadas por DEUS.
- ❖ A todos os meus amigos, Fernando (Uruguaio), André (Catatau), Felipe, Marcio, Marcio Vasconcelos, Raphael, Rafael Bonilha, Eduardo, Frank,

Zinaldo, Toinho (Antonio Rodrigues), Raphael Bernal e Leonardo que sempre os terei em minha mente.

- ❖ Às minhas amigas Roberta, Maria Eliane (Durva), Annaíza, quero sempre a amizade, meu muito obrigado por fazerem parte de minha vida.
- ❖ A família Otaviano, Laguna, Ferronato, que de alguma forma sempre acreditaram em meu potencial.
- ❖ Ao laboratório de Genética de Bactérias, pelos amigos e amizades construídas, coordenado pelo Prof. Dr. Manoel Victor e Profa. Janete Aparecida Desidério Sena, minha gratidão pelo tempo que fui acolhido, meu muito obrigado.
- ❖ À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa concedida.
- ❖ À criadora de Búfalo, Dona Wilma Ferreira Penteado (Fazenda Santa Eliza), por acreditar em parcerias entre a iniciativa privada e a Universidade disponibilizando seu rebanho.
- ❖ Ao Laticínio White Milk, de propriedade de Neto Arantes e Carla Beatriz Quites Arantes, agradeço pela colaboração para uso das dependências do Laticínio.
- ❖ Às Fazendas que cederam os rebanhos de bovinos para coleta de material para execução do projeto: Setor de Bovinocultura de Leite da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV – UNESP, Epamig (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), Uberada - MG, à APTA Regional Centro Leste, Ribeirão Preto – SP, ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa – SP, à Fazenda Lajeado, na cidade de Sales Oliveira – SP.

ÍNDICE

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Revisão de Literatura.....	1
Objetivo Geral.....	4
CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA ALFA-S1-CASEÍNA EM BUBALINOS E BOVINOS.....	8
Resumo.....	8
CHAPTER II - ALFA-S1-CASEIN GENE DESCRIBED IN Bubalus bubalis, Bos taurus AND Bos indicus.....	9
Abstract.....	9
Introdução.....	10
Material e Métodos.....	11
Resultados e Discussão.....	18
Referências Bibliográficas.....	25
CAPÍTULO III - POLIMORFISMOS NOS GENES DAS CASEÍNAS – BETA E KAPPA - EM BUBALINOSBOVINOS.....	29
Resumo.....	29
CHAPTER III - POLYMORPHISM IN BETA AND KAPPA CASEIN GENES OF BUFFALOES AND BOVINE.....	30
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Objetivo.....	33
Material e Métodos.....	33
Resultados e Discussão.....	42
Conclusões.....	60
Referências Bibliográficas.....	61
CAPÍTULO IV- UTILIZAÇÃO DE POLIMORFISMO DOS GENES CASEÍNAS PARA IDENTIFICAR MISTURA DE LEITE BUBALINO E BOVINO.....	66
Resumo.....	66
CHAPTER IV - USE OF POLYMORPHISM OF CASEIN GENES TO IDENTIFY MIXTURE OF BUBALINE AND BOVINE MILK.....	67
Abstract.....	67
Introdução.....	68
Objetivo.....	69
Material e Métodos.....	70
1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MOZZARELLA.....	70
2. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	70
3. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR.....	71
4. TÉCNICA DE PCR-RFLP.....	72
Resultados e Discussão.....	74
1. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR.....	74
2. TÉCNICA DE PCR-RFLP.....	74
Conclusão.....	79
Referências Bibliográficas.....	80
IMPLICAÇÕES.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

CEE – Certificado de Origem Geográfica.

CSN1S1 – Alfa-s1-caseína.

CSN2 – Beta-caseína.

CSN3K – Kappa-caseína.

DNA-SSCP – Polimorfismo de conformação de cadeia simples de DNA.

DOC – Denominação de origem controlada.

DOP – Denominação de proteção de origem.

DPCM – Disciplina de Produção do DOC

IEF – Isoelectrofocusing.

LINE – Elemento interespecífico longo.

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase.

RFLP – Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição.

SNPs – Polimorfismo de nucleotídeo simples.

POLIMORFISMO DOS GENES DAS CASEÍNAS E SUA UTILIZAÇÃO NA DETECÇÃO DE MISTURAS DE LEITE BOVINO E BUBALINO

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo verificar a existência de polimorfismos nos genes da alfa-s1-caseína (CSN1S1), beta-caseína (CSN2) e kappa-caseína (CSN3K) em bubalinos e bovinos e analisar sua possível utilização na detecção de mistura de leite na produção de *mozzarella*. No total, foram analisadas 510 amostras de sangue sendo, 150 de búfalas da raça Murrah e 60 de cada raça bovina (Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suíço, Guzerá e Jersey). Foram seqüenciados um fragmento de 954 pb do gene da CSN1S1, um de 495 pb do gene CSN2 e um de 373 pb do gene CSN3K, foram caracterizados pelo seqüenciamento realizado em 28 amostras para cada gene, perfazendo um total de 4 amostras para cada grupo genético considerado. Caracterizou-se SNPs entre as seqüências nucleotídicas de búfalos e de bovinos para os genes das caseínas. No entanto, a técnica de PCR-RFLP *Alu* I e *Hinf* I não identificaram polimorfismo, caracterizando o alelo A para todos os animais estudados no gene CSN1S1. No gene CSN2 a técnica de PCR-RFLP *Hae* III e *Hinf* I aplicada nas amostras bubalinas mostrou monomorfismo do alelo A1. Em bovinos identificaram-se os alelos A1 e A2 com freqüências variadas caracterizada pela enzima *Hae* III. A técnica de DNA-SSCP no gene CSN2 caracterizou os alelos A1 e B nos búfalos, e A2 e B nos bovinos. No gene CSN3K a técnica de PCR-RFLP *Alu* I em búfalos não identificou polimorfismo, caracterizando apenas o alelo B, confirmado pela técnica de DNA-SSCP. Em bovinos a enzima *Hind* III identificou os alelos A e B com freqüências variadas. Foram utilizados os genes alfa-s1-caseína (CSN1S1), beta-caseína (CSN2) e kappa-caseína (CSN3K) em tratamentos de *mozzarella* pura de búfala (T1), com misturas adicionais de leite de vaca com porcentagens de 1, 2, 5, 8 e 12 % (T2, T3, T4, T5, T6) e *mozzarella* pura de leite bovino (T7). A técnica de PCR-RFLP, com as endonucleases *Alu* I e *Hinf* I, não gerou diferenças nos padrões para o gene CSN1S1. No gene CSN2 a enzima *Hae* III gerou perfis eletroforéticos distintos, diferenciando o gene bubalino do gene bovino. Utilizando

a endonuclease *Hinf* I, os perfis foram idênticos. Para gene CSN3K os perfis eletroforéticos obtidos com as endonucleases *Alu* I e *Hind* III, não permitiram diferenciar o gene bubalino do gene bovino. Os perfis eletroforéticos gerados pela enzima *Hae* III diferenciando o gene bubalino do gene bovino permitiu identificar mistura de leite na manufatura de *mozzarella*.

Palavras-chave: Marcador Molecular, CSN1S1, CSN2, CSN3K, PCR-RFLP

POLYMORPHISM OF THE CASEIN GENES AND ITS USE IN THE DETECTION OF MIXTURES OF BOVINE AND BUBALINE MILK

ABSTRACT

The present study objectified verify the existence of polymorphisms in the genes of the alpha-s1-casein (CSN1S1), beta-casein (CSN2) and kappa-casein (CSN3K) in bubalinos and bovines and to analyze its possible use in the detention of milk mixture in the production of mozzarella. It was evaluated 510 blood samples, where: 150 from female Murrah buffaloes and 60 from each bovine breed (Holstein, Gir, Girolando, Brown Swiss, Guzerá and Jersey). Sequencing one fragment with 954 bp of CSN1S1 gene, one of 495 bp of CSN2 gene and one 373 bp of CSN3K gene, and they had been characterized by sequencing carried through in 28 samples for gene evaluated, with 4 samples for each considered genetic group. SNPs was characterized enters the nucleotides sequences of buffalos and bovines for casein genes. However, the technique of PCR-RFLP *Alu* I and *Hinf* I do not identified to polymorphism, characterizing allele for all the animals studied in CSN1S1 gene. In CSN2 gene the technique of PCR-RFLP *Hae* III and *Hinf* I applied in the bubaline samples showed monomorphism of allele A1. In bovine the alleles A1 and A2 with varied frequencies had been identified and characterized for the enzyme *Hae* III. The technique of DNA-SSCP in CSN2 gene characterized the alleles A1 and B in the buffalos, and A2 and B in bovine breed. On CSN3K gene the technique of PCR-RFLP *Alu* I in buffalos did not identify polymorphism, characterizing only allele B, confirmed for the DNA-SSCP technique. In bovines the enzyme *Hind* III identified the alleles A and B with varied frequencies. The genes had been used alpha-s1-casein (CSN1S1), beta-casein (CSN2) and kappa-casein (CSN3K) in treatments with mozzarella made with pure buffalo milk (T1), and additional mixes with bovine milk in different proportions: 1, 2, 5, 8 e 12 % (T2, T3, T4, T5, T6) and mozzarella made with pure bovine milk (T7). The PCR-RFLP technique, with endonucleases *Alu* I and *Hinf* I, did not generate differences in the standards for gene CSN1S1. In gene CSN2 the

enzyme *Hae* III generated distinct electrophoresis profiles, differentiating the bubalino gene of the bovine gene. Using endonuclease *Hinf* I, the profiles they had been identical. For gene CSN3K the electrophoresis profiles observed with endonucleases *Alu* I and *Hind* III, do not permit the differentiation among bovine and buffaloes samples. The electrophoresis profiles generated by the enzyme *Hae* III differentiating the bubaline of the bovine gene allowed identifying milk mixture in the manufacture of mozzarella.

Key-words: Molecular Markers, CSN1S1, CSN2, CSN3K, PCR-RFLP

CAPÍTULO I - Considerações Gerais

Revisão de Literatura

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 possui nutrientes minerais, vitaminas, gorduras e proteínas, sendo um alimento indispensável para o seu desenvolvimento. A composição do leite difere entre as espécies na porcentagem de seus constituintes, essa variação também pode ser devido a fatores climáticos, estágio de lactação, idade do animal, e de seu próprio genótipo.

O estudo de 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, 2006).

Os polimorfismos gênicos podem se refletir em alteração da função do gene, contribuindo para variações fenotípicas entre os animais. O conhecimento de genes importantes para as características bio-econômicas, no sistema de produção, pode oferecer benefícios à agroindústria (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 seqüência 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 freqüência maior do polimorfismo desejado para a característica.

O uso de marcadores de DNA pode auxiliar o planejamento de estratégias de cruzamento para raças controladas (raças que pertencem a programas de melhoramento), melhorando a composição genética dos rebanhos (BURZYNSKA & TOPEZEWSKI, 1995). A possibilidade de “genotipar” as proteínas do leite e

com isto identificar suas variantes tem permitido a identificação das caseínas bovinas. Existem quatro formas moleculares destas, as quais, têm significativa influência na composição e nas propriedades físico-químicas do leite, são elas: alfa-s₁ caseína (α -s₁), alfa-s₂ caseína (α -s₂), beta caseína (β) e kappa caseína (κ). (MEDRANO & AGUILAR-CORDOVA, 1990).

Os genes das caseínas bovinas compreendem um fragmento de 200Kb, arranjados em seqüências no cromossomo 6 bovino e 7 bubalino na seguinte ordem: α -s₁, β , α -s₂ e κ (LIEN & ROGNE, 1993). Especificamente, o gene da κ -caseína compreende uma seqüência de 13kb dividido em 5 exons (ALEXANDER et al. 1998). Desde a caracterização do gene da κ -caseína de bovinos (ALEXANDER et al. 1998) vários estudos têm sido desenvolvidos, uma vez que, a variante B está associada ao fenótipo superior para características de qualidade do leite, principalmente, na manufatura de queijo.

Em cabra, o gene da alfa-s₁-caseína representa um excelente modelo para a variabilidade observada no conteúdo de alfa-s₁-caseína no leite associado à presença de alelos autossômicos com um simples *locus* estrutural. Assim, ao menos 16 alelos foram identificados e associados a diferentes níveis de expressão da CSN1S1. Descreveram-se os alelos A, B1, B2, B3, B4, C, H, L e M para um alto conteúdo de CSN1S1, os alelos I e E para um intermediário conteúdo de CSN1S1 e os alelos D, F e G para um baixo nível de CSN1S1 no leite (MARTIN, et al. 1999).

MERCIER & GROSCLAUDE (1973) descreveram em torno de 10 variantes para a β -caseína (A1, A2, A3, B, C, D, E, A', A3Mongolie, e B2). Entretanto, apenas A1, A2, A3, e B, estão universalmente distribuídas em todas as populações de *Bos taurus* e *Bos indicus*. As diferenças nos aminoácidos para essas quatro variantes estão localizadas no exon VII deste gene, o qual, codifica 80% da proteína funcional (BONSING et al. 1988). A mutação caracterizando a variante C tem uma freqüência menor que 0,5 e está situada no exon IV (NG-KWAI-HANG et al. 1986).

As duas principais variantes da κ -caseína (A e B) de bovinos diferem nos aminoácidos nas posições 136 e 148. A variante A exibe uma treonina na posição

136 resultante do códon ACC e asparagina na posição 148 (códon GAT), enquanto que, a variante B apresenta isoleucina na posição 136 (códon ATC) e alanina na posição 148 (códon GCT). As substituições nucleotídicas, ocorridas no exon IV do gene, geraram sítios de restrição polimórficos, os quais, podem ser facilmente identificados através de análises de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) (ZADWORNÝ & KUHNLEIN, 1990). Em gado bovino, DAMIANI et al. (1990) identificaram os alelos A e B da κ -caseína com o uso de enzimas de restrição Hind III, Alu I, Hinf I, Mbo II e Taq I.

O polimorfismo da proteína do leite tem sido associado com diferenças na composição, processamento e qualidade do leite (McLEAN, 1987) e também ligado com características de produção (LIN et al., 1986). A kappa-caseína bovina (CSN3K) possui duas variantes genéticas comuns A e B. A variante CSN3K B está associada às propriedades de manufatura e produção de queijos contribuindo apenas com 8 a 10% na composição do mesmo (LIN et al. 1986; McLEAN, 1987).

Em muitos países, ocorreu um aumento da frequência e superioridade do alelo CSN3K B, para o qual, progênies testadas demonstraram genótipos favoráveis para CSN3. Assim, genótipos BB e AB têm sido preferidos em programas de inseminação artificial. Alguns autores identificaram os genótipos de CSN3K por RFLP usando seqüências de cDNA (RANDO et al. 1998; ROGNE et al. 1989; DAMIANI et al. 1990) e por PCR-RFLP em *Bos taurus* (DENICOURT et al. 1990; PINDER et al. 1991).

Justifica-se a busca de marcadores relacionados à produção e qualidade do leite, para a espécie considerada neste trabalho, em função de que, as técnicas de genética molecular aliadas aos procedimentos tradicionais de melhoramento poderão proporcionar maior ganho genético para características de importância econômica, pois, é possível obter indicações do potencial do animal, antes mesmo que este expresse o seu fenótipo. O marcador genético serve para relacionar favoravelmente alelos de características quantitativas e informações sobre o modo de ação gênica individual e suas interações, auxiliando na compreensão da variação quantitativa. Segundo HALEY (1995) os marcadores de DNA apresentam duas possíveis aplicações na seleção animal: as combinações dos melhores

alelos de duas ou mais raças e a seleção dos melhores alelos dentro de uma raça ou linhagem.

A aplicação de marcadores para o estudo da variabilidade pode de maneira aplicada, ser correlacionado com características de produção de leite bem como os constituintes do leite (proteína, gorduras e sólidos totais). Os genes das caseínas, como em bovinos, possuem alelos e genótipos que estão correlacionados favoravelmente para maiores volumes de produção de leite, bem como conteúdos de proteína. Em face de indicações da literatura, vê-se nos genes das caseínas (alfa-s1-caseína, beta-caseína e kappa-caseína), potenciais marcadores para o estudo da variabilidade em búfalos (*Bubalus bubalis*) produtores de leite, e assim, usa-lo como genes candidatos para seleção de fenótipos e genótipos superiores.

Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo verificar a existência de polimorfismos nos genes da alfa-s1-caseína (CSN1S1), beta-caseína (CSN2) e kappa-caseína (CSN3K) em bubalinos e bovinos e analisar sua possível utilização na detecção de mistura de leite na produção de *mozzarella*.

Referência Bibliográfica

ALEXANDER, L.J.; DAS GUPTA, N.A.; BEATTIE, C.W. Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. **Europe Journal Biochemical**, v.178, p.395-401, 1998.

BONSING, J.; RING, J M.; STEWART, A. F.; MACKINLAY, A. G. Complete nucleotide sequence of the bovine beta-casein gene. **Australian Journal Biology Science**, 41(4): 527-37. 1988.

BURZINSKA, B.; TOPZEWSKI, J. – Genotyping of *Bison bonasus* κ -casein gene following DNA sequence amplification. **Animal Genetics**, v.26, p.335-336, 1995.

DAMIANI, G.; PILLA, F.; LEONE, P.; CACCIÒ, S. Direct sequencing and bidirectional allele specific Polimerase Chain reaction of the bovine beta-casein B variant. **Animal Genetics**, v.23, p.561-565, 1990.

DENICOURT, G.; FERRETI, L.; ROGNONI, G.; SGARAMELLA, V. – Restriction fragment length polymorphism analysis of the k-casein locus in cattle. **Animal Genetics**, v.21, p.107-114, 1990.

FERRAZ, A. L.; BORTOLOSSI, J. C.; CURI, R. A.; FERRO, M. I.; FERRO, J. A.; FURLAN, L. R. 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** v.123, n.3, p.208-12, 2006.

HALEY, C.S. – Livestock QTLs – Bringing home the bacon? **Trends Genetics**, v.11, p.488-492, 1995.

LIEN, S.; ROGNE, S. Bovine casein haplotypes number, frequencies and applicability as genetic markers. **Animal Genetics**, v 24, p.373-376, 1993.

LIN, C.Y.; McALLISTER, A.J.; NG-KWAI-HANG, K.F.; HAYES, J.F. – Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.69, p.704-712, 1986.

MARANHÃO, A.M. – Níveis plasmáticos de IGF-I e polimorfismo no gene do GH como possíveis indicadores do potencial produtivo em bovinos. 2000. 38f. **Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal)**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

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

McLEAN, D.M.; - Influence of milk protein variants on milk composition, yield and cheese making properties. **Animal Genetics**, v.18, p.100-102, 1987.

MEDRANO, L.F.; AGUILAR-CORDOVA, E. Genotyping of bovine kappa-casein *loci* following DNA sequence amplification. **Biotechnology**, v.8, p.144-146, 1990.

MERCIER, J.C.; BRIGNON, G.; RIBADEAU-DUMAS, B. – Structure primary of the casein k-B bovine Sequence complete. **Europe Journal Bichemical**, v.35, p. 222-235, 1973.

NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein Friesian cows. **Journal Dairy Science**, v.69, p.22–26, 1986.

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

RANDO, A.; Di GREGORIO, P.; RAMUNNO, L.; MARIANI, P.; RIORELLA, A.; SENESE, C.; MARLETTA, D.; MASINA, P. Characterization of the CSN1A^G allele of the bovine α_{s1} -casein locus by insertion of the a relict of a long interspersed element. **Journal Dairy Science**, v.81, p.1735-1742, 1998.

ROGNE, S.; LIEN, S.; VEGARUD, G.; STEINE, T.; LANGSRUD, T.; ALESTROM, P. – A method of k-casein genotyping of bulls. **Animal Genetics**, v.20, p. 317-321, 1989.

ZADWORNY, D.; KUHLEIN, U. – The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoroly Applied Genetics**, v.80, p.631-634, 1990.

CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA ALFA-S1-CASEÍNA EM BUBALINOS E BOVINOS

Resumo

O estudo das proteínas do leite tem envolvido várias espécies como a bovina, bubalina, caprina e ovina, com interesse em conhecer a variabilidade genética existente entre e dentro das diferentes raças. Nos últimos anos, têm-se buscado correlacionar variantes polimórficas de genes candidatos com a produção de leite e seus constituintes. As caseínas constituem a maior parte das proteínas do leite, as quais, se dividem em quatro tipos: alfa-s₁ caseína (α -s₁), alfa-s₂ caseína (α -s₂), beta caseína (β) e kappa caseína (κ). O presente estudo objetivou caracterizar por seqüenciamento e PCR-RFLP o gene da alfa-s1-caseína em búfalas e em bovinos de diferentes raças. No total, foram analisadas 510 amostras de sangue sendo, 150 de búfalas da raça Murrah e 60 de cada raça bovina (Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suíço, Guzerá e Jersey). Um fragmento de 954 pb do gene da CSN1S1, compreendido no intron VIII, exon IX e intron IX, foi caracterizado pelo seqüenciamento realizado em 28 amostras, perfazendo um total de 4 amostras para cada grupo genético considerado. Caracterizou-se o alelo A e identificou-se SNPs entre as seqüências nucleotídicas de búfalos e de bovinos. No entanto, a técnica de PCR-RFLP *Alu* I e *Hinf* I não identificaram polimorfismo, caracterizando o alelo A para todos os animais estudados.

Palavras-chave: Marcadores Moleculares, Proteínas do Leite, CSN1S1.

CHAPTER II - ALFA-S1-CASEIN GENE DESCRIBED IN *Bubalus bubalis*, *Bos taurus* AND *Bos indicus*.

Abstract

The study in milk proteins involve many species as: bovine, buffaloes, caprine and ovine, on intent to know the existence of genetic variability between different breeds. In recent years, researches are trying to relate polymorphic variables of candidate genes with milk yield and its constitution. Caseins are the major component of milk protein, and are subdivided in 4 types: alfa-s₁ casein (α -s₁), alfa-s₂ casein (α -s₂), beta casein (β) e kappa casein (κ). This study was carried on intent to characterize the α -s₁ casein gene by sequencing and PCR-RFLP, in buffaloes and bovine of different breeds. It was evaluated 510 blood samples, where: 150 from female Murrah buffaloes and 60 from each bovine breed (Holstein, Gir, Girolando, Brown Swiss, Guzerá and Jersey). A fragment with 954 bp of CSN1S1 gene, corresponding to intron VIII, exon IX and intron IX was characterized by sequencing of 28 samples, in a total of 4 samples by genetic group considered. It was found allele A at the study region and, in nucleotide sequences, were identified SNPs in both buffaloes and bovine samples. However, PCR-RFLP *Alu* I and *Hinf* were not efficient to identify polymorphisms, showing only the A allele in all animals studied.

Palavras-chave: Molecular Markers, Milk Proteins, CSN1S1.

Introdução

O interesse no estudo focando as proteínas do leite envolve várias espécies como a bovina, bubalina, caprina e ovina, para se conhecer a variabilidade genética existente. Nas últimas décadas a comunidade científica tem colocado uma atenção maior para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento das diferentes características produtivas. Polimorfismos das proteínas do leite em raças bovinas foram caracterizadas, principalmente, na Europa e América do Norte, incluindo populações em risco de extinção (CERIOTTI et al. (2004).

O estudo da variabilidade das proteínas do leite iniciou-se há mais de 50 anos com a β -lactoglobulina, descrevendo suas variantes. Nos últimos anos, devido ao desenvolvimento de novas técnicas de biologia molecular um novo impulso tem sido dado nestas investigações, não somente para identificar polimorfismos, mas também para estudar a influência dessas variantes na produção de leite e seus constituintes (MEDRANO & AGUILLAR-CORDOVA, 1990; DAMIANI et al. 1992; DAVID & DEUTCH, 1992; BARROSO et al. 1999; JANN et al. 2002).

Em bovinos os genes das caseínas estão localizados no cromossomo 6 estendendo-se por uma região de 200 kb (FERRETI et al. 1990; THREADGILL & WOMACK, 1990) e foram associados a diferenças na produção, composição e processamento do leite (McLEAN, 1987; LIEN & ROGNE, 1993).

Em cabras BEVILACQUA et al. (2002) identificaram os alelos CSN1S1 (01 e 02) e constataram que seu efeito era correlacionado com ausência da proteína alfa-s1-caseína no leite das cabras com genótipos CSN1S1 01 e 02. Outros autores descreveram em cabras diferentes alelos, os quais, expressam diferentes níveis de proteínas que foram associados a qualidade e processamento do leite para a produção de queijos (BRAWERMAN, 1976; JANSÀ PÉREZ, et al. 1994; LIN, et al. 1986; McLEAN, 1987; NG-KWAI-HANG, et al. 1984 e NG-KWAI-HANG, et al. 1986).

Para os búfalos (*Bubalus bubalis*) informações sobre o gene CSN1S1 são inexistentes na literatura e pouco se conhece deste nas raças zebuínas que

compõem os bovinos mestiços produtores de leite no Brasil, justificando-se, assim, a realização deste trabalho.

Objetivo

O presente estudo teve por objetivo verificar a existência de polimorfismos nos genes da alfa-s1-caseína (CSN1S1) em bubalinos e bovinos e analisar sua possível utilização na detecção de mistura de leite na produção de *mozzarella*.

Material e Métodos

1. Amostra

1.1. Origem dos animais

As búfalas pertencem a Fazenda Santa Eliza, município de Dourado-SP. Os animais da raça Holandesa pertencem ao Setor de Bovinocultura de Leite da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV – UNESP, os da raça Gir são pertencentes à Epamig (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), Uberada - MG, os da raça Girolando e Jersey à APTA Regional Centro Leste, Ribeirão Preto – SP, da raça Pardo-Suíço ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa – SP, os da raça Guzerá ao rebanho da Fazenda Lajeado, na cidade de Sales Oliveira – SP.

As amostras de sangue foram obtidas de 150 búfalas da raça Murrah e seus mestiços, que fazem parte do programa de controle leiteiro de bubalinos mantidos pelo Departamento de Zootecnia da Unesp/Jaboticabal, SP. Para bovinos foram coletadas um total de 360 amostras (60 de cada raça) das seguintes raça Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suíço, Guzerá e Jersey as quais representam as raças ligadas à produção de leite do país.

Foram colhidos 5 mL de sangue de cada animal por venopunção da veia mamária, utilizando-se tubos *vacutainer* B&D® contendo 7,5 mg de EDTA. Os tubos foram identificados com a numeração de cada animal e mantidos a 4° C.

2. Metodologia

2.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído da fase leucocitária, conforme metodologia descrita por ZADWORNÝ & KUHNLEIN (1990).

Após descongelar as amostras, foram aliqüotados 1000µL de sangue de cada amostra em tubos *ependorf* de 2mL. Foram adicionados 40µL de Nonidet P-40 (12,5%) em cada tubo completando-se em seguida o volume com TKM-1. Cada tubo foi então vigorosamente agitado em vortex seguindo então para centrifugação por 15 min a 10600 x g / 28°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante de cada amostra foi descartado, adicionaram-se 1000µL de TKM-1 [Tris-HCl (1M) pH 7,6; KCl (1M) e EDTA (0,1M) pH 8,0], agitou-se novamente em vortex até dissolver o *pellet*, completou-se novamente o volume e centrifugou-se por mais 10 minutos a 10600 x g / 28°C. Este procedimento foi repetido até a obtenção de um *pellet* de coloração clara.

Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 1000µL de TKM2 [Tris-HCl (1M) pH 7,6; KCl (1M); EDTA (0,1M) pH 8,0 e NaCl (1M)] + 100µL de SDS10%, agitando-se em seguida as amostras vigorosamente em vortex até dissolução total do *pellet*. As amostras foram então levadas ao banho-maria a 55°C por uma hora. Após este período adicionou-se 400µL de NaCl 6M por amostra, agitando-se vigorosamente em vortex e centrifugando a 14840 x g por 20 minutos /4°C.

Após esta etapa, foram aliqüotados 1000µL do sobrenadante de cada amostra e transferido para tubos novos (2,0mL). Adicionaram-se então 1000µL de etanol absoluto (gelado), misturando por inversão vagarosamente cada amostra. As amostras foram então centrifugadas a 14840 x g 15 minutos /4°C, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 1000µL de etanol 70% (gelado) seguindo de nova centrifugação a 14840 x g 5 minutos /4°C. O sobrenadante foi descartado, as amostras foram secadas por inversão sobre papel absorvente por aproximadamente 2 horas e o DNA foi ressuspenso em 100µL de TE [Tris-HCl

(1M) pH 8,0 e EDTA (0,1 M) pH 8,0] 10:1, sendo então levado ao agitador a 265 x g *overnight*.

2.2. Reação de amplificação e DNA por PCR

Realizaram-se testes preliminares de PCR objetivando-se a otimização das quantidades de reagentes para a amplificação do fragmento para o gene da alfa-s1-caseína, a seqüência dos iniciadores podem ser visualizadas na Tabela 1. As amplificações foram realizadas num volume final de 25 µL, contendo 100 ng das amostras de DNA, 0,5 uM de cada iniciador, 1 X PCR “buffer” [Tris-HCl (10 mM) pH 9,0 e 50 mM KCl], 1,5 mM MgCl₂, 100 uM de dNTPS e 0,5 U de Taq DNA polimerase.

Tabela 1 – Seqüências dos pares de bases dos iniciadores para os genes das caseínas.

Iniciador	Seqüência de bases do iniciador
ALFA 900 F	5'-ATGTTGGGCACCTACTGAC-3'
ALFA I8 R	5'- GGATAGAGCTACATACATAGT-3'

As condições para a obtenção de amplificação dos fragmentos a serem estudados seguiram a programação em termociclador modelo PTC-100 MJ[®]: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos (95°C por 60 segundos; 49°C por 60 segundos; 72°C por 60 segundos) e 72°C por 5 minutos finais.

Na etapa seguinte, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com brometo de etídio (0,05 µg/mL) a 100V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Logic (Kodak[®]).

Na Figura 1, visualiza-se o esquema do gene da alfa-s1-caseína e a região estudada pelos marcadores ALFA 900 F e ALFA I8 R.

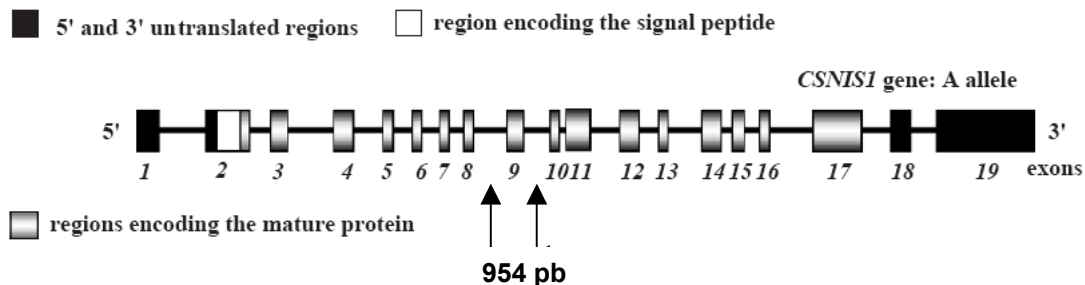


Figura 1 – Esquema do gene da alfa-s1-caseína (CSN1S1), e a região estudada de 954 pb compreendida no intron VIII até o intron IX parcial, com os oligonucleotídeos ALFA 900 F e ALFA 18 R.

2.3. Seqüenciamento do fragmento amplificado do gene da CSN1S1

O fragmento amplificado do gene da alfa-s1-caseína da raça bubalina Murrah (4 amostras) e de cada raça bovina (4 por raça, perfazendo um total de 24 amostras), foram clonados em vetor T (*p-GEM-T Easy Vector System*, Promega®) no sítio de corte da enzima de restrição *EcoRI*. A reação de ligação do produto de PCR ao vetor constituiu-se de 1 µL de T4 DNA ligase (3 U/µL), 2 µL de tampão de T4 DNA ligase 1X, 1 µL do pGEM-T e aproximadamente 200 ng do produto amplificado, para uma reação final de 10 µL. Esta reação permaneceu em termociclador a 4°C por 16 horas.

Após a ligação, os plasmídios (vetores) foram inseridos por transformação em células “competentes” de *Escherichia coli* linhagem DH10B. Nesse processo, 10 µL do material ligado foram adicionados a 200 µL de células “competentes” em tubo de 1,5 mL estéril e incubados no gelo por 30 minutos, seguindo-se de incubação em banho-maria por 90 segundos a 42°C, e novamente incubação no gelo por 2 minutos.

Em seguida, as células foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e foram adicionados 800 µL de meio SOC [128,4 µL KCl 2M; 100 µL MgSO₄ 1M; 100 µL Mg Cl₂ 1M; 200 µL de glicose 1M; 10 mL de meio LB 2X] com posterior incubação por 1 hora a 37°C com agitação de 110 rpm.

Após esse período, foram feitas culturas dessas bactérias semeando 100 µL das células em placa de Petri contendo meio LB sólido [2g de Triptona; 1g de Extrato de Levedura; 1g de NaCl; 1,5g de Ágar; água Mili-Q suficiente para

completar o volume de 100 mL] suplementado com 50 μ L de ampicilina (100.000 mg/mL) por, aproximadamente, 16 horas à 37°C, para posterior seleção de colônias transformadas. Sobre o meio de cultura das placas de Petri, espalharam-se, previamente, 70 μ L de X-Gal (50 mg/mL).

As colônias transformantes foram coletadas com palitos estéreis e transferidas para microplacas com 96 poços, contendo 100 μ L de meio LB líquido [2g de Triptona; 1g de Extrato de Levedura; 1g de NaCl; água Mili-Q suficiente para completar o volume de 100 mL] suplementado com 50 μ L de ampicilina (100.000 mg/mL). As placas foram seladas e mantidas na estufa à 37°C por 22 horas. Posteriormente, aos clones foram adicionados 100 μ L de glicerol 40% para estocagem dos mesmos em freezer -80°C. Alíquotas de 10 μ L foram retidas das culturas e adicionadas a 1 mL de meio LB líquido com 50 μ L de ampicilina em novas microplacas de 96 poços, seguindo de incubação à 37°C por 16 horas em placa agitadora. Essas culturas foram utilizadas na minipreparação de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al. 1989).

Após a extração do DNA plasmidial, foi feita a confirmação da inserção dos fragmentos nos vetores, em uma reação de digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen®). Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM, pH 8,3) com brometo de etídio (0,05 μ /mL) a 75V, por aproximadamente 2 horas. A visualização foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Logic (Kodak®).

Para cada um dos pares de iniciadores foram selecionadas 3 amostras (repetições). Os fragmentos clonados foram seqüenciados a partir das extremidades 5' e 3' utilizando o kit *BigDye™ Terminator Cycle Sequence Ready ABI Prism Versão 3* em seqüenciador automático *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer* (PE Applied Biosystems®) totalizando 18 amostras a serem seqüenciadas. As reações de seqüenciamento foram feitas em microplacas utilizando-se 0,5 μ L dos terminadores Big Dye, 100 ng de DNA plasmidial, 10 pmoles dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de interesse, 3,5 μ L de tampão 2,5X (400

mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl₂) , completando-se o volume da reação com H₂O milli-Q estéril para 10 µL.

A reação do sequenciamento foi realizada em termociclador de acordo com a seguinte programação: 35 ciclos de 96°C por 10 segundos, 52°C por 5 minutos, 60°C por 4 minutos. Ao final do programa as amostras permaneceram a 4°C até serem retiradas do aparelho. Após o término da reação, foram adicionados às amostras 80 µL de isopropanol 75%, sendo as mesmas agitadas levemente. Em seguida, as amostras permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos, sendo posteriormente centrifugadas a 4240 x g por 30 minutos a 20°C. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e as placas foram invertidas em papel absorvente por 5 minutos. Foram adicionados às placas 200 µL de etanol 70% seguindo-se de centrifugação a 4240 x g por 10 minutos à 20°C. Esta última operação foi repetida por mais uma vez e as amostras foram secas em bomba a vácuo por 5 minutos. Depois desse período, as mesmas foram ressuspensas com 9 µL de Hi-Di Formamide e desnaturadas a 95°C por 5 minutos. O sequenciamento foi realizado em seguida no equipamento *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer* (PE Applied Biosystems). O programa *Sequencing Analysis 3.4* gerou os eletroferogramas e o *software* CodonCode Aligner® *trial-version1.4.6* foi utilizado para conformação e caracterização das seqüências de DNA.

As seqüências de DNA obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos com seqüências depositadas no GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Após as consultas de similaridades, as seqüências foram então analisadas com o *software* p-Draw, no intuito de melhor visualizar os fragmentos localizado nos mesmos os sítios de clivagem das endonucleases de restrição utilizadas nas análises de PCR-RFLP.

2.4. Técnica de PCR-RFLP

O fragmento do gene da alfa-s1-caseína, amplificado a partir dos iniciadores (Tabela 1), foi submetido à técnica de PCR-RFLP, pelas

endonucleases *Alu I* e *Hinf I*. Na Tabela 2, está indicado às seqüências de clivagem.

Tabela 2 – Sítio de clivagem das endonucleases de restrição utilizadas para a técnica de PCR-RFLP nos fragmentos dos genes das caseínas.

ENDONUCLEASE	POSIÇÃO DE CLIVAGEM 5'-3' e 3'-5'	
Alu I	5'-AG↓CT-3'	3'-TC↑GA-5'
Hinf I	5'-G↓ANTC-3'	3'-CTNA↑G-5'

As amostras totais de todos os animais estudados foram digeridas por 1 hora à 37°C em termocicladores PTC-100 MJ Research®. Após esta etapa, 10 µL de cada uma das amostras digeridas foram submetidas à eletroforese, em gel de agarose (3%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com brometo de etídio (0,05 µ/mL) a 100V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. A visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel fotodocumentado em aparelho Gel-Logic (Kodak®).

2.5. Detecção de SNPs

Com o seqüenciamento dos nucleotídeos do gene da CSN1S1 realizou-se o Blast - N de todas as seqüências, de búfalos e bovinos para a identificação dos SNPs. O procedimento verificou a existência de SNPs, entre os búfalos, e entre búfalos com bovinos das raças estudadas.

2.6. Análise Estatística

Cálculo das freqüências gênicas e genotípicas

a) Freqüência gênica

As freqüências gênicas (xi) para o alelo da alfa-s1-caseína (i), e genotípicas para o genótipo (ii), serão estabelecidas para a população, pelas Equações 1 e 2:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n} \quad [\text{Eq. 1}]$$

$$x_{ii} = \frac{n_{ii}}{n} \quad [\text{Eq. 2}]$$

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

b) Teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

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

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + x_j^2 \quad [\text{Eq.3}]$$

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

Resultados e Discussão

1. Reação de amplificação de DNA por PCR

Através da reação de PCR, com os iniciadores (Tabela 1), permitiram a amplificação dos fragmentos dos genes das caseínas, os quais podem ser visualizados na Figura 2.

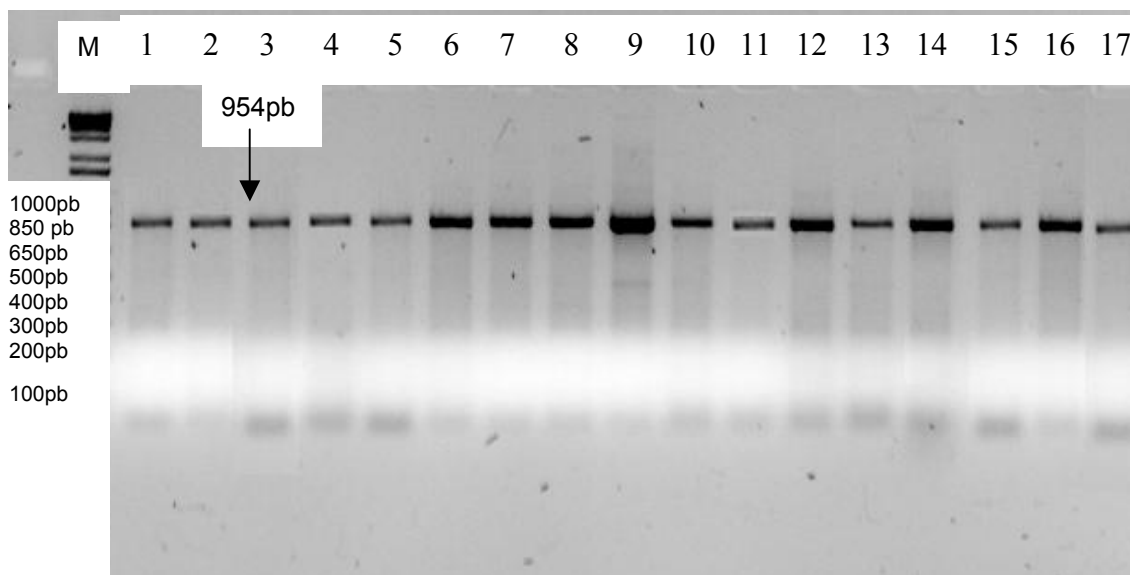


Figura 2 - Eletroferograma (gel de agarose a 1,5%) da amplificação do fragmentos do gene da CSN1S1, com 954pb, pela técnica de PCR. Amostras de 1 a 5, é de CSN1S1 bubalino, de 6 a 17 é de CSN1S1 bovino, com 2 amostras para cada raça bovina estudada (Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suiço, Guzerá e Jersey) . M é o marcador de peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder e C controle não digerido de 954 pb.

2. Seqüenciamento do fragmento amplificado do gene da CSN1S1 em búfalas e bovinos leiteiros.

As leituras das seqüências de nucleotídeos do fragmento amplificado pelos iniciadores para o gene da alfa-s1-caseína (Tabela 1), foram então alinhadas e editadas com o *software* CodonCode Aligner® em uma só seqüência final (*contig*), enviada então ao BLAST-n para confirmação e identificação da similaridade com outras espécies.

As seqüências obtidas neste trabalho realmente codificam para o gene da alfa-s1-caseína na espécie *Bubalus bubalis*, pois houve alta similaridade das mesmas com aquelas já descritas na literatura. A comparação realizada entre as seqüências de nucleotídeos dos 4 animais bubalinos realizada pela ferramenta Blast-n, não caracterizou SNPs. No entanto, o mesmo procedimento de comparação da seqüência nucleotídica de bubalinos com as seqüências bovinas, totalizando 24 amostras, permitiu caracterizar SNPs no fragmento de 954 pb, compreendido entre o intron VIII e intron IX do gene da CSN1S1 (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados obtidos para similaridade de seqüências do fragmento amplificado do intron VIII, exon IX e intron IX do gene da alfa-s1-caseína bubalina com raças bovinas. A 1ª letra corresponde ao nucleotídeo bubalino e a 2ª corresponde ao nucleotídeo bovino.

RAÇAS BOVINAS						
POSIÇÃO 5'-3'	HOLANDESA	GIR	GIROLANDO	PARDO-SUIÇO	GUZERÁ	JERSEY
20	T-C	T-C	T-C	T-C	T-C	T-C
49	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A
55	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T
63	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T
69	C-A	C-A	C-A	C-A	C-A	C-A
71	A-T	A-T	A-T	A-T	A-T	A-T
80	G-T	G-T	G-T	G-T	G-T	G-T
85	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T
92	C-G	C-G	C-G	C-G	C-G	C-G
112	G-T	G-T	G-T	G-T	G-T	G-T
118	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T
126	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A
133	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A
147	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A
151	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A
157	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A
160	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A
168	C-G	C-G	C-G	C-G	C-G	C-G
173	G-T	G-T	G-T	G-T	G-T	G-T
188	A-G	A-G	A-G	A-G	A-G	A-G
205	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A
218	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A
235	T-C	T-C	T-C	T-C	T-C	T-C
277	A-C	A-C	A-C	A-C	A-C	A-C
290	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A
298	A-G	A-G	A-G	A-G	A-G	A-G
304	A-G	A-G	A-G	A-G	A-G	A-G
314	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A
321	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T
338	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T
419	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T
427	T-G	T-G	T-G	T-G	T-G	T-G
438	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A
440	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A	G-A
443	A-G	A-G	A-G	A-G	A-G	A-G
470	A-G	A-G	A-G	A-G	A-G	A-G
584	A-T	A-T	A-T	A-T	A-T	A-T
592	C-A	C-A	C-A	C-A	C-A	C-A
700	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T	C-T
701	C-A	C-A	C-A	C-A	C-A	C-A

3. Técnica de PCR-RFLP

O fragmento de 954 pb amplificado do intron VIII, exon IX e intron IX do gene da alfa-s1-caseína (CSN1S1), de todos os animais estudados tanto búfalas como bovinos foi submetido à digestão pelas endonucleases de restrição *Hae* III e *Hinf* I. As reações de digestão do fragmento do gene da beta-caseína bubalina digerido pela endonuclease de restrição *Hae* III, que reconhece a seqüência:

5'...GG↓CC...3' / 3'...CC↑GG...5', gerou fragmentos de 651 e 303 pb respectivamente, conforme mostrado na Figura 3.

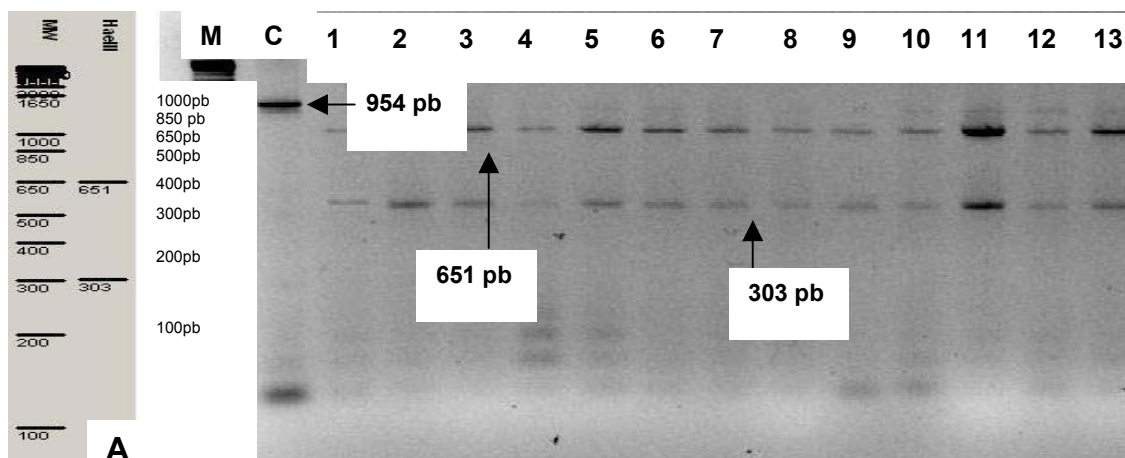


Figura 3 – **A** – Eletroferograma virtual com os tamanhos dos fragmentos gerados pela enzima *Hae* III. **B** - Eletroferograma (gel de agarose a 3,5%) do fragmento de 954 pb do VIII intron, IX exon e IX intron do gene da alfa-s1-caseína pela enzima *Hae* III. Amostras de 1 a 7, é de CSN1S1 bubalino, de 8 a 13 é de CSN1S1 bovino (Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suíço, Guzerá e Jersey). M é o marcador de peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder e C controle não digerido de 954 pb.

Pela técnica de PCR-RFLP com a endonuclease de restrição *Hae* III, não foi possível detectar polimorfismo, e assim todos os animais estudados, tanto em bubalinos como em bovinos, apresentaram os mesmos tamanhos de fragmentos (Figura 3). O alelo identificado para o gene da alfa-s1-caseína foi do tipo A, com homozigose de 100% para AA.

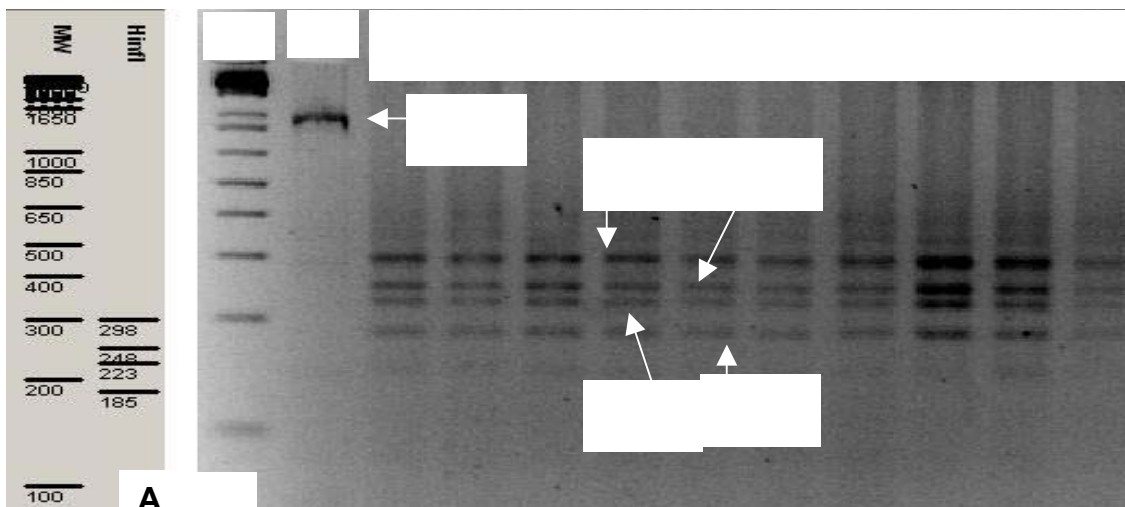


Figura 4 - **A** – Eletroferograma virtual com os tamanhos dos fragmentos gerados pela enzima *Hinf* I. **B** - Eletroferograma (gel de agarose a 3,5%) do fragmento de 954 pb do VIII exon, IX intron e IX exon do gene da alfa-s1-caseína pela enzima *Hinf* I. Amostras de 1 a 4, é de CSN1S1 bubalino, de 5 a 10 é de CSN1S1 bovino (Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suiço, Guzerá e Jersey). M é o marcador de peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder e C controle não digerido de 954 pb.

Com a endonuclease de restrição *Hinf* I em todos os animais estudados, tanto bubalino como bovinos observou-se apenas o alelo A e o genótipo AA. A restrição liberou fragmentos de 298, 248, 223 e 195 pb, visualizado na Figura 4.

NG-KAWAI-HANG et al. (1984), estudaram vacas em lactação em 63 fazendas na região de Quebec, para o gene da alfa-s1-caseína e identificaram os alelos A, B e C, com freqüências de 0,003, 0,97 e 0,027, respectivamente. Os resultados obtidos pela caracterização do alelo a do gene CSN1S1 no presente trabalho, corroboram parcialmente em relação aos resultados obtidos pelos autores acima citados,

A homozigose caracterizada na região estudada compreendida entre o intron VIII, exon IX e intron IX, pode ser explicada pela hipótese, que no processo evolutivo, o alelo A, de alguma maneira, conferiu vantagens para adaptabilidade da espécie bubalina. Ou essa falta de variabilidade na região estudada do gene da CSN1S1, pode ser por que os pontos de alterações existentes dentro dos exons e introns estudados, não coincidam com os pontos de restrição pelas endonucleases utilizadas na investigação de polimorfismos, para a raça bubalina Murrah e para as raças Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suiço, Guzerá e Jersey.

A ocorrência de polimorfismo nos genes responsáveis por produção de uma determinada proteína, quer ela, seja estrutural ou de efeito enzimático, pode

ocasionar ou não alterações na seqüência de aminoácidos. Se a mutação ocorrida alterar de tal forma a seqüência de bases nucleotídicas, esse evento modifica o aminoácido na cadeia polipeptídica. MARTIN, et al. (2002) revisando o polimorfismo dos genes das caseínas em ruminantes, ligados a características de produção de leite, relataram que os polimorfismos que possam existir em elementos regulatórios, na região 5' flanqueadora, influenciam diretamente na taxa de expressão dos genes.

Alterações nessas regiões responsáveis pelos fatores pós-transcrição, ou dentro de exons e introns, demonstram responsabilidade por defeitos no processamento de transcritos primários e até mesmo a exposição do mRNA no citoplasma. MARTIN et al. (1999), relataram que mutações responsáveis pela ocorrência de *stop* codon prematuro no gene da CSN1S1, em cabras, podem ocasionar um efeito biológico drástico como: defeitos na via de secreção da proteína, alterações na estrutura das micelas das caseínas, conteúdo de gordura, etc, por modificação da mensagem da estrutura primária da proteína bem como na sua expressão. Essas variações ocorridas nos genes das caseínas podem ocasionar um efeito nas propriedades tecnológicas do leite, desde a produção de queijos, bem como as características organolépticas.

STEWART et al, (1987), compararam as seqüências completas dos nucleotídeos dos genes da CSN1S1 de várias espécies de mamíferos, avaliando a conservação das seqüências dos genes das caseínas. Verificaram que têm ocorrido muitas substituições de nucleotídeos durante a divergência dos genes das caseínas, poderiam ser por eventos de deleção, inserção ou rearranjos, com um exemplo clássico a CSN1S1 e CSN1S2 (STEWART et al. 1984). Essa variação na seqüência de nucleotídeo do gene da CSN1S1 foi observada entre os bubalinos da raça Murrah com o mesmo gene das raças bovinas Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suíço, Guzerá e Jersey, verificando assim muitos pontos de substituição de nucleotídeos, mas que possivelmente, não alteram na seqüência de aminoácido devido à região estudada ser compreendida entre os introns VIII e IX, e no exon IX, o qual possui apenas 15 bases.

A variante A caracterizada no presente estudo para o gene da CSN1S1, não condiz com os resultados descritos por CERIOTTI, et al. (2004), que genotiparam para o gene da CSN1S1, em taurinos criados em clima quente localizados na África e Itália (Somba, Lagune e Modicana), zebuínos (Sudanese Zebu Peul, Azaouak e Adamawa) e cruzados de taurino x zebuíno (Borgou). Em taurinos descreveram o alelo B para o gene da CSN1S1 com frequência entre 0.51 e 1, em zebuínos caracterizaram-se com maior frequência do alelo C variando entre 0,56 e 0.75, e o alelo G foi detectado apenas em taurinos da raça Modicana com frequência de 0,02. Os autores descreveram que esses alelos estavam ligados a um baixo conteúdo de proteína no leite (RANDO et al. 1998), o fato de não caracterizarem o alelo A, o qual foi descrito para bubalinos da raça Murrah e bovinos leiteiros, pode ser devido à hipótese ligada à seleção aos quais as populações estudadas no presente trabalho, estão inseridas, visto que, o alelo A está ligado à com conteúdo de proteína no leite.

Na raça Kuri, MAHE et al. (1999) observaram a presença intermediária do alelo da alfa-caseína B como sendo a mais frequente em taurinos, não condizendo em relação ao alelo A caracterizado para os bubalinos da raça Murrah e bovinos no gene da alfa-s1-caseína.

A caracterização do alelo A na região estudada do gene da CSN1S1 em búfalos e bovinos, descrito pelo seqüenciamento e a técnica de PCR-RFLP *Hae* III e *Hinf* I, indica que possivelmente o gene no processo evolutivo não sofreu alterações. Assim, tem-se a necessidade de investigações de outras regiões do mesmo gene, em outras populações e raças de bubalinos e bovinos, com um maior número de animais, buscando assim traçar um perfil gênico e genotípico e suas frequências dos animais.

Conclusão

Para a região estudada do gene CSN1S1 compreendida entre os introns VIII e IX, e no exon IX, nos búfalos e bovinos, caracterizou-se apenas o alelo A,

caracterizando monomorfismo e impossibilitando a utilização deste gene como indicador de mistura de leite na produção de queijo *mozzarella*.

Os SNPs observados na seqüência de nucleotídeo dos bubalinos em relação ao bovinos indicam possibilidades de inferências sobre diferenças na expressão do gene.

Referências Bibliográficas

BARROSO, A., DUNNER, S.; CANON, J. A multiplex PCR-SSCP test to genotype bovine beta-casein alleles A¹, A², A³, B and C. **Animal Genetics**, v.30, p.322-323, 1999.

BEVILACQUA, C.; FERRANTI, P.; GARRO, G.; VELTRI, C.; LAGONIGRO, R.; LEROUX, C.; PEITROLÀ, E.; ADDEO, F.; PILLA, F.; CHIANESE, L.; MARTIN, P. Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new α_{s1} -casein variant found in the goat species. **Europe Journal Biochemical**, v.269, p.1293-1303, 2002.

BRAWERMAN, G. Characteristic and significance of the polyadenylase sequence in mammalian messenger RNA. **Progress Nucleic Acid Research Molecular Biology**, v.17, p.117-148, 1976.

CERIOTTI, G.; CHESSA, S.; BOLLA, P.; BUDELLI, E.; BIANCHI, L.; DURANTI, E.; CAROLI, A. Single nucleotide polymorphisms in the ovine casein genes detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. **Journal Dairy Science**, v.87, n.8, p.2606-2613, 2004.

DAMIANI, G.; PILLA, F.; LEONE, P.; CACCIÒ, S. Direct sequencing and bidirectional allele specific Polimerase Chain reaction of the bovine beta-casein B variant. **Animal Genetics**, v.23, p.561-565, 1992.

DAVID, V.A.; DEUTCH, A.H. Detection of bovine α_{s1} -casein genomic variants using the allele-specific polymerase chain reaction. **Animal Genetics**, v.23, p.425-429, 1992.

FERRETTI, L.; LEONE, P.; SGARAMELLA, V. Long range restriction analysis of the bovine casein genes. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6829–6833, 1990.

JANN, O.; PRINZENBERG, E.M.; BRANDT, H.; WILLIAMS, J. L.; AJMONE-MARSAN, P.; ZARAGOZA, P.; ZBEYAZ, C. O.; ERHARDT, G. Intragenic haplotypes at the bovine *CSN1S1* locus. **Archive Tierz Dummerstorf**, v.45, p.11–19, 2002.

JANSÀ PÉREZ , M.J.; LEROUX, C.; SANCHEZ BONSTRE, A.; MARTIN, P. Occurrence of a LINE sequence in the 3'UTR of the α_{s1} -casein E encoding allele associated with a reduce protein synthesis level. **Gene**, v.147, p.177-179, 1994.

LIEN, S.; ROGNE, S. Bovine casein haplotypes number, frequencies and applicability as genetic markers. **Animal Genetics**, v.24, p.373-376, 1993.

LIN, C.Y.; McALLISTER, A.J.; NG-KWAI-HANG, K.F.; HAYES, J.F. – Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.69, p.704-712, 1986.

MAHE, C.; CHEVRET, S. Estimating regression parameters and degree of dependence for multivariate failure time data. **Biometrics**, v.55, n.4, p.1078-1084, 1999.

MARTIN, P.; OLLIVIER-BOUSQUET, M.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of casein: a tool to investigate casein micelle organization. **International Dairy Journal**, v.9, p.163-171, 2002.

McLEAN, D.M.; - Influence of milk protein variants on milk composition, yield and cheese making properties. **Animal Genetics**, v.18, p.100-102, 1987.

MEDRANO, L.F.; AGUILAR-CORDOVA, E. Genotyping of bovine kappa-casein *loci* following DNA sequence amplification. **Biotechnology**, v.8, p.144-146, 1990.

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

NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein Friesian cows. **Journal Dairy Science**, v.69, p.22–26, 1986.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, and T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd Ed.). **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY**. 1989.

STEWART, A. F.; BONSING, J.; BEATTIE, C. W.; SHAH, F.; WILLIS, I. M.; MACKINLAY, A. G. Complete nucleotide sequences of bovine alfa-s2-casein and beta-casein cDNAs: comparisons with related sequences in other species. **Molecular Biology Evolution**, v.4, n.3, p.231-241, 1987.

STEWART, A. F.; WILLIS, I. M.; MACKINLAY, A. G. Nucleotide sequence of bovine alfa-s1- and kappa-casein cDNAs. **Nucleic Acids Research**, v.12, p.3895-3907, 1984.

THREADGILLI, D. W.; WOMACK, J. E. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6935–6942, 1990.

ZADWORNÝ, D.; KUHLEIN, U. – The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoroly Applied Genetics**, v.80, p.631-634, 1990.

CAPÍTULO III - POLIMORFISMOS NOS GENES DAS CASEÍNAS – BETA E KAPPA- EM BUBALINOS E BOVINOS.

Resumo

Por apresentarem associação com a produção, qualidade e processamento do leite, os genes das caseínas passaram a ter maior atenção para estudo com marcadores moleculares nas espécies de mamíferos utilizadas comercialmente. Assim, objetivou-se caracterizar polimorfismos nos genes da beta-caseína (CSN2) e kappa-caseína (CSN3K) em bubalinos da raça Murrah e bovinos das raças Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suíço, Guzerá e Jersey. No total, foram analisadas 510 amostras de sangue sendo, 150 de búfalas da raça Murrah e 60 de cada raça bovina (Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suíço, Guzerá e Jersey). Foram seqüenciadas 28 amostras para cada gene, perfazendo um total de 4 amostras para cada grupo genético considerado, obtendo-se um fragmento de 495 pb do gene CSN2 e um fragmento de 373 pb do gene CSN3K. Nos genes CSN2 e CSN3K identificaram-se SNPs por meio do seqüenciamento. No gene CSN2 a técnica de PCR-RFLP *Hae* III e *Hinf* I aplicada nas amostras bubalinas mostrou monomorfismo do alelo A1. Em bovinos identificaram-se os alelos A1 e A2 com freqüências variadas caracterizada pela enzima *Hae* III. A técnica de DNA-SSCP no gene CSN2 caracterizou os alelos A1 e B nos búfalos, e A2 e B nos bovinos. No gene CSN3K a técnica de PCR-RFLP *Alu* I em búfalos não identificou polimorfismo, caracterizando apenas o alelo B, confirmado pela técnica de DNA-SSCP. Em bovinos a enzima *Hind* III identificou os alelos A e B com freqüências variadas. A variação no gene CSN2 avaliada pela técnica de PCR-RFLP *Hae* III indica que os polimorfismos observados em bovinos e bubalinos podem ser utilizados para identificar misturas de leite na manufatura do queijo *mozzarella*.

Palavras chaves: Marcadores Moleculares, CSN2, CSN3K, Proteínas do Leite.

CHAPTER III - POLYMORPHISM IN BETA AND KAPPA CASEIN GENES OF BUFFALOES AND BOVINE

Abstract

Due to showing association with production, quality and milk processing, casein genes had more attention for studies with molecular markers in mammalian species with economical importance. So this study was aimed on characterize polymorphisms in beta-casein (CSN2) and kappa-casein (CSN3K) genes from Murrah buffaloes and bovine of breeds: Holstein, Brown Swiss, Jersey, Gir, Girolando and Guzerá. It was analyzed 510 blood samples, where 150 from buffaloes and 60 from each bovine breed. Were sequenced 28 samples for each gene, in a total of 4 samples for each considered genetic group, obtained a 495 bp fragment for CSN2 gene and 373 bp for CSN3K gene. In CSN2 e CSN3K genes were identified SNPs by sequencing. In CSN2 gene, PCR-RFLP *Hae* III and *Hinf* I applied on buffaloes samples shows a monomorphism for allele A1. In bovine samples were identified alleles A1 and A2 whit variable frequencies by endonucleasis *Hae* III. DNA-SSCP in CSN2 gene characterize alleles A1 and B in buffaloes and A2 and B in bovines. At CSN3K gene, PCR-RFLP *Alu* I in buffaloes doesn't identify polymorphisms, showing only the B allele confirmed by DNA-SSCP. In bovine samples, the endonucleasis *Hind* III identify alleles A and B with various frequencies. The variation in CSN2 gene evaluated by PCR-RFLP *Hae* III indicates that the polymorphisms observed can be used to identify mixes on milk used to Mozzarella cheese production

Key-words: Molecular Markers, CSN2, CSN3K, milk proteins.

Introdução

Genes envolvidos na produção e qualidade do leite têm sido estudados em populações de diversas espécies e raças com a finalidade de identificação de marcadores moleculares auxiliares na seleção, assim como, para uso da industrial. As caseínas constituem a maior parte das proteínas do leite, as quais se dividem em quatro tipos: alfa-s₁ caseína (α -s₁), alfa-s₂ caseína (α -s₂), beta caseína (β) e kappa caseína (κ) (NG-KWAY-HANG, 1990).

A identificação de alelos polimórficos relacionados à produção de leite, teores de gordura e proteína pode levar o produtor a direcionar melhor a seleção e os acasalamentos em seu rebanho para que ocorra um aumento na frequência gênica ou genotípica desejada. Especificamente, o gene da κ -caseína compreende uma seqüência de 13kb dividido em 5 exons, e em bovinos, vários estudos tem associado a variante B ao fenótipo superior para características de qualidade do leite, principalmente, na manufatura de queijo (ALEXANDER et al. 1998).

MITRA et al. (1998) através da técnica de PCR-RFLP e enzimas de restrição *Hind* III, *Hinf* I e *Taq* I, detectaram em bovinos da raça Sahiwal (*Bos indicus*), e bubalinos Murrah, Nili-Ravi e Búfalos egípcios (*Bubalus bubalis*), polimorfismo nos alelos A e B do gene CSN3. A frequência do alelo B CSN3 foi menor (0,30) entre as raças leiteiras indianas (Sahiwal, Red Sindhi e Tharparkar) do que entre as cruzadas, e maior (0,70) entre várias raças européias. Em búfalos, essas enzimas produziram um fragmento com 260 bp no gene CSN3, correspondendo ao aminoácido 88-169.

CHIKUNI et al. (1994) depositaram a seqüência do gene CSN3 de búfalo no GenBank Acc No. U96662, a qual, indica a substituição de bases em duas posições (troca de timina por citosina e vice-versa). Uma dessas substituições é neutra e localiza-se na posição 30 do gene 136 e a segunda substituição é no codon 135, resultando na troca de um aminoácido Thr - Tirosina (ACC) por Ile - Isoleucina (ATC), que também foi encontrado por MERCIER et al. (1976). Assim, baseados nas seqüências de nucleotídeos do gene CSN3 de búfalo, pode-se

determinar o genótipo de búfalos Murrah com base no polimorfismo no códon 135, onde se localizou a troca do aminoácido Thr por Ile (MITRA et al. 1998).

Com base nos dados obtidos em vacas Holstein de primeira lactação, IKONEN, (1999) observou efeito da kappa-caseína influenciando a produção de leite e porcentagem de proteínas e gordura.

O gene da beta-caseína possui o alelo A1 que é característico de animais do norte europeu, inclusive em European Red Breeds e Black and White Lowland Breeds (BECK & KRISTIANSEN, 1990; NG-KWAI-HANG et al. 1984). Os animais da raça Guernsey apresentam alta frequência do alelo CSN2 (A2) (VAN EENENNAAM & MEDRANO, 1991). O alelo CSN2 B foi encontrado em baixa frequência na mesma população estudada da raça Guernsey.

VAN EENENNAAM & MEDRANO (1991) estudando uma população de animais das raças (Brown Swiss e Beck) e outra população de Jersey identificaram o alelo B numa maior frequência para o gene da beta-caseína em relação às raças estudadas por NG-KWAI-HANG et al. (1984). LIEN et al. (1999), em seu estudo com 22 raças Nórdicas, identificaram os alelos CSN1S1*C, CSN2*A2 e CSN3*B (alfa-S1, beta e kappa caseína), em quatro delas (Icelandic cattle, Swedish Mountain cattle, Northern Finncattle e Western Fjord cattle), indicando origem comum dessas populações.

Relações entre variação de proteínas no leite e composição total foram analisadas com base em 4475 amostras de leite de 371 vacas da raça Swedish Holstein. Os registros incluíram porcentagens de caseína, proteína e lactose em combinação com a produção de leite. Genótipos de vacas com α S1-caseína, beta-caseína, kappa-caseína e beta-lactoglobulina foram determinadas. Os resultados revelaram efeito aditivo positivo do alelo B da beta-lactoglobulina sobre a proporção de caseína e proteínas totais. O genótipo da beta-lactoglobulina tem alta influência na variação fenotípica, correspondendo a uma variação residual de 11% quando incluídas no modelo estatístico (LUNDÉN, 1997). Assim, o uso de marcadores de DNA pode auxiliar o planejamento de estratégias de cruzamento para raças controladas, melhorando a composição genética dos rebanhos (BURZYNSKA & TOPEZEWISKI, 1995).

Objetivo

O presente estudo teve por objetivo verificar a existência de polimorfismos nos genes da beta-caseína (CSN2) e kappa-caseína (CSN3K) em bubalinos e bovinos e analisar sua possível utilização na detecção de mistura de leite na produção de *mozzarella*.

Material e Métodos

1. Amostra

1.1. Origem dos animais

As búfalas pertencem a Fazenda Santa Eliza, município de Dourado-SP. Os animais da raça Holandesa pertencem ao Setor de Bovinocultura de Leite da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV – UNESP, os da raça Gir são pertencentes à Epamig (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), Uberada - MG, os da raça Girolando e Jersey à APTA Regional Centro Leste, Ribeirão Preto – SP, da raça Pardo-Suíço ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa – SP, os da raça Guzerá ao rebanho da Fazenda Lajeado, na cidade de Sales Oliveira – SP.

As amostras de sangue foram obtidas de 150 búfalas da raça Murrah e seus mestiços, que fazem parte do programa de controle leiteiro de bubalinos mantidos pelo Departamento de Zootecnia da Unesp/Jaboticabal, SP. Para bovinos foram coletadas um total de 360 amostras (60 de cada raça) das seguintes raças Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suíço, Guzerá e Jersey as quais representam as raças ligadas à produção de leite do país.

Foram colhidos 5 mL de sangue de cada animal por venopunção da veia mamária, utilizando-se tubos *vacutainer* B&D® contendo 7,5 mg de EDTA. Os tubos foram identificados com a numeração de cada animal e mantidos a 4° C.

2. Metodologia

2.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído da fase leucocitária, conforme metodologia descrita por ZADWORNY & KUHNLEIN (1990).

Após descongelar as amostras, foram aliqüotados 1000µL de sangue de cada amostra em tubos *ependorf* de 2mL. Foram adicionados 40µL de Nonidet P-40 (12,5%) em cada tubo completando-se em seguida o volume com TKM-1. Cada tubo foi então vigorosamente agitado em vortex seguindo então para centrifugação por 15 min a 10600 x g / 28°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante de cada amostra foi descartado, adicionaram-se 1000µL de TKM-1 [Tris-HCl (1M) pH 7,6; KCl (1M) e EDTA (0,1M) oh 8,0], agitou-se novamente em vortex até dissolver o *pellet*, completou-se novamente o volume e centrifugou-se por mais 10 minutos a 10600 x g / 28°C. Este procedimento foi repetido até a obtenção de um *pellet* de coloração clara.

Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 1000µL de TKM2 [Tris-HCl (1M) pH 7,6; KCl (1M); EDTA (0,1M) pH 8,0 e NaCl (1M)] + 100µL de SDS10%, agitando-se em seguida as amostras vigorosamente em vortex até dissolução total do *pellet*. As amostras foram então levadas ao banho-maria a 55°C por uma hora. Após este período adicionou-se 400µL de NaCl 6M por amostra, agitando-se vigorosamente em vortex e centrifugando a 14840 x g por 20 minutos /4°C.

Após esta etapa, foram aliqüotados 1000µL do sobrenadante de cada amostra e transferido para tubos novos (2,0mL). Adicionaram-se então 1000µL de etanol absoluto (gelado), misturando por inversão vagarosamente cada amostra. As amostras foram então centrifugadas a 14840 x g 15 minutos /4°C, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 1000µL de etanol 70% (gelado) seguindo de nova centrifugação a 14840 x g 5 minutos /4°C. O sobrenadante foi descartado, as amostras foram secadas por inversão sobre papel absorvente por aproximadamente 2 horas e o DNA foi ressuspenso em 100µL de TE [Tris-HCl

(1M) pH 8,0 e EDTA (0,1 M) pH 8,0] 10:1, sendo então levado ao agitador a 265 x g *overnight*.

2.2. Reação de amplificação e DNA por PCR

Realizaram-se testes preliminares de PCR objetivando-se a otimização das quantidades de reagentes para a amplificação do fragmento para o gene da alfa-s1-caseína, a seqüência dos iniciadores podem ser visualizadas na Tabela 1. As amplificações foram realizadas num volume final de 25 µL, contendo 100 ng das amostras de DNA, 0,5 uM de cada iniciador, 1 X PCR “buffer” [Tris-HCl (10 mM) pH 9,0 e 50 mM KCl], 1,5 mM MgCl₂, 100 uM de dNTPS e 0,5 U de Taq DNA polimerase.

Tabela 1 – Seqüências dos pares de bases dos iniciadores para os genes das caseínas.

Iniciador	Seqüência de bases do iniciador
BETA F	5'-GATGAACTCCAGGATAAAATC-3'
BETA R	5'-AATAATAGGGAAGGGTCCCCG-3'
K1	5'-CACGTCACCCACACCCACATTTATC-3'
K2	5'-TAATTAGCCATTTCGCCTTCTCTGT-3'

As condições para a obtenção de amplificação dos fragmentos a serem estudados seguiram a programação em termociclador modelo PTC-100 MJ[®]: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos (95°C por 60 segundos; 49°C por 60 segundos; 72°C por 60 segundos) e 72°C por 5 minutos finais.

Na etapa seguinte, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com brometo de etídio (0,05 µg/mL) a 100V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Logic (Kodak[®]).

Na Figura 1, visualiza-se o esquema do gene da beta-caseína (CSN2), e a região estudada.

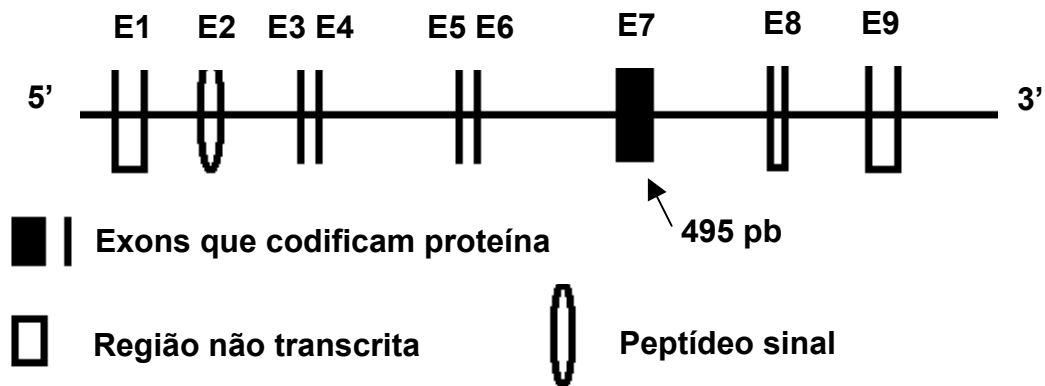


Figura 1 – Esquema do gene da beta-caseína (CSN2), e a região estudada de 495 pb compreendida no exon VII, pelos oligonucleotídeos BETA F e R.

Na Figura 2, visualiza-se o esquema do gene da kappa-caseína e a região estudada de 373 pb do IV exon pelos marcadores K1 e K2.

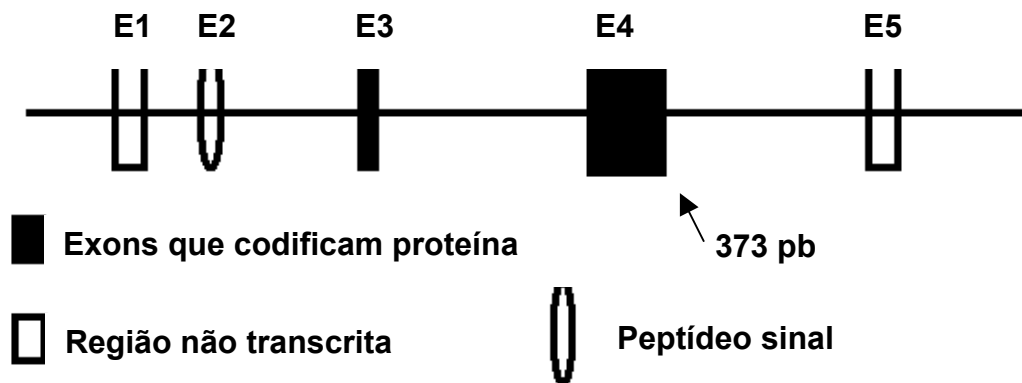


Figura 2 – Esquema do gene da kappa-caseína (CSN3K), e a região estudada de 373 pb compreendida no exon IV, pelos marcadores K1 e K2.

2.3. Seqüenciamento do fragmento amplificado do gene da CSN1S1

Os fragmentos amplificados dos genes da beta e kappa-caseína da raça bubalina Murrah (4 amostras de cada gene) e das raças bovinas (4 por raça, perfazendo um total de 24 amostras por genes), foram clonados em vetor T (*p-GEM-T Easy Vector System*, Promega®) no sítio de corte da enzima de restrição *EcoRI*. A reação de ligação do produto de PCR ao vetor constituiu-se de 1 µL de T4 DNA ligase (3 U/µL), 2 µL de tampão de T4 DNA ligase 1X, 1 µL do pGEM-T e aproximadamente 200 ng do produto amplificado, para uma reação final de 10 µL. Esta reação permaneceu em termociclador a 4°C por 16 horas.

Após a ligação, os plasmídios (vetores) foram inseridos por transformação em células “competentes” de *Escherichia coli* linhagem DH10B. Nesse processo, 10 µL do material ligado foram adicionados a 200 µL de células “competentes” em tubo de 1,5 mL estéril e incubados no gelo por 30 minutos, seguindo-se de incubação em banho-maria por 90 segundos a 42°C, e novamente incubação no gelo por 2 minutos.

Em seguida, as células foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e foram adicionados 800 µL de meio SOC [128,4 µL KCl 2M; 100 µL MgSO₄ 1M; 100 µL Mg Cl₂ 1M; 200 µL de glicose 1M; 10 mL de meio LB 2X] com posterior incubação por 1 hora a 37°C com agitação de 110 rpm.

Após esse período, foram feitas culturas dessas bactérias semeando 100 µL das células em placa de Petri contendo meio LB sólido [2g de Triptona; 1g de Extrato de Levedura; 1g de NaCl; 1,5g de Ágar; água Mili-Q suficiente para completar o volume de 100 mL] suplementado com 50 µL de ampicilina (100.000 mg/mL) por, aproximadamente, 16 horas à 37°C, para posterior seleção de colônias transformadas. Sobre o meio de cultura das placas de Petri, espalharam-se, previamente, 70 µL de X-Gal (50 mg/mL).

As colônias transformantes foram coletadas com palitos estéreis e transferidas para microplacas com 96 poços, contendo 100 µL de meio LB líquido [2g de Triptona; 1g de Extrato de Levedura; 1g de NaCl; água Mili-Q suficiente para completar o volume de 100 mL] suplementado com 50 µL de ampicilina

(100.000 mg/mL). As placas foram seladas e mantidas na estufa à 37°C por 22 horas. Posteriormente, aos clones foram adicionados 100 µL de glicerol 40% para estocagem dos mesmos em freezer -80°C. Alíquotas de 10 µL foram retidas das culturas e adicionadas a 1 mL de meio LB líquido com 50 µL de ampicilina em novas microplacas de 96 poços, seguindo de incubação à 37°C por 16 horas em placa agitadora. Essas culturas foram utilizadas na minipreparação de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al. 1989).

Após a extração do DNA plasmidial, foi feita a confirmação da inserção dos fragmentos nos vetores, em uma reação de digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen®). Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM, pH 8,3) com brometo de etídio (0,05 µg/mL) a 75V, por aproximadamente 2 horas. A visualização foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Logic (Kodak®).

Para cada um dos pares de iniciadores foram selecionadas 3 amostras (repetições). Os fragmentos clonados foram seqüenciados a partir das extremidades 5' e 3' utilizando o kit *BigDye™ Terminator Cycle Sequence Ready ABI Prism Versão 3* em seqüenciador automático *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer* (PE Applied Biosystems®) totalizando 18 amostras a serem seqüenciadas. As reações de seqüenciamento foram feitas em microplacas utilizando-se 0,5 µL dos terminadores Big Dye, 100 ng de DNA plasmidial, 10 pmoles dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de interesse, 3,5 µL de tampão 2,5X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl₂) , completando-se o volume da reação com H₂O milli-Q estéril para 10 µL.

A reação do seqüenciamento foi realizada em termociclador de acordo com a seguinte programação: 35 ciclos de 96°C por 10 segundos, 52°C por 5 minutos, 60°C por 4 minutos. Ao final do programa as amostras permaneceram a 4°C até serem retiradas do aparelho. Após o término da reação, foram adicionados às amostras 80 µL de isopropanol 75%, sendo as mesmas agitadas levemente. Em seguida, as amostras permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos, sendo posteriormente centrifugadas a 4240 x g por 30 minutos a 20°C. Após esse

processo, o sobrenadante foi descartado e as placas foram invertidas em papel absorvente por 5 minutos. Foram adicionados às placas 200 μ L de etanol 70% seguindo-se de centrifugação a 4240 x g por 10 minutos à 20°C. Esta última operação foi repetida por mais uma vez e as amostras foram secas em bomba a vácuo por 5 minutos. Depois desse período, as mesmas foram ressuspensas com 9 μ L de Hi-Di Formamide e desnaturadas a 95°C por 5 minutos. O sequenciamento foi realizado em seguida no equipamento *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer* (PE Applied Biosystems). O programa *Sequencing Analysis 3.4* gerou os eletroferogramas e o *software* CodonCode Aligner® *trial-version1.4.6* foi utilizado para conformação e caracterização das seqüências de DNA.

As seqüências de DNA obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos com seqüências depositadas no GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Após as consultas de similaridades, as seqüências foram então analisadas com o *software* p-Draw, no intuito de melhor visualizar os fragmentos localizado nos mesmos os sítios de clivagem das endonucleases de restrição utilizadas nas análises de PCR-RFLP.

2.4. Técnica de PCR-RFLP

Os fragmentos dos genes da beta e kappa-caseína, amplificados a partir dos iniciadores (Tabela 1), foi submetido à técnica de PCR-RFLP, pelas endonucleases (Tabela 2).

Tabela 2 – Endonucleases de restrição utilizadas para a técnica de PCR-RFLP nos fragmentos dos genes das caseínas.

FRAGMENTO	ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO			
	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Hinf</i> I
CSN1S1	*	**	**	*
CSN2	**	*	**	*
CSN3K	*	**	*	**

* endonuclease de restrição utilizada na digestão.

** endonuclease de restrição não utilizada na digestão.

Foram realizadas reações de digestão para os fragmentos das caseínas (CSN2 e CSN3K), e na Tabela 3 está indicado às seqüências de clivagem.

Tabela 3 – Sítio de clivagem das endonucleases de restrição utilizadas para a técnica de PCR-RFLP nos fragmentos dos genes das caseínas.

ENDONUCLEASE	POSIÇÃO DE CLIVAGEM 5' - 3' e 3' - 5'	
Alu I	5'-AG↓CT-3'	3'-TC↑GA-5'
Hae III	5'-GG↓CC-3'	3'-CC↑GG-5'
Hind III	5'-A↓AGCTT-3'	3'-TTCGA↑A-5'
Hinf I	5'-G↓ANTC-3'	3'-CTNA↑G-5'

As amostras totais de todos os animais estudados foram digeridas por 1 hora à 37°C em termocicladores PTC-100 MJ Research®. Após esta etapa, 10 µL de cada uma das amostras digeridas foram submetidas à eletroforese, em gel de agarose (3%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com brometo de etídio (0,05 µ/mL) a 100V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. A visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel fotodocumentado em aparelho Gel-Logic (Kodak®).

2.5. Técnica de DNA-SSCP

O produto de PCR obtido a partir dos iniciadores para os genes da beta e kappa-caseína, descritos na Tabela 1 foi submetido à técnica de DNA-SSCP.

Cada amostra, com volume final de 10 µL, continha 4 µL do produto da PCR diluída em 6 µL de Tampão SSCP (95% de formamida, 20mM EDTA, 0,05% de azul de bromofenol, 0,05% de xileno-cyanol), de acordo com a metodologia descrita por ORITA et al. (1989).

As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poli-acrilamida (Acrilamida:Bis-acrilamida 49:1) não desnaturante à concentração de 12%. Utilizou-se o aparato de gel SequiGen 38x50 cm (BioRad®). Após eletroforese por 4 horas a 80V, o gel foi mantido, por aproximadamente 1 hora, em solução contendo 1L de água Milli-Q e 50 µL de brometo de etídio. A visualização

das bandas foi feita em luz ultravioleta (UV) e os géis fotodocumentados em aparelho Gel-Logic (Kodak®).

2.6. Detecção de SNPs

Com o seqüenciamento dos nucleotídeos dos genes da CSN3 e CSN3K, realizaram-se o Blast-n de todos as seqüências, de búfalos e bovinos para a identificação dos SNPs. O procedimento verificou a existência de SNPs, entre os búfalos, e entre búfalos com bovinos das raças estudadas.

2.7. Análise Estatística

Cálculo das freqüências gênicas e genotípicas

a) Freqüência gênica

As freqüências gênicas (x_i) para o alelo da alfa-s1-caseína (i), e genotípicas para o genótipo (ii), serão estabelecidas para a população, pelas Equações 1 e 2:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n} \quad [\text{Eq. 1}]$$

$$x_{ii} = \frac{n_{ii}}{n} \quad [\text{Eq. 2}]$$

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

b) Teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

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

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + x_j^2 \quad [Eq.3]$$

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

Resultados e Discussão

1. Reação de amplificação de DNA por PCR

Através da reação de PCR, com os iniciadores (Tabela 1), permitiram a amplificação dos fragmentos dos genes das caseínas, os quais podem ser visualizados na Figura 3.

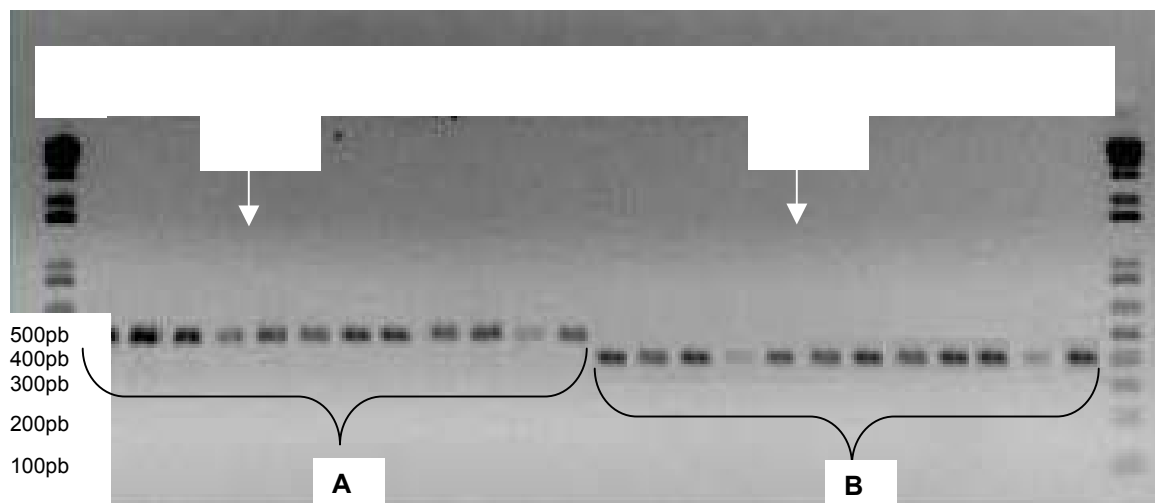


Figura 2 - Eletroferograma (gel de agarose a 1,5%) da amplificação dos fragmentos dos genes da CSN2 (A) e CSN3K (B), com 495 e 373pb, respectivamente, pela técnica de PCR. Amostras de 1 a 6, é de CSN2 bubalino, de 7 a 12 é de CSN2 bovino; amostras 13 a 18 CSN3K bubalina e 19 a 24 CSN3K bovina (Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suiço, Guzerá e Jersey) . M é o marcador de peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder e C controle não digerido de 954 pb.

2. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados dos genes CSN2 e CSN3K em búfalas e bovinos leiteiros

As seqüências de nucleotídeos dos exons VII do gene da CSN2 e IV da CSN3K, foram então alinhadas e editadas com o *software* CodonCode Aligner® em uma só seqüência final (*contig*), enviada então ao BLAST-n para confirmação e identificação da similaridade com outras espécies.

As 4 amostras de seqüências nucleotídica bubalina, tanto para CSN2 como para CSN3K, foram avaliadas para a identificação de SNPs através do Blast-n, e assim, não observaram-se SNPs nos genes CSN2 e CSN3K. O mesmo procedimento com as seqüências nucleotídicas de búfalos com as raças bovinas (sendo 4 amostra por raça, perfazendo um total de 24 amostras para cada gene), permitiram caracterizar SNPs para os genes CSN2 e CSN3K (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Resultados obtidos para similaridade das seqüências do fragmento amplificado do VII exon da beta-caseína bubalina com as 24 amostras de nucleotídeos das raças bovinas. A 1ª letra corresponde ao nucleotídeo bubalino e a 2ª corresponde ao nucleotídeo bovino.

RAÇAS BOVINAS						
POSIÇÃO 5'-3'	HOLANDESA	GIR	GIROLANDO	PARDO-SUIÇO	GUZERÁ	JERSEY
62	C - G	C - G	C - G	C - G	C - G	C - G
71	C - A	-	C - A	C - A	-	-
75	G - C	G - C	G - C	G - C	G - C	G - C
96	G - T	G - T	G - T	G - T	G - T	G - T
145	A - G	A - G	A - G	A - G	A - G	A - G
102	-	-	T - C	-	-	-
208	A - G	-	-	-	-	-
231	-	T - C	-	-	-	-
237	-	-	C - G	C - G	-	-
257	A - G	-	-	-	-	-
314	C - A	C - A	C - A	C - A	C - A	C - A
324	G - T	G - T	G - T	G - T	G - T	G - T
345	C - T	-	C - T	C - T	C - T	C - T
349	-	-	C - T	-	-	-
355	-	C - T	-	-	-	-
381	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C
399	-	-	-	-	A - G	-
416	A - G	-	-	-	-	-
465	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C

Tabela 5. Resultados obtidos para similaridade de seqüências do fragmento amplificado do IV exon da kappa-caseína bubalina com 24 amostras de nucleotídeos das raças bovinas. A 1ª letra corresponde ao nucleotídeo bubalino e a 2ª corresponde ao nucleotídeo bovino.

RAÇAS BOVINAS						
POSIÇÃO 5'-3'	HOLANDESA	GIR	GIROLANDO	PARDO-SUIÇO	GUZERÁ	JERSEY
86	T - C	T - C	T - C	-	T - C	T - C
92	T - G	T - G	T - G	T - G	T - G	T - G
113	T - C	-	T - C	T - C	-	-
116	-	-	C - T	C - T	-	-
117	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C
124	A - G	A - G	-	A - G	A - G	A - G
131	A - G	A - G	A - G	A - G	A - G	A - G
138	-	-	A - G	-	-	-
152	C - A	C - A	-	-	C - A	C - A
156	C - T	C - T	C - T	C - T	C - T	C - T
157	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C
174	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C
175	G - C	G - C	G - C	G - C	G - C	G - C
176	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C
185	C - T	C - T	-	C - T	C - T	C - T
194	C - T	C - T	-	C - T	C - T	C - T
210	C - T	C - T	-	-	-	C - T
212	T - C	T - C	-	T - C	T - C	T - C
213	C - A	C - A	-	C - G	C - G	C - A
221	-	-	-	A - T	A - T	-
250	A - G	A - G	A - G	A - G	A - G	A - G
275	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C	T - C
307	A - G	A - G	A - G	A - G	A - G	A - G
317	G - A	G - A	G - A	G - A	G - A	G - A
324	A - G	A - G	A - G	A - G	A - G	A - G

As seqüências obtidas neste trabalho realmente codificam para o gene da beta e kappa caseína na espécie *Bubalus bubalis*, pois houve alta similaridade das mesmas com aquelas já descritas na literatura. PREENU et al. (2004), trabalharam com búfalos da raça Murrah na Índia, a comparação realizada entre as seqüências de CSN2 do presente trabalho e as caracterizadas pelos autores supra citados, verificaram-se que apresentou 99% de similaridade, com caracterização do alelo A1.

Observa-se que a similaridade das seqüências do gene CSN2 entre outras espécies é relativamente alta, em relação a estudos realizados de seqüenciamento como em *Bos taurus* com 97% (GenBank – DQ191170.1) (QI et al. 2004), *Ovis aires* 94% (GenBank – NM_181008.2) (CERIOTTI et al. 2004a), *Capra hircus* 92% (AJ011018.2) (RANDO et al. 1998), *Girafa camelopardis* 94% (U53897.1) *Alces alces* (U53896) (GATESY et al. 1996) e *Sus scrofa* 80% (NM_214434.1) (ALEXANDER et al. 1992), conferindo que no processo de evolução os genes não se alteram com muita freqüência.

O grau de similaridade da seqüência de bases do exon IV do gene CSN3K do presente estudo, com seqüências de Búfalos depositadas no Gene Bank, observaram-se 96% de similaridade (MUKESH et al. 2004 e DAS et al. 1998), para outras espécies como *Sycerus caffer nanus* (WARD et al. 1997) a similaridade também foi de 96%. No gênero *Bos* o grau de similaridade foi entre 93 a 92% (WARD et al.1997, AVAVINDAKSHAN et al. 2003 e LE THI et al. 2004), em *Bison bison* (WARD et al. 1997) o grau máximo de similaridade foi de 93% e em caprinos foi de 90% (WARD et al. 1997).

Em algumas posições no gene CSN3K, podem-se observar alterações que são comuns a todas as raças bovinas como as localizadas nas posições: 92, 117, 131, 156, 157, 174, 175, 176, 250, 275, 307, 317, 324. Outras alterações estão presentes somente em algumas raças. Na posição 213, observa-se nas raças Holandesa, Gir e Jersey uma troca da base C em búfalo por uma A em bovino, e nas raças Pardo-Suíço e Guzerá, observa-se a troca de C do búfalo por G no bovino. Mediante a essa análise das seqüências de nucleotídeos do exon IV do

gene da kappa-caseína, permitiu caracterizar a presença do alelo B nos bubalinos, e nos bovinos caracterizaram-se os alelos A e B.

3. Técnica de PCR-RFLP

O fragmento de 495 pb amplificado em todos os animais estudados, tanto búfalos como bovinos, do exon VII do gene da beta-caseína foi submetido à digestão pelas endonucleases de restrição *Hae* III e *Hinf* I. As reações de digestão do fragmento do gene da beta-caseína bubalina digerido pela endonuclease de restrição *Hae* III, que reconhece a seqüência: 5'...GG↓CC...3' / 3'...CC↑GG...5', gerou fragmentos de 436 e 59 pb respectivamente, conforme mostrado na Figura 3.

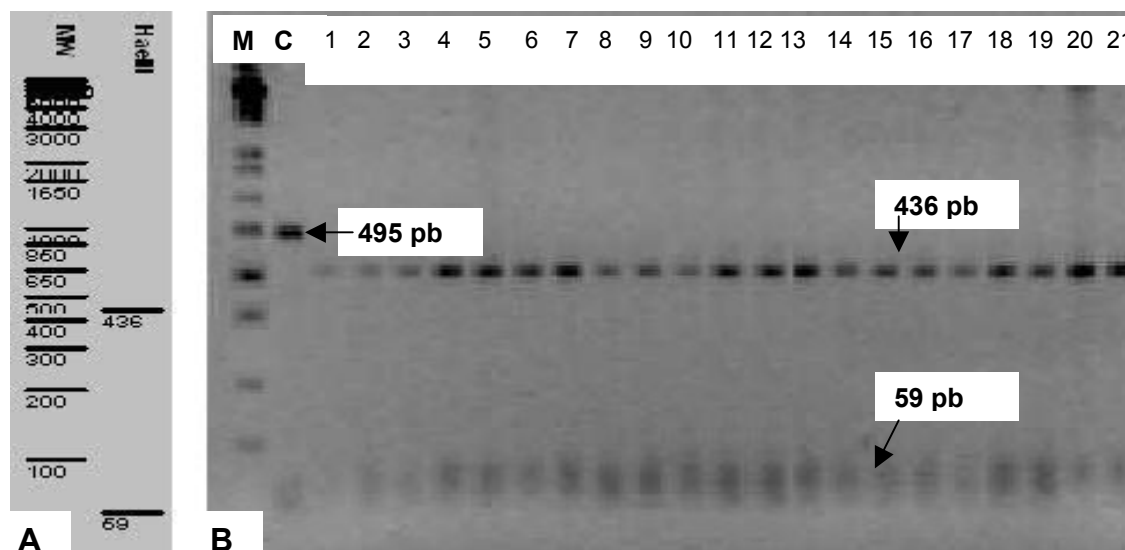


Figura 3 - **A** - Eletroferograma virtual do exon VII do gene da beta-caseína digerido pela enzima *Hae* III. **B** – Eletroferograma (gel de agarose a 3,5%) do fragmento de 495 pb do VII exon do gene da beta-caseína, digerido pela enzima *Hae* III. Amostras 1 a 9 refere-se a bubalino, de 10 a 21 de bovinos, com 2 amostras cada raça (Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suiço, Guzerá e Jersey). M é o marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder e C é o controle não digerido de 495 pb.

A técnica de PCR-RFLP – *Hae* III permitiu a identificação e caracterização dos animais da raça bubalina Murrah como monomórficos, para o exon VII do

gene da beta-caseína, com a ocorrência de 100% do alelo A1, assim apresentaram genótipos A1A1 (Figura 3).

Em bovinos a digestão do fragmento de 495 pb do exon VII gene da beta-caseína com a enzima *Hae* III para todas as raças bovinas (Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suiço, Guzerá e Jersey) pode ser visualizado nas Figuras 4.

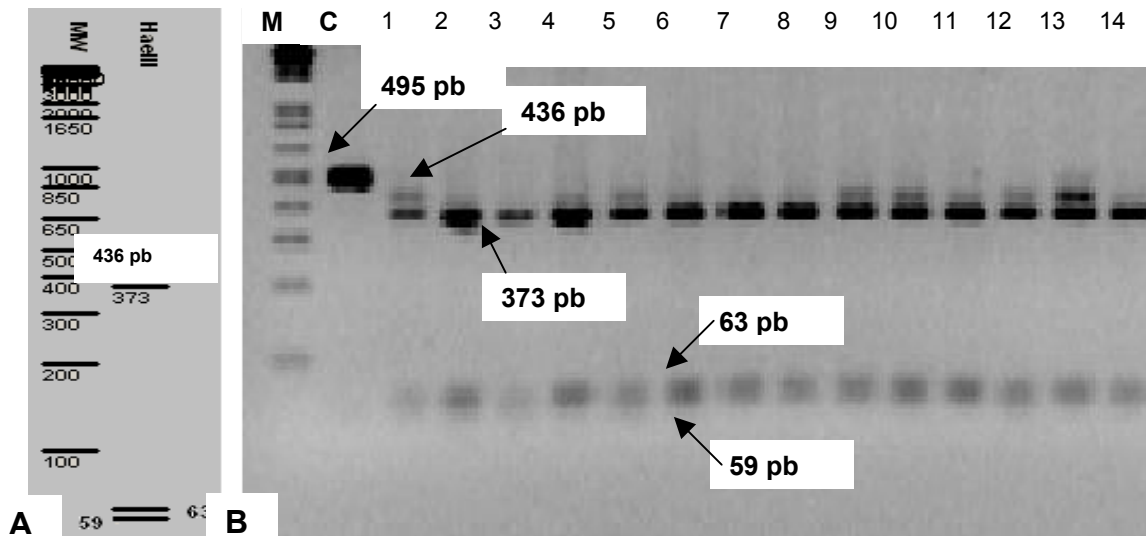


Figura 4 – **A** - Eletroferograma virtual do exon VII do gene da beta-caseína digerido pela enzima *Hae* III. **B** – Eletroferograma (gel de agarose a 3,5%) do fragmento de 495 pb do VII exon do gene da beta-caseína, digerido pela enzima *Hae* III. Amostras 1 a 10 refere-se a duas de bovinos das raças Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suiço, Guzerá, e de 11 a 14 a raça Jersey. M é o marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder e C é o controle não digerido de 495 pb.

Nos animais das raças Holandesa, Gir, Girolando, Guzerá e Jersey, após a digestão do fragmento de 495 pb do exon VII do gene da beta-caseína, observaram padrões diferentes dos fragmentos gerados, com 436, 373, 63 e 59 pb. Nesses animais os alelos presentes foram A1 e A2, caracterizando tanto animais heterozigotos A1A2 e homozigotos A1A1 e A2A2 (Figura 4).

Para os animais das raças Holandesa e Girolando, observaram-se genótipos A1A1, A1A2 e A2A2. Em animais da raça Gir a técnica de RFLP não detectou polimorfismo, e todos os animais apresentaram o mesmo genótipo (A1A2), com freqüência de 50% de cada alelo. Na raça Pardo-Suiço e Guzerá, os animais genotipados apresentaram apenas um perfil de digestão do fragmento do gene da CSN2, caracterizando heterozigose, com a identificação dos alelos A1 e

A2, configurando apenas o genótipo A1A2. Na raça Jersey, observou-se polimorfismo, com ocorrência dos alelos A1 e A2, e com genótipos A2A2 e A1A2. A frequência dos alelos e genótipos para o gene da beta-caseína região do VII exon, para todas as raças estudadas, como bubalinos da raça Murrah e bovinos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 6. Frequências observadas dos alelos e genótipos para o fragmento amplificado do VII exon do gene da beta-caseína (CSN2) bubalina e bovina.

CSN2/RFLP Hae III	ALELOS		GENÓTIPOS		
	A1	A2	A1A1	A1A2	A2A2
RAÇAS					
BÚFALAS	1	0	1	0	0
HOLANDESA	0,12	0,88	0,1	0,04	0,86
GIR	0,5	0,5	0	1	0
GIROLANDO	0,17	0,83	0	0,33	0,67
PARDO-SUIÇO	0,5	0,5	0	1	0
GUZERÁ	0,5	0,5	0	1	0
JERSEY	0,14	0,86	0	0,28	0,72

As reações de digestão com a enzima *Hinf* I na região do exon VII do gene da beta-caseína reconheceram a seqüência: 5'...G↓ANTC...3' / 3'...CTNA↑G...5', gerando fragmentos de 249, 152 e 94 pb respectivamente, para todos os animais genotipados, tanto para búfalas como para bovinos, conforme mostrado na Figura 5.

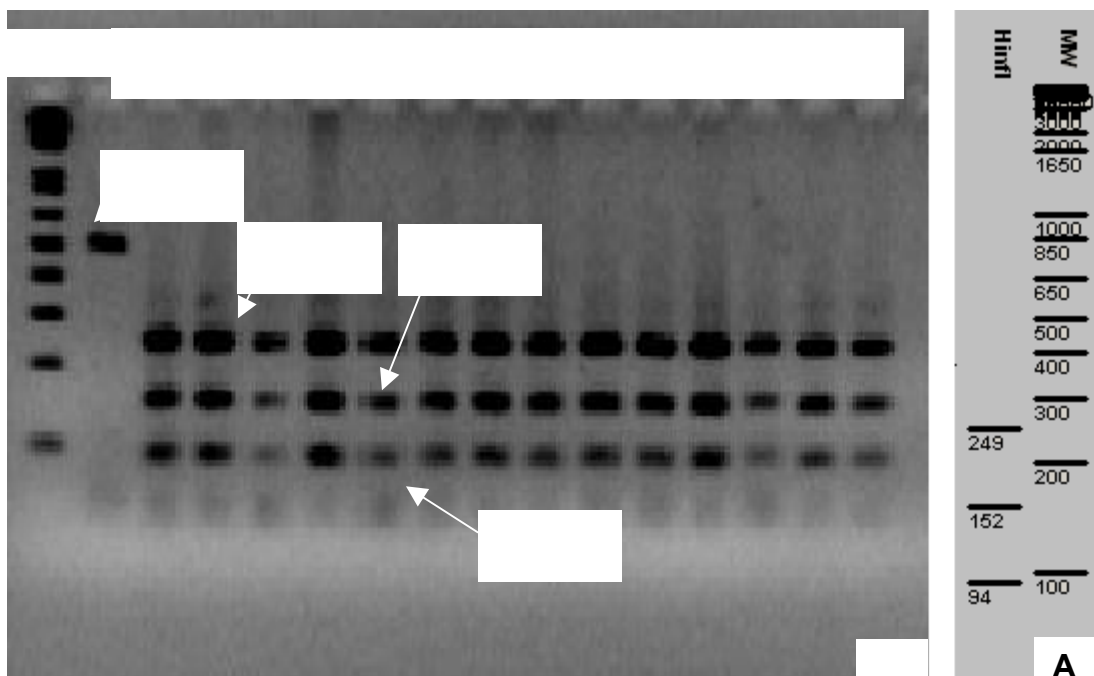


Figura 5 - **A** - Eletroferograma virtual do exon VII do gene da beta-caseína digerido pela enzima *Hinf* I. **B** – Eletroferograma (gel de agarose a 3,5%) fragmento de 495 pb do VII exon do gene da beta-caseína, digerido pela enzima *Hinf* I. Amostras 1 e 2 refere-se a bubalinos, de 3 a 14 de bovinos, com 2 amostras cada raça (Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suíço, Guzerá e Jersey). M é o marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder e C é o controle não digerido de 495 pb.

Com a endonuclease de restrição *Hinf* I, no exon VII do gene da beta-caseína em búfalas, e em todas as raças bovinas estudadas, não se identificaram variações no gene da beta-caseína, gerando fragmentos iguais para todos os animais, descrevendo assim, um monomorfismo, e caracterizando apenas um alelo (A2) e com o genótipo A2A2 na frequência de 100% (Figura 5).

Os resultados apresentados corroboram com o da literatura para as duas espécies estudadas. O exon VII do gene da beta-caseína em búfalos quando estudado pela técnica de PCR-RFLP, com a endonuclease de restrição *Hae* III, não apresentou polimorfismo. Com a mesma enzima em bovinos, detectou-se polimorfismo nas raças Holandesa, Girolando e Jersey. No entanto, nas raças Gir, Pardo-Suíço e Guzerá, não detectaram nenhuma variação na mesma região do gene da beta-caseína, caracterizando frequências tanto para os alelos como para os genótipos distintas para cada raça estudada (Tabela 5). IKONEN et al. (1999) analisando eletroforese de proteínas do leite de vacas da raça Finnish Ayrshire,

detectaram polimorfismo na proteína beta-caseína e identificaram os alelos A1, A2 e B, com genótipos A1A1, A1A2, A2A2, A1B e A2B. Os mesmos alelos descritos no presente estudo, no entanto as freqüências alélicas e genóticas, variam em relação aos valores estimados para as raças bovinas.

A freqüência observada de 100% do alelo A1 para o exon VII do gene da beta-caseína bubalina, pode ser devido ao tipo de seleção aos quais esses animais estão submetidos, visto que, na literatura são poucos os trabalhos sobre marcadores moleculares em búfalos para genes ligados a característica de produção, os quais podem configurar QTL.

A maioria dos trabalhos descrevem resultados obtidos em bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*). FALAKI et al. (1996), trabalharam com PCR-RFLP – Taq I para os genes das proteínas do leite (kappa, beta, alfa caseína e beta-lactoglobulina), em animais da raça Simental Italiana, genotipando tanto touros (148 animais) quanto vacas (279 animais). Os autores identificaram genótipos AA, AB e BB para o gene da beta-caseína, e no presente estudo caracterizamos os alelos A1 e A2 para o mesmo gene das caseínas, sendo variantes do mesmo alelo A, que condiz parcialmente aos resultados de FALAKI et al. (1996).

Em bovinos da raça Holandesa os alelos A1 e A2 e os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 do gene da beta-caseína, corroboram com os resultados encontrados por LIEN et al. (1999), quando trabalharam com bovinos de raças Nórdicas inclusive Holandesa. Os autores descreveram a presença do alelo A2 com alta freqüência em todas as populações estudadas para o gene da beta-caseína, mas na raça Jersey encontraram o alelo B com uma freqüência significativa, não sendo o mesmo alelo detectado pela técnica de RFLP – *Hae* III nos animais estudados da raça Jersey que configuraram o alelo A1 e A2, com apenas dois genótipos existentes A1A1 e A1A2 (McLEAN 1987; VAN ENENNAAM & MEDRANO, 1991). Nos animais da raça Pardo-Suiço obteve-se 100% do alelo A2 e com genótipo do tipo A2A2.

Para os zebuínos (Gir e Guzerá), foram identificados os alelo A1 e A2. E esse resultado de heterozigose observado nas duas raças sugere que os alelos A1 e A2 sejam característicos em populações de zebuínos, quando comparadas

com taurinos. Essa afirmação foi confirmada por TRAMONTINA et al. (1997), que estudaram polimorfismo das proteínas do leite em zebuínos brasileiros (Gir, Guzerá, Nelore Sindi), identificando o alelo A2 como o mais comum no locus da beta-caseína em *Bos indicus*.

MAHE et al. (1999), estudaram zebuínos (Shuwa e Sudanese Fulani) e taurinos (N'Dama, Baoule e Kuri) africanos, onde caracterizaram as proteínas do leite (alfa, beta, kappa caseína, alfa-lactoglobulina e beta-lactoglobulina). Foram descritos os alelos para cada gene estudado como alfa-caseína B, beta-caseína A1 e kappa-caseína B, com predominância em taurinos N'Dama e Baoule com frequências de 0,56 e 0,60, respectivamente. Nos zebuínos identificaram as variantes da alfa-caseína C, beta-caseína A2 e kappa-caseína A com frequência de 0,6 em Shuwa. Nossos resultados referentes ao alelo A1 contrastam parcialmente com os resultados relatados por MAHE et al. (1999) e BARROSO et al., (1999).

Com a aplicação da técnica de PCR-RFLP – Hinf I nos grupos de búfalos e bovinos, não foi possível a observação de alteração nos fragmentos gerados após digestão, com 94, 151 e 270 pb. A não observância de polimorfismo para o sítio de corte da endonuclease de restrição pode ser devido a uma alta taxa de conservação nas seqüências que compõem o sítio ou nas proximidades dos mesmos. Por outro lado, o sítio de corte pode estar inserido dentro de exons, configurando uma região em que a taxa de mutação é muito baixa ou nula, visto que, uma alteração dentro de um exon pode acarretar mudança no aminoácido que compõe a cadeia polipeptídica. Pode também ter ocorrido uma mutação silenciosa.

As reações de digestão do fragmento do gene da kappa-caseína bubalina e bovina digerido pela endonuclease de restrição *Alu* I, que reconhece a seqüência: 5'...AG↓CT...3' / 3'...TC↑GA...5', resultaram em fragmentos de 224 e 149 pb respectivamente, revelando o alelo B, com 100% do genótipo BB, conforme mostrado a Figura 6. Em bubalinos e bovinos a restrição do fragmento do exon IV do gene da kappa-caseína pela endonuclease de restrição *Hind* III, que reconhece a seqüência: 5'...A↓AGCTT...3' / 3'...TTCGA↑A...5', gerou fragmentos de 224 e

149 pb respectivamente, conforme mostrado a Figura 12. Nos bubalinos observou-se apenas o alelo B, com 100 % do genótipo BB e nos bovinos observaram os alelos A e B.

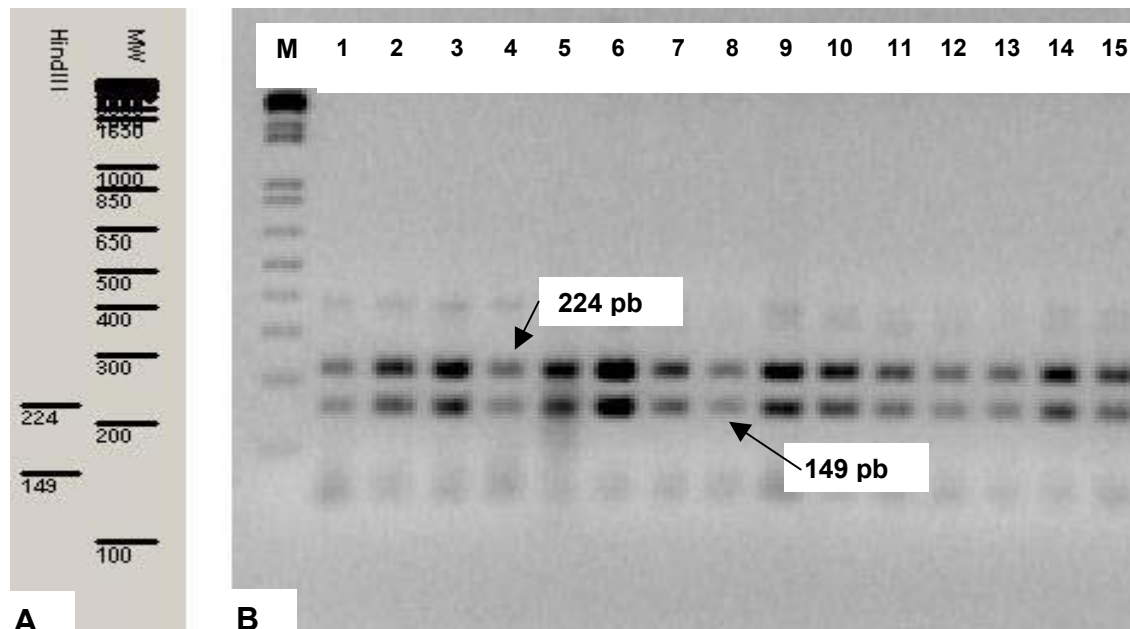


Figura 6 - **A** - Eletroferograma virtual do exon IV do gene da kappa-caseína digerido pela enzima *Hind* III. **B** – Eletroferograma (gel de agarose a 3,5%) do fragmento de 373 pb do IV exon do gene da kappa-caseína, digerido pela enzima *Alu* I. Amostras 1 a 3 refere-se a bubalinos, de 4 a 15 de bovinos, com 2 amostras cada raça (Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suiço, Guzerá e Jersey). M é o marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder e C é o controle não digerido de 373 pb.

Na raça Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suiço, Guzerá e Jersey a endonuclease *Hind* III gerou a partir do fragmento do IV exon do gene da kappa-caseína fragmentos com 224 e 149 pb e fragmentos não digeridos (373 pb), devido à ausência do sítio de corte para a endonuclease referida (Figura 7).

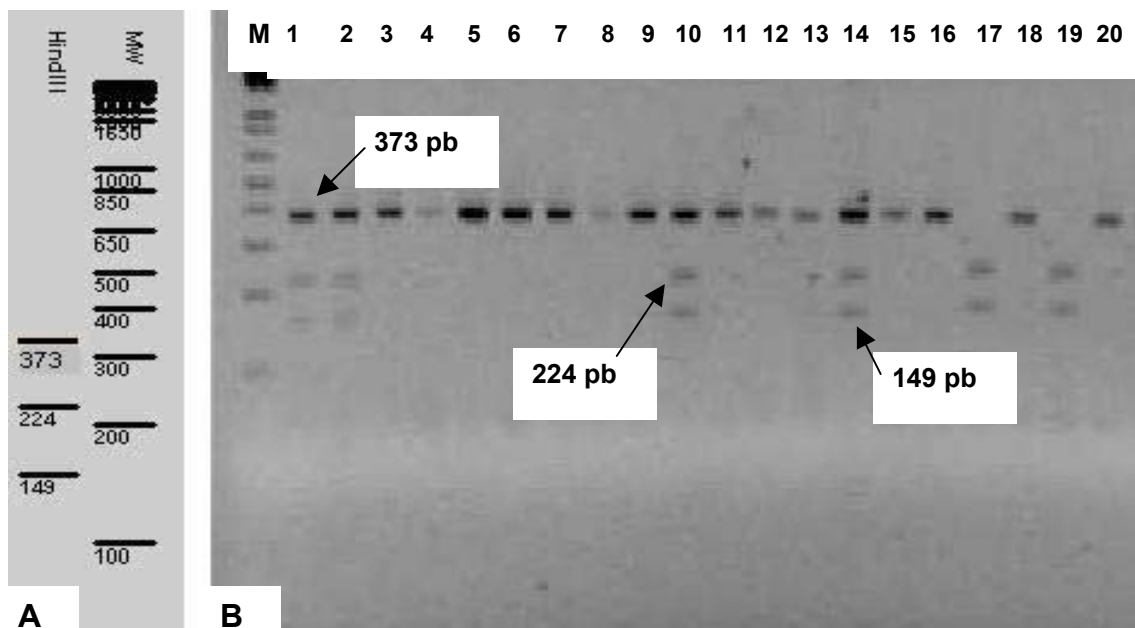


Figura 7 - **A** - Eletroferograma virtual do exon IV do gene da kappa-caseína digerido pela enzima *Hind* III. **B** – Eletroferograma (gel de agarose a 3,5%) do fragmento de 373 pb do IV exon do gene da kappa-caseína, digerido pela enzima *Hind* III. Amostras 1 a 4 raça Holandesa, 5 a 8 raça Gir, 9 a 12 raça Girolando, 13 a 14 raça Pardo-suiço, 16 a 18 raça Guzerá e 19 e 20 raça Jersey. M é o marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder.

Os perfis apresentados caracterizam os alelos A e B presentes nas raças bovinas estudadas. A não ocorrência de corte pela endonuclease de restrição *Hind* III revela o alelo A e a presença de corte o alelo B, e com freqüências diferentes nos animais estudados, com genótipos AA, AB e BB. Em Gir não se observou o genótipo BB.

Na Tabela 8 estão apresentadas as freqüências dos alelos e genótipos observados para o IV exon do gene da kappa-caseína, determinados na raça bubalina Murrah e em bovinos das raças Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suiço, Guzerá e Jersey pela técnica de PCR-RFLP.

Tabela 8. Frequências observadas dos alelos e genótipos para o fragmento amplificado do IV exon da kappa-caseína (CSN3K) bubalina e bovina.

CSN3K/RFLP Hind III RAÇAS	ALELOS		GENÓTIPOS		
	A	B	AA	AB	BB
BÚFALAS	0	1	0	0	1
HOLANDESA	0,75	0,25	0,62	0,26	0,12
GIR	0,95	0,05	0,9	0,1	0
GIROLANDO	0,82	0,18	0,72	0,2	0,08
PARDO-SUIÇO	0,43	0,57	0,28	0,3	0,42
GUZERÁ	0,45	0,55	0,23	0,45	0,32
JERSEY	0,48	0,52	0,37	0,23	0,4

Vários trabalhos existentes na literatura avaliaram os genes das caseínas, e buscaram correlacionar os alelos desses genes com características de produção, como produção de leite total, conteúdo de proteína e gordura. NG-KWAI-HANG et al. (1984) genotiparam vacas de várias raças de diferentes fazendas na região de Quebec por meio de eletroforese de proteínas, para as caseínas, descreveram polimorfismos para a proteína kappa-caseína, identificaram os alelos A e B com frequências de 0,744 e 0,256, respectivamente, e por análises de quadrados médios e análise de variância, mostraram resultados significativos para o genótipo BB que produz mais proteína em torno de 0,13 a 0,05% a mais que animais com genótipos AA e AB, sendo que no presente estudo, foram identificado os alelos A e B.

4. Técnica de DNA-SSCP

O fragmento de 495 pb do gene CNS2 avaliado pela técnica de DNA-SSCP em búfalas, onde permitiu a caracterização dos alelos A1 e B, e genótipos A1A1 e A1B (Figura 8).

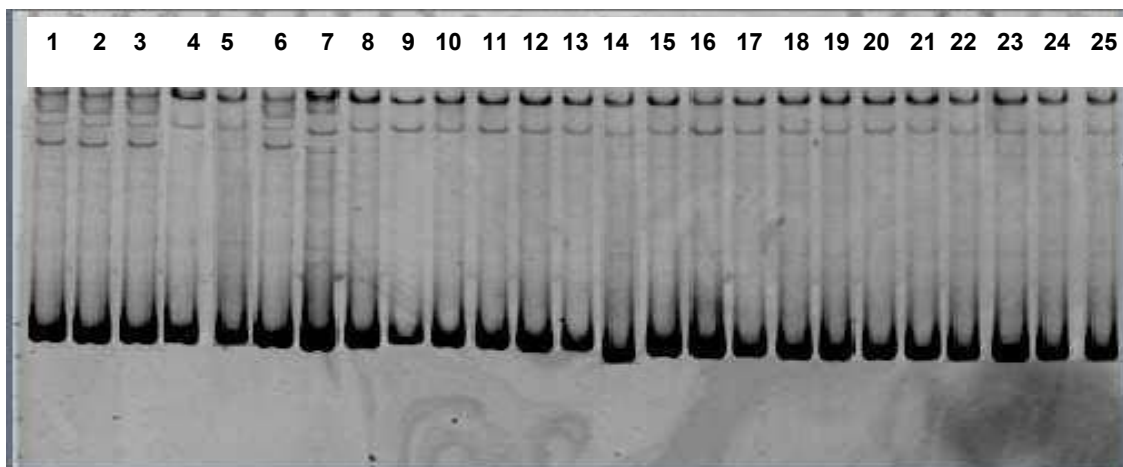


Figura 8 - Eletroferograma (gel de poliacrilamida a 10%), do fragmento de 495 pb do VII exon do gene da beta-caseína, caracterizado pela técnica de DNA-SSCP, em animais da raça bubalina Murrah. Amostras 1 a 3, 6 e 7 – genótipo A1B e amostras 4 e 5, 8 a 25 genótipo A1A1.

Na Figura 8 pode ser visualizado o polimorfismo no gene da beta-caseína em Búfalas, caracterizando animais homozigotos – dois padrões de migração – e heterozigotos – com quatro padrões de migração. O polimorfismo apresentado caracteriza o alelo A1 e B. Os animais apresentaram genótipos A1A1 e A1B.

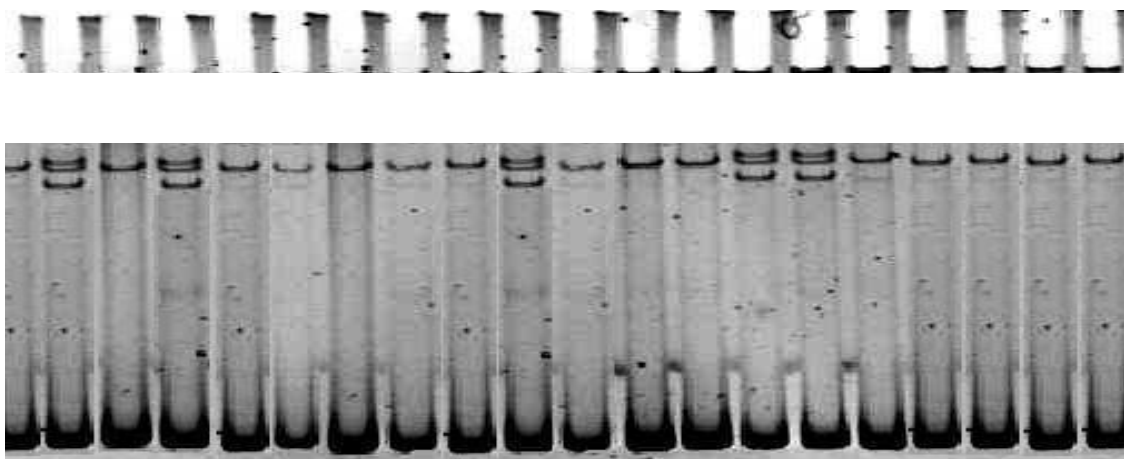


Figura 9 - Eletroferograma (gel de poliacrilamida a 10%) referente ao fragmento de 495 pb do VII exon do gene da beta-caseína, caracterizado pela técnica DNA-SSCP, em animais das raças Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suiço, Guzerá e Jersey. Amostras 1, 3, 5 a 9, 11 a 13, 16 a 20 com genótipo A2A2, amostras 2, 4, 10, 14 e 15 genótipo A2B.

Os animais das raças Holandesa, Girolando e Jersey apresentaram polimorfismo (Figura 9) no exon VII gene da beta-caseína, revelando os alelos A2

e B, caracterizando genótipos homozigotos A2A2 e heterozigotos A2B. As raças Gir, Pardo-suíço e Guzerá apresentaram apenas o genótipo A2A2 (Tabela 9).

Tabela 9. Frequências observadas dos alelos e genótipos para o fragmento amplificado do VII exon da beta-caseína (CSN2) bubalina e bovina.

CSN2/SSCP	ALELOS			GENÓTIPOS			
	A1	A2	B	A1A1	A1B	A2A2	A2B
RAÇAS							
BÚFALAS	0,94	0	0,06	0,88	0,12	0	0
HOLANDESA	0	0,92	0,08	0	0	0,92	0,08
GIR	0	1	0	0	0	1	0
GIROLANDO	0	0,98	0,02	0	0	0,95	0,05
PARDO-SUIÇO	0	1	0	0	0	1	0
GUZERÁ	0	1	0	0	0	1	0
JERSEY	0	0,96	0,04	0	0	0,9	0,1

A técnica de DNA-SSCP permitiu a caracterização de todas as raças estudadas (búfalas da raça Murrah e bovinos das raças – Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suíço, Guzerá e Jersey) e a descrição de seus alelos.

BARROSO et al. (1999) trabalharam com animais das raças Holstein Friesian, Brown Swiss, Limousin e com duas raças espanholas Asturiana dos Vales e das Montanhas, os quais foram genotipadas para o gene da beta-caseína através da técnica de DNA-SSCP. Os autores descreveram os alelos A1, A2, A3 e B. Os alelos A1, A2 e B apresentaram-se nas frequências 23,1, 64,6 e 12,3%, e o alelo A3 abaixo de 4%, dados também relatados por NG-KAWAI-HANG et al. (1986). Os resultados obtidos no presente estudo são relativamente similares aos descritos por BARROSO et al. (1999), e as diferenças entre os resultados do presente trabalho e os da literatura, pode ter sido ocasionado pelo tipo de seleção à qual esses animais foram submetidos, e também os progenitores das mesmas, visto que alguns genótipos são mais favoráveis em alguns ambientes do que em outros. Por isso de algumas diferenças na frequência alélica e genotípica dos rebanhos estudados, em relação a outros rebanhos, os quais estão localizados em outras regiões com climas distintos, manejo e seleção.

O fragmento de 373 pb do IV exon do gene da kappa-caseína de búfalos e bovinos, pela técnica de DNA-SSCP permitiu a caracterização de alelos e genótipos nos animais estudados que podem ser visualizadas nas Figuras 10 e 11.

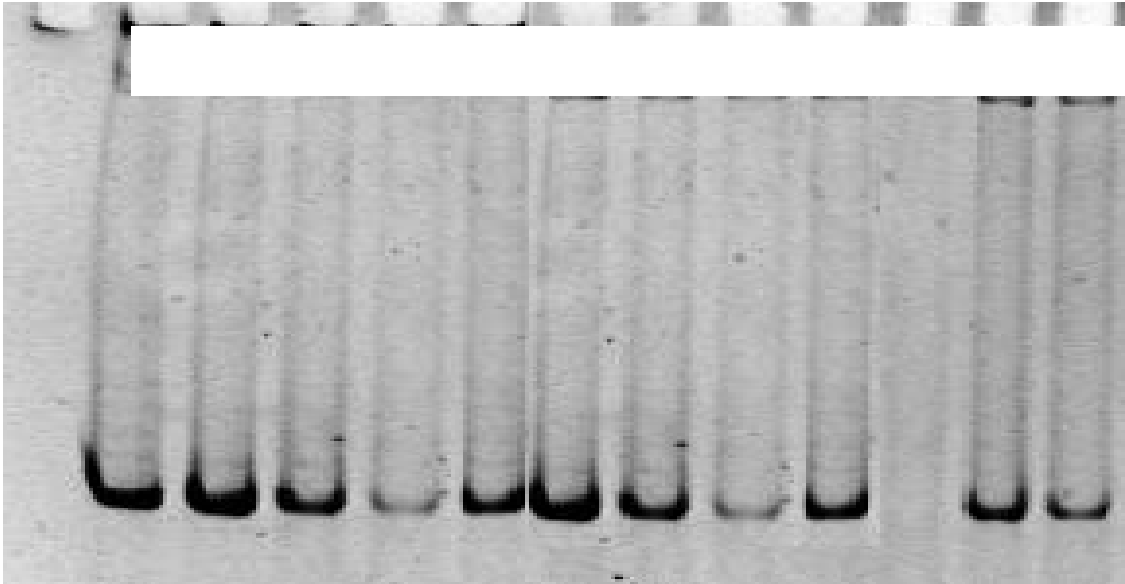


Figura 10 - Eletroferograma (gel de poliacrilamida a 10%) do fragmento de 373 pb do IV exon do gene da kappa-caseína, caracterizado pela técnica DNA-SSCP, em animais das raças bubalina Murrah. Amostras 1 a 12 com genótipo BB.

A técnica de DNA-SSCP em bubalinos (Figura 16) não identificou variações no IV exon do gene da kappa-caseína, caracterizando assim animais monomórficos, e também a presença de apenas o alelo B com constituição a genotípica BB. OTAVIANO et al. (2005) trabalharam com animais da raça Murrah na mesma região, não identificando polimorfismo, e caracterizaram o mesmo alelo descrito no presente estudo em búfalas da raça Murrah.

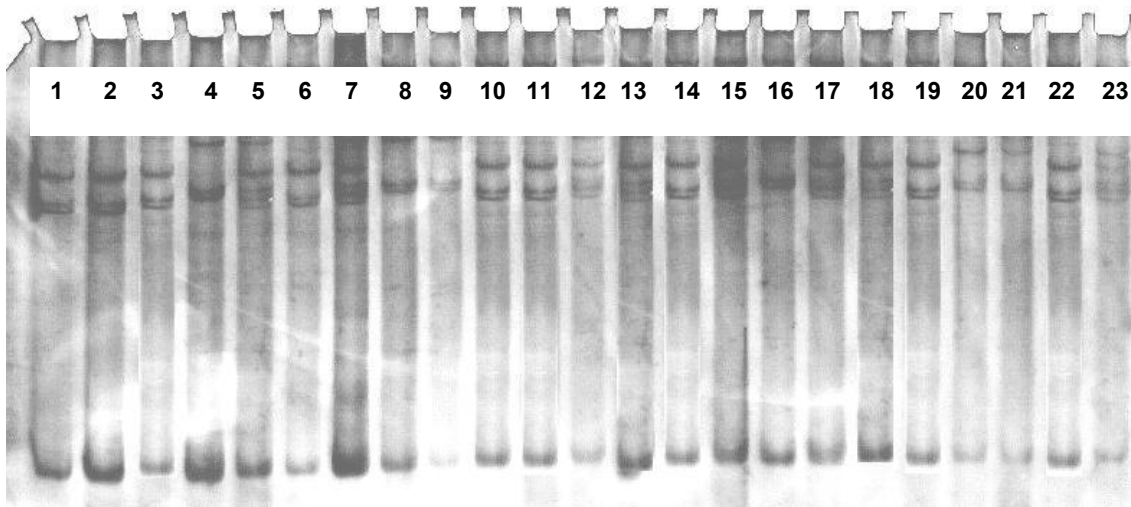


Figura 11 - Eletroferograma (gel de poliacrilamida a 10%), do fragmento de 373 pb do IV exon do gene da kappa-caseína, caracterizado pela técnica DNA-SSCP, em animais das raças Holandesa, Gir, Girolando, Pardo-Suíço, Guzerá e Jersey. Amostras 1 a 3, 6, 10 a 14, 19 e 22 com genótipo AA, amostras 4, 8, 9, 16, 20 e 21 genótipo BB e amostras 5, 7, 15, 17, 18, e 23 com genótipo AB.

Na raça Holandesa, identificaram-se os alelos A e B, e foram observados os genótipos AB e BB nos animais estudados, não tendo sido observado o genótipo AA. Nos animais da raça Gir, Girolando, Pardo-Suíço, Guzerá e Jersey foram descritos os alelos A e B, com genótipos AA, AB e BB. Nessas raças ocorreu um aumento da homozigose e diminuição da heterozigose, que pode ser devido à seleção aplicada a esses animais, ou possível processo de endogamia. O alelo B está relacionado com à maior produção de leite e diferentes propriedades de manufatura de produtos lácteos e queijos (LIN et al. 1986), quando comparado ao alelo A.

Na Tabela 10, encontram-se as freqüências observadas dos alelos e genótipos, obtidos pela técnica de DNA-SSCP para o IV exon do gene da kappa-caseína, para bubalinos e bovinos estudados.

Tabela 10. Freqüências observadas dos alelos e genótipos para o fragmento amplificado do IV exon da kappa-caseína (CSN3K) bubalina e bovina.

CSN3K/SSCP	ALELOS		GENÓTIPOS		
	A	B	AA	AB	BB
RAÇAS					
BÚFALAS	0	1	0	0	1
HOLANDESA	0,2	0,8	0	0,38	0,62
GIR	0,36	0,64	0,25	0,21	0,54
GIROLANDO	0,48	0,52	0,43	0,1	0,47
PARDO-SUIÇO	0,43	0,57	0,25	0,37	0,38
GUZERÁ	0,48	0,52	0,3	0,35	0,35
JERSEY	0,49	0,51	0,37	0,25	0,38

STEWART et al. (1987), citados, relataram que o gene da CSN2 e CSN3K, são os mais conservados, visto que são importantes para a estabilidade das micelas das propriedades de processamento da coagulação láctea. Em suma, os alelos caracterizados para os genes das caseínas no presente estudo, para as duas espécies estudadas, são concordantes com a literatura, e que a fixação de alguns alelos, podem ser devido às vantagens que os mesmos oferecem, tanto em questão de adaptabilidade das espécies e também por interesse econômico, quando se tratando de programas de seleção, com exemplos típicos como o alelo B do gene da CSN3K, que está ligado a melhor processamento e rendimento na produção de queijos, e o alelo B do gene da CSN2, com maior concentração de proteína no leite (McLEAN 1987), e o alelo B do gene da CSN1S1 ligado a maior produção de leite (NG-KWAI-HANG, et al. 1986).

Na região estudada do exon VII do gene da CSN2, nos búfalos e bovinos, os alelos A1, A2 e B, condizem com os alelos descritos por CERIOTTI et al. (2004b), e os autores caracterizaram os alelos A1 e A2 para os taurinos (Somba, Lagune e Modicana), o alelo A1 foi observado apenas nas raças Somba e Lagune, com freqüências variando entre 0,75 e 0,69. O alelo A2 foi descrito com alta freqüência (0,69 – 0,80) para os zebuínos e cruzados (Borgou) e na Modicana. O alelo B foi caracterizado em zebuínos (Adamawa e Sudanese Zebu Peul), com freqüência de 0,04. As freqüências relatadas pelos autores supra citados, são muito similares com as observadas no presente estudos para as raças estudadas, tanto bubalinos com em bovinos. Os alelos A1 e A2 (JANN, et al. 2002) são característicos de populações taurinas com freqüências relativamente altas, em

zebuínos caracterizam-se os alelos A2 e B, visto que a variante B ocorre em uma frequência mais baixa variando entre 0,08 – 0,04 (Tabela 12).

O gene da CSN3K, na região do exon IV descreveu-se os alelos A e B em bubalinos e bovinos, sendo os mesmos resultados encontrados por CERIOTTI, et al. (2004b), onde o alelo A foi relatado com frequência entre 0,29 e 0,02, e o alelo B com frequência entre 0,35 – 0,79 em taurinos, e em zebuínos foram entre os valores de 0,12 – 0,2 (PRINZENBERG, et al. 1999). Essas frequências condizem parcialmente com os resultados observados no presente estudo (Tabela 10).

Os alelos observados em bubalinos para os genes das caseínas, podem influenciar nos eventos de expressão desses genes, alterando assim, o conteúdo total de proteína e gordura no leite, aspectos que podem alterar os processos de manufatura e propriedades organolépticas dos produtos oriundos do leite bubalino, produtos apreciados pela população, com maior atenção para a *mozzarella*.

Conclusões

A variação no gene CSN2 avaliada pela técnica de PCR-RFLP *Hae* III indica que os polimorfismos observados em bovinos e bubalinos podem ser utilizados para identificar misturas de leite na manufatura do queijo *mozzarella*.

Os SNPs observados na seqüência de nucleotídeo dos genes CSN2 e CSN3K dos bubalinos em relação ao bovinos indicam possibilidades de inferências sobre diferenças na expressão dos mesmos.

Referências Bibliográficas

ALEXANDER, L.J.; DAS GUPTA, N.A.; BEATTIE, C.W. The sequence of porcine α 2-casein cDNA. **Animal Genetics**, v.23, p.365–367, 1992.

ALEXANDER, L.J.; DAS GUPTA, N.A.; BEATTIE, C.W. Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. **Europe Journal Biochemical**, v.178, p.395-401, 1998.

ARAVINDAKSHAN, T. V.; JAMES, S. P. Polymorphism at kappa casein gene locus in Vechur cattle of Kerala investigated by PCR-RFLP and DNA sequencing. 2003. **Unpublished Paper**.

BARROSO, A., DUNNER, S.; CANON, J. A multiplex PCR-SSCP test to genotype bovine beta-casein alleles A¹, A², A³, B and C. **Animal Genetics**, v.30, p.322-323, 1999.

BECK, A.M. & KRISTIANSEN, K.R. Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield. **Journal Dairy Research**. 57:53-62. 1990.

BURZINSKA, B.; TOPZEWSKI, J. – Genotyping of *Bison bonasus* κ -casein gene following DNA sequence amplification. **Animal Genetics**, v.26, p.335-336, 1995.

CERIOTTI, G.; CHESSA, S.; BOLLA, P.; BUDELLI, E.; BIANCHI, L.; DURANTI, E.; CAROLI, A. Single nucleotide polymorphisms in the ovine casein genes detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. **Journal Dairy Science**, v.87, n.8, p.2606-2613, 2004a.

CERIOTTI, G.; MARLETTA, D.; CAROLI, A.; ERHARDT, G. Milk protein loci polymorphism in taurine (*Bos taurus*) and zebu (*Bos indicus*) populations bred in hot climate. **Journal Animal Breeding and Genetics**, v.121, p.404-415, 2004b.

CHIKUNI, K.; TABATA, T.; SAITO, M.; MONMA, M. – Direct sequencing of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) Kappa-casein. **Animal Science Tche**, v.65, p.652-655, 1994.

DAS, P.; GARG, L. C. Cloning and expression of bubaline k-casein gene. 1998. **Unpublished Paper.**

FALAKI, M.; GENGLER, N.; SNEYERS, M.; PRABDI, A.; MASSART S.; FORMIGONI A.; BURNY, A.; PORTETELLE, D.; RENAVILLE. R. Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. **Journal Dairy Science**, v.79, n.8, p.1446-1453, 1996.

GATESY, J.; HAYASHI, C.; CRONIN, M.A.; ARCTANDER, P. Evidence from milk casein genes that cetaceans are close relatives of hippopotami artiodactyls. **Molecular Biology Evolution**, v.13, n.7, p.954-963, 1996.

IKONEN, T.; OJALA, M.; RUOTTINEN, O. – Associations Between Milk Protein Polymorphism and First Lactation Milk Production Traits in Finnish Ayrshire Cows, **Journal of Dairy Science**, v.82, n.5, p.1298-1302, 1999.

JANN, O.; PRINZENBERG, E.M.; BRANDT, H.; WILLIAMS, J. L.; AJMONE-MARSAN, P.; ZARAGOZA, P.; ZBEYAZ, C. O.; ERHARDT, G. Intragenic haplotypes at the bovine *CSN1S1* locus. **Archive Tierz Dummerstorf**, v.45, p.11–19, 2002.

LE THI, T.; LUU QUANG, M.; NGUYEN VAN, H.; PHAM DOAN, L.; TRAN THI THU, T.; NGUYEN TRONG, B. NGUYEN FANG, V. The polymorphism of the kappa-casein gene fragment of some Vietnamese *Bos taurus*. 2004. **Unpublished Paper.**

LIEN, S.; KATANEN, J.; OLSAKER, I.; HOLM, L.E.; EYTHORSDDOTTIR, E.; SANDBERG, K.; DALSGAARD, B.; ADALSTEINSSON, S. Comparison of milk protein allele frequencies in Nordic cattle breeds. **Animal Genetics**, v.30, p.85–91, 1999.

LIN, C.Y.; McALLISTER, A.J.; NG-KWAI-HANG, K.F.; HAYES, J.F. – Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.69, p.704-712, 1986.

LUNDÉN, A.; NILSSON, M.; JANSON, L. – Marked effect of β -Lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.11, p.829-834, 1997.

MAHE, C.; CHEVRET, S. Estimating regression parameters and degree of dependence for multivariate failure time data. **Biometrics**, v.55, n.4, p.1078-1084, 1999.

McLEAN, D.M.; - Influence of milk protein variants on milk composition, yield and cheese making properties. **Animal Genetics**, v.18, p.100-102, 1987.

MERCIER, J.C.; CHOBERT, J.M.; ADDEO, F. – Comparative study of the amino acid sequences of the caseinomacropetides from seven species. **FEBS Lett**, v.72, p.208-214, 1976.

MITRA, A.; SCHLEE, P.; KRAUSE, I.; BLUSCH, J.; WERNER, T.; ALAKRISHNAN, CR.; PIRCHNER, F. Kappa-casein polymorphisms in Indian dairy cattle and buffalo: A new genetic variant in buffalo. **Animal Biotechnology**, v.9, n.2, p.81-7, Karnal, 1998.

MUKESH, M.; MISHRA, B. P.; KATARIA, R. S.; NAVANI, N. K.; SAHANA, G.; TANTIA, M. S.; AHLAWAT, S. P. S. Sequence analysis of kappa-casein gene in Indian riverine buffalo. 2004. **Unpublished Paper**.

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

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

NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein Friesian cows. **Journal Dairy Science**, v.69, p.22–26, 1986.

ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, v.5, n.4, p.874-879, 1989.

OTAVIANO, A.R.; TONHATI, H.; SENA, J.A.D.; MUÑOZ, M.F.C. Kappa-casein gene study with molecular markers in female buffaloes *Bubalus bubalis*. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.2, p.237-241, 2005.

PREENU, J.; MURALEEDHARAN, P.; ROCH, V.; KUMAR, S. A new genetic variant of buffalo beta casein in exon 7. **Unpublished**. 2004.

PRINZENBERG, E. M.; ERHARDT, G. A new CSN3 allele in *Bos indicus* cattle is characterized by *Msp* I PCR-RFLP. **Animal Genetics**, v.30, p.109-119, 1999.

QI, P.X.; WICKHAM, E.D.; FARRELL, H.M. Jr. Thermal and alkaline denaturation of bovine beta-casein. **Protein Journal**, v.23, n.6, p.389-402, 2004.

RANDO, A.; Di GREGORIO, P.; RAMUNNO, L.; MARIANI, P.; RIORELLA, A.; SENESE, C.; MARLETTA, D.; MASINA, P. Characterization of the CSN1A^G allele of the bovine α_{s1} -casein locus by insertion of the a relict of a long interspersed element. **Journal Dairy Science**, v.81, p.1735-1742, 1998.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, and T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd Ed.). **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY**. 1989.

STEWART, A. F.; BONNING, J.; BEATTIE, C. W.; SHAH, F.; WILLIS, I. M.; MACKINLAY, A. G. Complete nucleotide sequences of bovine alfa-s2-casein and beta-casein cDNAs: comparisons with related sequences in other species. **Molecular Biology Evolution**, v.4, n.3, p.231-241, 1987.

TRAMONTINA, I.; DEL LAMA, M. A. Milk protein polymorphisms in Brazilian Zebu cattle. **Brasilian Journal of Genetics**, v.20, n.4, p.625-630, 1997.

VAN EENENMANN, A.L.; MEDRANO, J.F. Milk protein polymorphism in California Dairy Cattle. **Journal Dairy Science**, v.74, p.1730-1742, 1991.

WARD, T. J.; HONEYCUTT, R. L.; DERR, J. N. Nucleotide sequence evolution at the kappa-casein locus: evidence for positive selection within the family Bovidae. **Genetics**, v.147, n.4, p.1863-1872, 1997.

ZADWORNY, D.; KUHLEIN, U. – The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoroly Applied Genetics**, v.80, p.631-634, 1990.

CAPÍTULO IV- UTILIZAÇÃO DE POLIMORFISMO DOS GENES CASEÍNAS PARA IDENTIFICAR MISTURA DE LEITE BUBALINO E BOVINO.

Resumo

O queijo *mozzarella*, originário da Itália, é elaborado a partir do leite de búfala, através de um processo de fermentação para redução de pH e precipitação da coalhada. No Brasil, esse produto despertou grande interesse comercial direcionando a maioria da atividade bubalina para produção de leite e conseqüente fabricação de *mozzarella*. Este queijo possui alto valor agregado, permitindo assim, que a indústria remunere de forma diferenciada o leite de búfala em relação ao de origem bovina, o que, pode levar a ocorrência de fraudes. O presente projeto teve por objetivo identificar misturas de leite bovino ao leite de búfala no processo de manufatura de *mozzarella* por marcador molecular. Foram utilizados os genes alfa-s1-caseína (CSN1S1), beta-caseína (CSN2) e kappa-caseína (CSN3K) em tratamentos de *mozzarella* pura de búfala (T1), com misturas adicionais de leite de vaca com porcentagens de 1, 2, 5, 8 e 12 % (T2, T3, T4, T5, T6) e *mozzarella* pura de leite bovino (T7). A técnica de PCR-RFLP, com as endonucleases *Alu I* e *Hinf I*, não gerou diferenças nos padrões para o gene CSN1S1. No gene CSN2 a enzima *Hae III* gerou perfis eletroforéticos distintos, diferenciando o gene bubalino do gene bovino. Utilizando a endonuclease *Hinf I*, os perfis foram idênticos. Para gene CSN3K os perfis eletroforéticos obtidos com as endonucleases *Alu I* e *Hind III*, não permitiram diferenciar o gene bubalino do gene bovino. Os perfis eletroforéticos gerados pela enzima *Hae III* diferenciando o gene bubalino do gene bovino permitiu identificar mistura de leite na manufatura de *mozzarella*.

Palavras-chaves: *Mozzarella*, Misturas de Leite, CSN2, Marcador Molecular, PCR-RFLP, Búfalas.

CHAPTER IV - USE OF POLYMORPHISM OF CASEIN GENES TO IDENTIFY MIXTURE OF BUBALINE AND BOVINE MILK.

Abstract

The cheese mozzarella, originated of Italy, is elaborated from the buffalo milk, through a process of fermentation for reduction of pH and precipitation of the curd. In Brazil, this product has a great commercial advantage directing the majority of the bubaline activity for milk production and consequence manufacture of mozzarella. This cheese have high added value, thus allowing, that the industry remunerates of differentiated form the milk of buffalo in relation to the one of bovine origin, what, it can take the occurrence of frauds. The present project objectified identifies mixtures of bovine milk to the milk of buffalo in the process of manufacture of mozzarella for molecular marker. The genes had been used alpha-s1-casein (CSN1S1), beta-casein (CSN2) and kappa-casein (CSN3K) in treatments with mozzarella made with pure buffalo milk (T1), and additional mixes with bovine milk in different proportions: 1, 2, 5, 8 e 12 % (T2, T3, T4, T5, T6) and mozzarella made with pure bovine milk (T7). The PCR-RFLP technique, with endonucleases *Alu* I and *Hinf* I, did not generate differences in the standards for gene CSN1S1. In gene CSN2 the enzyme *Hae* III generated distinct electrophoresis profiles, differentiating the bubalino gene of the bovine gene. Using endonuclease *Hinf* I, the profiles they had been identical. For gene CSN3K the electrophoresis profiles observed with endonucleases *Alu* I and *Hind* III, do not permit the differentiation among bovine and buffaloes samples. The electrophoresis profiles generated by the enzyme *Hae* III differentiating the bubaline of the bovine gene allowed identifying milk mixture in the manufacture of mozzarella.

Key-words: *Mozzarella*, Milk Mixture, CSN2, Molecular Markers, PCR-RFLP, Female Buffaloes.

Introdução

O queijo *mozzarella* é oriundo da Itália e é elaborado originalmente com leite de búfala (ADDEO, et al. 1995). O processo comumente utilizado para sua elaboração é um método tradicional, onde ocorre a fermentação da massa, que propicia a redução do pH e a precipitação da coalhada. Estas transformações favorecem o processo de filagem e o desenvolvimento das características sensoriais do queijo (CHAPMAN, et al. 1981). Esse hábito de consumo se difundiu para todo o mundo fazendo da *mozzarella* um dos produtos mais imitados.

A população brasileira de búfalos tem aumentado nos últimos anos, e com os conhecimentos atuais dos índices de produtividade e do valor nutritivo do leite de búfala, é evidente a existência de uma pecuária alternativa, tornando o leite de búfala valioso para a elaboração de derivados. Sabe-se que, no leite de búfalas (*Bubalus bubalis*), os teores dos principais constituintes são maiores, quando comparados ao leite de bovinos, variando de 6,87% a 8,59% para gordura e de 3,91% a 4,55% para proteína, podendo ser alterados por meio de seleção (TONHATI, et al. 2000; ROSATI e VAN VLECK, 2002). Esta rica composição confere ao leite de búfalas certas particularidades na produção, rendimento e qualidade dos derivados obtidos. (ROSSI, 1977 e NEVES, 1985).

Com o aumento da demanda de produtos manufaturados, tem-se a necessidade de saber sua origem, bem como a constituição dos mesmos, que os caracteriza, como sendo de uma cidade, estado, região ou país. De acordo com LÓPEZ-CALLEJA et al. (2005), a identificação de produtos é de grande importância para a avaliação e composição dos alimentos, impedindo que ocorram fraudes no processo de produção, como substituição parcial da matéria-prima. A descrição e rotulagem dos alimentos necessitam serem precisas para que então os consumidores possam se informar para sua escolha, incluindo-os em sua dieta (HERMAN, 2001, HERNÁNDEZ, et al. 2003).

Em resposta, para aumentar a demanda e transparência no comércio alimentício, leis foram estabelecidas para produtores, no contexto abordado, a ênfase é para o tipo de leite utilizado na manufatura de queijo ou outros produtos provenientes do leite. O queijo *mozzarella* é originalmente manufaturado a partir

de leite de búfalas (*Bubalus bubalis*), e em alguns países esse tipo de queijo é produzido a partir de leite bovino ou mistura o que, se não informado, pode caracterizar fraudes, quando os mesmos são comercializados como *mozzarella* de búfala (LÓPEZ-CALLEJA *et al.* 2005).

A mais comum alteração na manufatura do queijo, tanto frescal como *mozzarella* é realizada pela adição de leite bovino ao de búfala no processo de produção dos derivados e, conseqüentemente, diversas metodologias de análises para a verificação dessas misturas foram desenvolvidas. O método baseado na eletroforese e cromatografia, com maior destaque para a técnica de IEF (gel electrophoresis) descrita por MOIO *et al.* (1989) e o HPLC (High-performance liquid chromatography) indicada por ADDEO *et al.* (1995) e CATINELLA *et al.* (1997), apresentam bons resultados e possuem a vantagem de estimar a porcentagem de mistura utilizada, no entanto, são lentas e laboriosas.

Face às mudanças, como avanços tecnológicos e o crescimento populacional, nota-se maior demanda pelo aumento na produção de alimentos e na velocidade de comercialização, o que, exige respostas rápidas dos organismos fiscalizadores. Assim, justifica-se a realização de investigações sobre a possibilidade de uso das técnicas de genética molecular, a qual pode proporcionar respostas rápidas para a certificação de produtos de origem animal.

Objetivo

O presente projeto teve por objetivo verificar a possibilidade de identificar misturas de leite bovino ao leite de búfala no processo de manufatura de *mozzarella* por marcador molecular, usando os genes das caseínas.

Material e Métodos

1. Preparação das amostras de mozzarella

Foram elaborados queijos tipo *mozzarella*, utilizando as instalações do Laticínio White Milk, na cidade de Marília – SP. Foram manufacturados 7 tipos de queijo (tratamento) com 30 repetições em cada tratamento e concentrações variadas de leite bovino misturado ao leite de búfalas, como pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1. Relação das porcentagens de leite adicionadas à manufactura de queijo tipo *mozzarella* utilizados para teste de detecção da mistura de leite bovino ao de bubalino.

TRATAMENTO	% LEITE DE VACA AO PROCESSO	
T1	0%	7000 ml leite bubalino
T2	1%	70 ml leite vaca
T3	2%	140 ml leite vaca
T4	5%	350ml leite vaca
T5	8%	560 ml leite vaca
T6	12%	840 ml leite vaca
T7	100%	7000 ml leite de vaca

Após o processo de manufactura das amostras as mesmas foram embaladas a vácuo e acondicionadas à temperatura de 4° C, para posterior extração de DNA, o qual foi resultante das células somáticas devido à escamação do epitélio da glândula mamária e outros tecidos. A cadeia de DNA permanece intacta, por que no processo de preparação da massa a temperatura máxima recebida fica em torno de 45 a 50° C, não afetando a estabilidade do DNA.

2. Extração do DNA genômico

As extrações de DNA das células somáticas existentes na *mozzarella* foram conduzidas conforme metodologia adaptada por OTAVIANO *et al.* (2005).

Pesaram-se 25 mg de *mozzarella* e colocou-se em tudo *ependorf* de 2 ml, em seguida adicionaram-se 200 ul de Nonidet P40 (12,5%). Colocou-se 1000 ul de solução TKM1 [Tris-HCl (1M) pH 7,6; KCl (1M) e EDTA (0,1M) pH 8,0], com um

bastão dissolveu-se a *mozzarella* até uma solução homogênea, e adicionaram-se 200 µl de SDS 20%.

Colocou-se por uma hora em banho-maria a 55° C. Em seguida transferiu-se o sobrenadante para novo tubo *ependorf* de 2 ml. Adicionaram-se 400 µl de NaCl (6M). Centrifugou-se por 15 minutos a 31° C a 14840 x g. Após esse período, transferiram-se 700 µl do sobrenadante para novo tubo *ependorf* (1,5 ml). Adicionaram-se igual volume de etanol 100% gelado.

Centrifugou-se por 15 minutos a 4° C a 14840 x g. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram 1000 µl de etanol 70% gelado. Centrifugou-se por 5 minutos a 4° C a 14840 x g. Após essa fase descartou-se o sobrenadante e inverteu-se o tubo para secar por no mínimo 10 minutos. Adicionou-se 100 µl de TE [Tris-HCl (1M) pH 8,0 e EDTA (0,1 M) pH 8,0] 10:1 filtrado. Ressuspender em temperatura ambiente, por 2 horas, em seguida pode ser manipulado.

3. Reação de Amplificação de DNA por PCR

Foram feitos então, testes preliminares de PCR objetivando-se a otimização das quantidades de reagentes para a amplificação dos fragmentos para os genes das caseínas: alfa-s1 (CSN1S1), beta (CSN2) e kappa (CSN3K), a seqüência dos iniciadores podem ser visualizadas na Tabela 2. As amplificações foram realizadas num volume final de 25 µL, contendo 100 ng das amostras de DNA, 0,5 µM de cada iniciador, 1 X PCR “buffer” [Tris-HCl (10 mM) pH 9,0 e 50 mM KCl], 1,5 mM MgCl₂, 100 µM de dNTPS e 0,5 U de Taq DNA polimerase.

Tabela 2 – Seqüências dos pares de bases dos iniciadores para os genes das caseínas.

Iniciador	Seqüência de bases do iniciador
ALFA 900 F	5'-ATGTTGGGCACCTACTGAC-3'
ALFA 18 R	5'- GGATAGAGCTACATACATAGT-3'
BETA F	5'-GATGAACTCCAGGATAAAATC-3'
BETA R	5'-AATAATAGGGAAGGGTCCCCG-3'
K1	5'-CACGTCACCCACACCCACATTTATC-3'
K2	5'-TAATTAGCCATTTGCCTTCTCTGT-3'

As condições para a obtenção de amplificação dos fragmentos a serem estudados seguiram a programação em termociclador modelo PTC-100 MJ[®]: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos (95°C por 60 segundos; _°C por 60 segundos; 72°C por 60 segundos) e 72°C por 5 minutos finais.

Para cada fragmento do gene das caseínas, há uma temperatura ideal de pareamento:

Alfa-s1-caseína: 49° C

Beta-caseína: 59° C

Kappa-caseína: 56° C

Na etapa seguinte, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com brometo de etídio (0,05 µg/mL) a 100V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Logic (Kodak[®]).

4. Técnica de PCR-RFLP

Os fragmentos dos genes das caseínas, amplificados a partir dos iniciadores (Tabela 1), foram submetido à técnica de PCR-RFLP, que consiste na digestão por enzimas (endonucleases) de restrição (Tabela 3), as quais reconhecem seqüências específicas de bases no DNA, onde a alteração de um par de bases pode criar ou abolir um sítio de restrição em um determinado locus, gerando um polimorfismo. Desta forma, se o DNA for digerido com a enzima de restrição adequada, o *locus* polimórfico pode ser observado pela alteração no tamanho dos fragmentos de DNA obtidos.

Tabela 2 – Endonucleases de restrição utilizadas para a técnica de PCR-RFLP nos fragmentos dos genes das caseínas.

FRAGMENTO	ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO			
	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Hinf</i> I
CSN1S1	*	**	**	*
CSN2	**	*	**	*
CSN3K	*	**	*	**

* endonuclease de restrição utilizada na digestão.

** endonuclease de restrição não utilizada na digestão.

Foram realizadas reações de digestão para os fragmentos das caseínas, e na Tabela 4 está indicado às seqüências de clivagem.

Tabela 4 – Sítio de clivagem das endonucleases de restrição utilizadas para a técnica de PCR-RFLP nos fragmentos dos genes das caseínas.

ENDONUCLEASE	POSIÇÃO DE CLIVAGEM 5' - 3' e 3' - 5'	
Alu I	5'-AG↓CT-3'	3'-TC↑GA-5'
Hae III	5'-GG↓CC-3'	3'-CC↑GG-5'
Hind III	5'-A↓AGCTT-3'	3'-TTCGA↑A-5'
Hinf I	5'-G↓ANTC-3'	3'-CTNA↑G-5'

As amostras totais de *mozzarella* de todos dos tratamentos foram digeridos por 1 hora à 37°C em termocicladores PTC-100 MJ Research[®]. Após esta etapa, 10 µL de cada uma das amostras digeridas foram submetidas à eletroforese. Os fragmentos maiores, em gel de agarose (3%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com brometo de etídio (0,05 µ/mL) a 100V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

As amostras dos fragmentos de PCR com menor tamanho, após a digestão, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 3% com voltagem de 100V. A visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel fotodocumentado em aparelho Gel-Logic (Kodak[®]).

Resultados e Discussão

1. Reação de Amplificação de DNA por PCR

Por meio da PCR, amplificaram-se os fragmentos dos genes das caseínas (CSN1S1, CSN2 e CSN3K), conforme Figura 2.

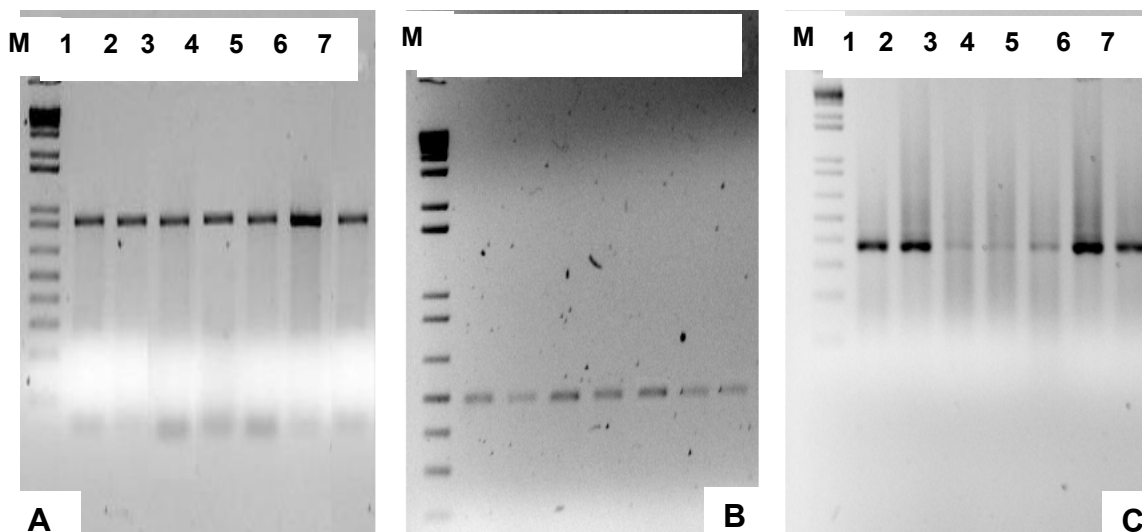


Figura 2 – Eletroferograma representativo das amostras dos fragmentos amplificados dos genes das caseínas a partir do DNA extraído das células somáticas presente na *Mozzarella*. **A** é o fragmento da CSN1S1 com 954 pb. Amostras 1 - T1, 2 - T2, 3 - T3, 4 - T4, 5 - T5, 6 - T6 e 7 - T7. **B** é o fragmento da CSN2 com 495 pb. Amostras 1 - T1, 2 - T2, 3 - T3, 4 - T4, 5 - T5, 6 - T6 e 7 - T7. **C** é o fragmento da CSN3K com 373 pb. Amostras 1 - T1, 2 - T2, 3 - T3, 4 - T4, 5 - T5, 6 - T6 e 7 - T7. **M** é o marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder.

2. Técnica de PCR-RFLP

O fragmento de 954 pb do gene da alfa-s1-caseína digerido pelas endonucleases de restrição *Alu I* e *Hinf I*, não apresentaram diferenças nos padrões eletroforéticos, resultando em fragmentos de tamanhos iguais, tanto para as *mozzarellas* dos tratamentos 1 (100% leite bubalino) em relação ao tratamento 7 (100% leite bovino), e também para os tratamento com misturas de leite bovino ao de bubalino (2, 3, 4, 5 e 6). O resultado pode ser visualizado na Figura 3.

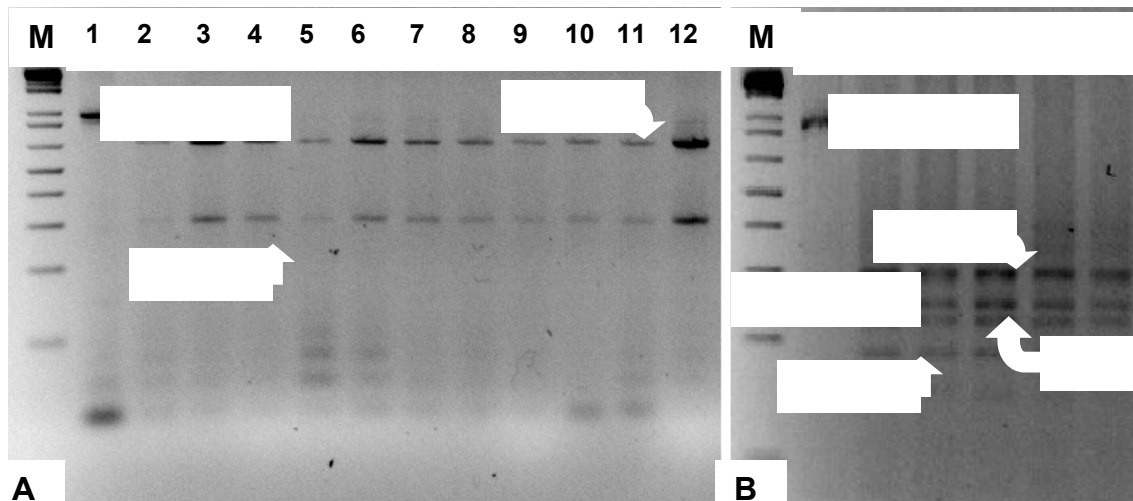


Figura 3 – Eletroferograma representativo das amostras dos tratamentos 1 ao 7 de misturas de leite nas *mozzarella*. **A** é o fragmento da CSN1S1 com 954 pb, digerido pela endonuclease *Alu* I. Amostras: 1 – produto de 954 pb controle não digerido, 2 e 3 - T1, 4 e 5 – T2, 6 e 7 – T3, 8 e 9 – T4, 10 – T5, 11 – T6 e 12 – T7. **B** é o fragmento da CSN1S1 com 954 pb, digerido pelas endonucleases de restrição *Hinf* I. Amostras: 1 – produto de 954 pb controle não digerido, 2 – T1, 3 a 5 representa T2 a T6 e 6 – T7. **M** é o marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder.

No fragmento do gene da CSN2 com 495 pb, quando digerido com a endonuclease *Hae* III, em búfalos resultam dois fragmentos sendo, 436 e 59 pb. Em bovinos a restrição pela *Hae* III, resulta em três fragmentos com 373, 63 e 59 pb. Essa diferença indica que essa região é um indicador para investigar a mistura de leite bovino ao bubalino no processo de manufatura de *mozzarella*. Pela figura 4, pode-se visualizar o padrão dos fragmentos gerados após a restrição pela endonuclease *Hae* III, em todos os tratamentos de 1 a 7.

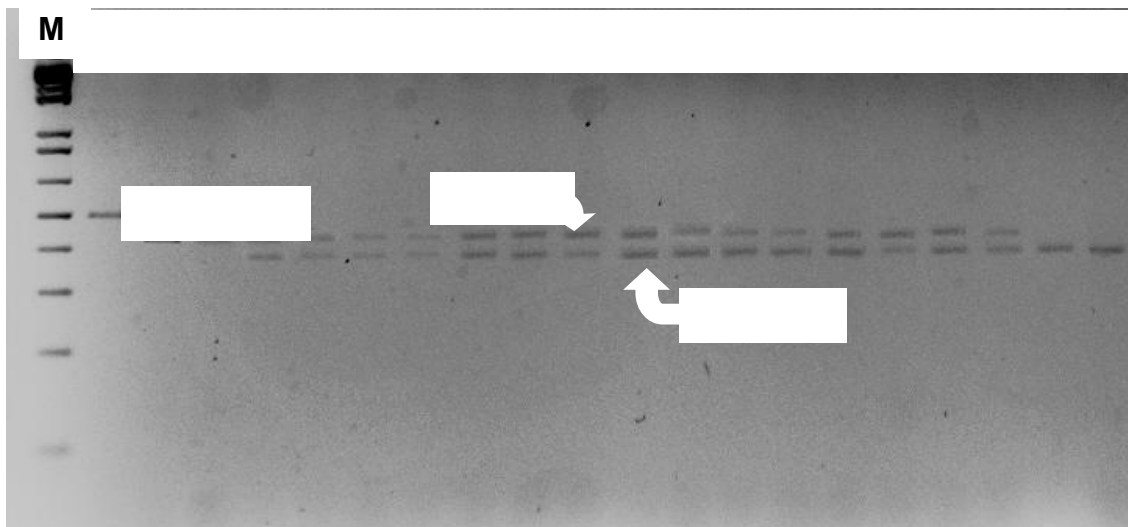


Figura 4 – Eletroferograma representativo das amostras dos tratamentos 1 ao 7 de misturas de leite nas *mozzarella*, referente ao fragmento de 495 pb do gene CNS2, digerido pela endonuclease *Hae* III. Amostra: 1 – produto de 954 pb controle não digerido, 2 e 3 - T1, 4 a 6 – T2, 7 a 9 – T3, 10 a 12 – T4, 13 a 15 - T5, 16 a 18 - T6 e 19 e 20 – T7. **M** é o marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder.

A técnica de PCR-RFLP - *Hinf* I no fragmento de 495 pb do gene da CSN2 detectou dois sítios de clivagem, fragmentando em três padrões eletroforéticos, com 249, 152 e 94 pb. Esse padrão foi visualizado em todas as amostra de DNA dos tratamentos de 1 a 7 avaliados para a verificação de presença de leite bovino misturado ao de bubalino para a fabricação de *mozzarella*. Na figura 5, pode-se visualizar os fragmentos resultantes após a digestão.

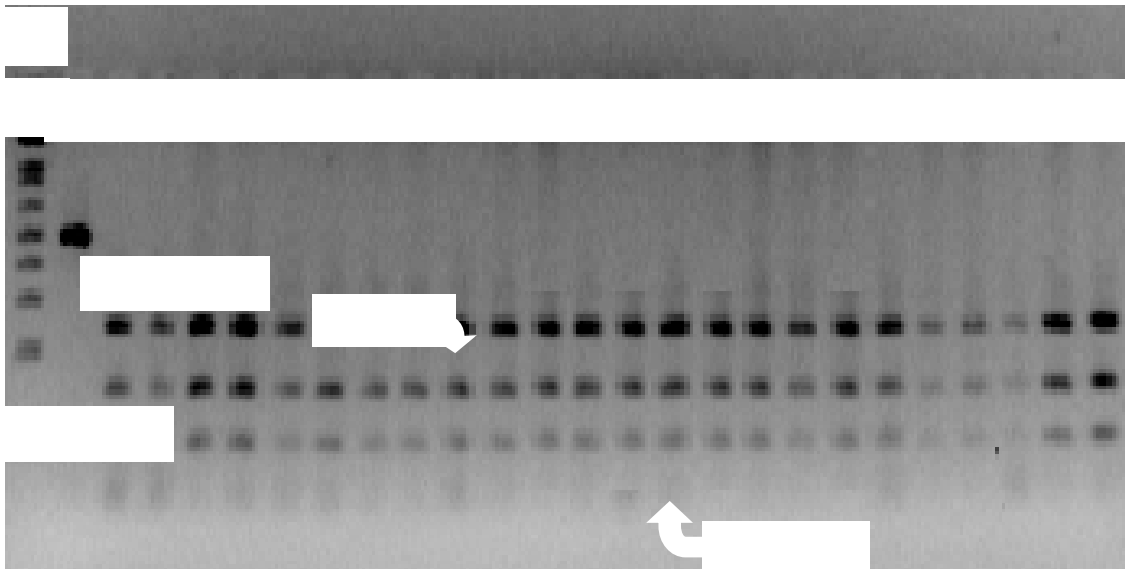


Figura 5 – Eletroferograma representativo das amostras dos tratamentos 1 ao 7 de misturas de leite nas *mozzarella*, referente ao fragmento de 495 pb do gene CNS2, digerido pela endonuclease *Hinf* I. Amostra: 1 – produto de 954 pb controle não digerido, 2 a 5 - T1, 6 a 8 – T2, 9 a 11 – T3, 12 a 14 – T4, 15 a 17 - T5, 18 a 20 - T6 e 21 a 25 – T7. **M** é o marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder.

No gene da CSN3K, as endonucleases de restrição *Alu* I e *Hind* III, não diferenciaram através da restrição o gene da kappa-caseína com 373 provenientes de bovino e bubalino, caracterizando o mesmo perfil eletroforético, que resultou em bandas de 222, 139 e 12 pb para a *Alu* I e com 224 e 149 para a *Hind* III. Os padrões eletroforéticos gerado pelas duas endonucleases referidas podem ser visualizados na figura 6.

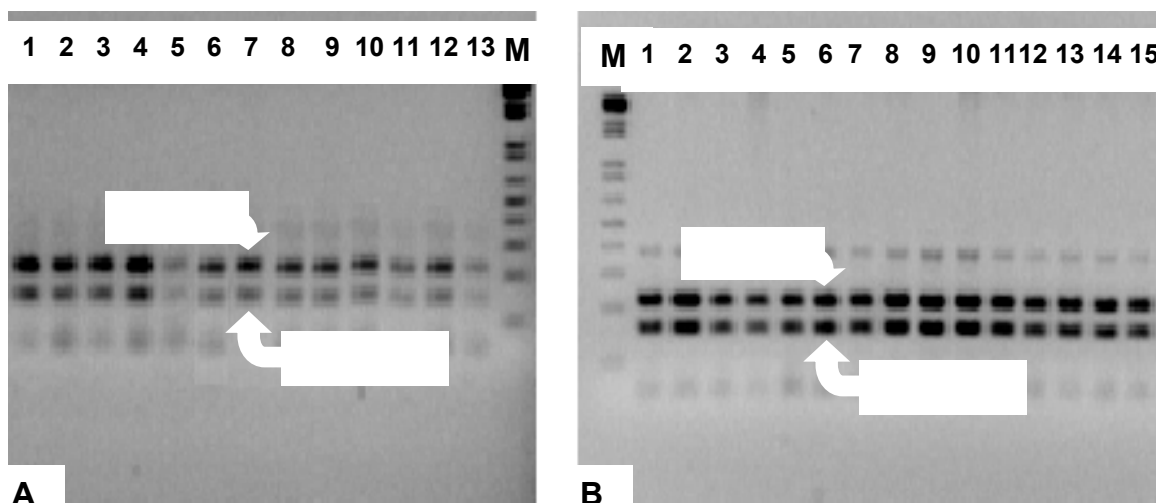


Figura 6 – Eletroferograma representativo das amostras dos tratamentos 1 ao 7 de misturas de leite nas *mozzarella*, referente ao fragmento de 373 pb do gene CNS3K. **A** é a digestão pela endonuclease *Alu* I, que gerou fragmentos de 222, 139 e 12 pb. Amostra: 1 e 2 – T1, 3 e 4 – T2, 5 e 6 – T3, 7 e 8 – T4, 9 e 10 – T5, 11 e 12 – T6 e 13 – T7. **B** é a digestão pela endonuclease de restrição *Hind* III, que gerou fragmentos de 224 e 149 pb. Amostra: 1 e 2 – T1, 3 e 4 – T2, 5 e 6 – T3, 7 e 8 – T4, 9 e 10 – T5, 11 e 12 – T6 e 13 e 15 – T7. **M** é o marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder.

As análises de PCR-RFLP aplicadas aos tratamentos elaborados para estudo de misturas de leite bovino ao de leite bubalino no processo de manufatura de *mozzarella*, permitiram a verificação de que os genes das caseínas CSN1S1 (intron VIII, exon IX e intron IX) e CSN3K (exon IV) nas regiões estudadas, não são indicados para o objetivo de verificação de fraude, visto que, essas regiões estudadas, tanto para búfalos como para bovinos apresentam o mesmo perfil eletroforético, não diferenciando os genes.

No gene da CSN2, na região estudada do exon VII, a análise de PCR-RFLP, permitiu a verificação de diferenças nos fragmentos gerados após restrição com a endonuclease *Hae* III mesmo que em baixas concentrações de leite bovino, adicionado ao processo de manufatura da *mozzarella*. Dos oligonucleotídeos utilizados para tal procedimento de isolamento da região gênica e quando aplicado à técnica de PCR-RFLP *Hae* III, pode ser utilizado para a verificação da fraude, que se caracteriza pela mistura de leite bovino ao de bubalino.

O procedimento para verificação de fraude pela técnica molecular, enriquece os métodos já existentes para tal fim, no entanto, os procedimentos, até então utilizados, trabalham com a investigação da proteína, com técnicas

onerosas e trabalhosas, como, cromatografia gasosa, líquida, espectrofotometria de massa (COZZOLINO, et al. 2002). O uso da molecular pode auxiliar com maior precisão nos laudos finais, visando assim, uma rápida resposta para sobre a suspeita de fraude e também por um menor custo.

Conclusão

O gene da beta-caseína (CSN2), na região do exon VII, pela técnica de PCR-RFLP *Hae* III, é o indicado para a aplicação na identificação de mistura de leite bovino ao de bubalino no processo de manufatura de queijo tipo *mozzarella*.

Referências Bibliográficas

ADDEO, F.; GARRO, G.; INTORCIA, N.; PELLEGRINO, L.; RESMINI, P.; CHIANESE, L. Gel electrophoresis for the detection of casein proteolysis in cheese. **Journal Dairy Science**. 62(2): 297-309. 1995.

CATINELLA, S.; TRALDI, P.; PINELLI, C.; DALLATURCA, E.; MARSILIO, R. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in milk science. **Rapid Common Mass Spectrometry**, v.11, n.3, p.330, 1997.

CHAPMAN, H.R.; SHARPE, M.E. Microbiology of cheese. **Dairy Microbiology.: Applied Sciences Publishers**, London, p.157-243, 1981.

COZZOLINO, R.; PASSALACQUA, S.; SALEMI, S.; GAROZZO, D. Identification of adulteration in water buffalo *mozzarella* and in ewe cheese by using whey proteins as biomarkers and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.37, n.9, p.985-991, 2002.

HERMAN, L. Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.420-436, 2001.

HERNANDEZ, M.; FERRANDO, A.; ESTEVE, T.; PUIGDOMÈNECH, P.; PRATE, S., & PLA, M. Real-time and conventional polymerase chain reaction systems based on the metallo-carboxypeptidase inhibitor gene for specific detection and quantification of potato and tomato in processed food. **Journal of Food Protection**, v.66, p.1063-1070, 2003.

LOPES-CALLEJA, I.; GONZÁLEZ ALONSO, I.; FAJARDO, V.; RODRÍGUEZ, M.A.; HERNÁNDEZ, P.E.; GARGÍA, T.; MARTÍN, R. PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and *mozzarella* cheese. **International Dairy Journal**, v.25, p.1122-1129, 2005.

MOIO, L.; DI LUCCIA, A.; ADDEO, F. Fast isoelectric focusing of milk proteins on small ultrathin polyacrylamide gels containing urea. **Electrophoresis**, v.10, n.7, p.533-535, 1989.

NEVES, N.L.B. Contribuição da bubalinocultura para a produção leiteira. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.de; FARIA, V.D. de. Caracterização e implementação de uma política para o leite. **FEALQ**, Piracicaba, p.37-45, 1985.

OTAVIANO, A. R.; TONHATI, H.; SENA, J. A. D.; LIMA, A. L. F.; BOTTGER, G.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A.; CARDONA, H. C. Extração de DNA a partir de queijos *mozzarella* produzido com leite de búfalas com vistas às provas para a identificação de misturas com leite de vaca. **Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes**, v.60, p3-6, 2005.

ROSATI, A.; VAN VLECK, L.D. Estimation of genetics parameters for milk, fat, protein and *mozzarella* cheese production for the Italian river buffalo *Bubalus bubalis* population. **Livestock Production Sciences**, v.74, p.185-190, 2002.

ROSSI, G. Manuali di tecnologia casearia. **Agriculture**, Bologna, p.684, 1977.

TONHATI, H.; MUÑOZ, M. F. C.; OLIVEIRA, J. A.; DUARTE, J. M. C.; FURTADO, T. P.; TSEIMAZIDES, S. P. Parâmetros genéticos para a produção de leite, gordura e proteína em bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.6, p.2051-2056, 2000.

IMPLICAÇÕES

O uso de marcadores moleculares para a investigação de fraude, através dos genes das caseínas, pode ser uma alternativa mais rápida e menos custosa para o produtor e também para o consumidor. A essa questão, o gene da beta-caseína (CSN2), na região do exon VII estudada no presente estudo, indica-o como um forte candidato.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)