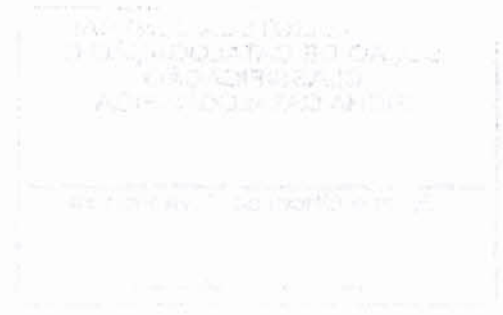


ANA LÚCIA PUERRO DE MELO

**EFEITO DE POLIMORFISMO NOS LOCI *CSN1S1*, *GH*, *DGAT1* E  
*POU1F1* SOBRE OS VALORES GENÉTICOS DE PRODUÇÃO E  
COMPOSIÇÃO DO LEITE DE CABRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2012



**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M528e  
2012

Melo, Ana Lúcia Puerro de, 1984-  
Efeito de polimorfismo nos loci *CSN1S1*, *GH*, *DGATI* e  
*POUIF1* sobre os valores genéticos de produção e  
composição do leite de cabra / Ana Lúcia Puerro de Melo –  
Viçosa, MG, 2012.  
vii, 90f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Robledo de Almeida Torres.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Caprino - Genética. 2. Caprino - Melhoramento genético.  
3. Leite de cabra. 4. Polimorfismo (Genética). I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.390821

ANA LÚCIA PUERRO DE MELO

**EFEITO DE POLIMORFISMO NOS LOCI CSN1S1, GH, DGAT1 E  
POU1F1 SOBRE OS VALORES GENÉTICOS DE PRODUÇÃO E  
COMPOSIÇÃO DO LEITE DE CABRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção do título de  
*Doctor Scientiae*

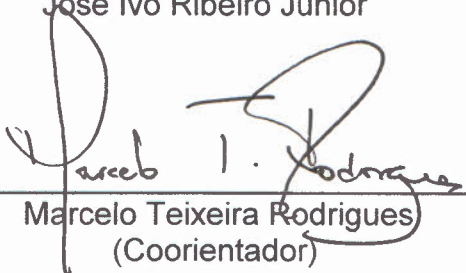
APROVADA: 18 de julho de 2012.



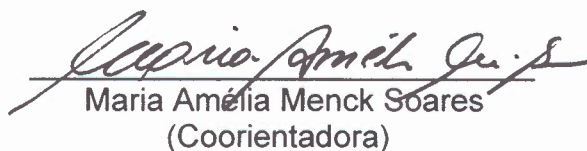
José Ivo Ribeiro Júnior



Eliane Gasparino



Marcelo Teixeira Rodrigues  
(Coorientador)



Maria Amélia Menck Soares  
(Coorientadora)



Robledo de Almeida Torres  
(Orientador)

**Aos meus pais William e Lúcia Eliza, minha irmã Cecília e à  
minha “família” viçosense Tia Branca, Tio Júlio, Íris e Abelardo;**

**Dedico este trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, professor Robledo de Almeida Torres, e aos coorientadores, professores Maria Amélia Menck Soares, Marcelo Teixeira Rodrigues e Fabyano Fonseca e Silva, pela paciência, dedicação e amizade. Aos demais membros da banca de defesa de tese, Prof. José Ivo Ribeiro Júnior e Prof<sup>a</sup>. Eliane Gasparino. E a todos os professores da Universidade Federal de Viçosa que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Aos meus pais, Willian e Lúcia Eliza, por todo apoio e incentivo que sempre me deram. À minha irmã Cecília, pelo companheirismo e amizade, mesmo à distância. A todos os meus demais familiares, pela torcida e carinho.

Ao meu companheiro de todas as horas, Abelardo, pela força nos momentos mais difíceis. À Tia Branca, Tio Júlio e Íris pelo apoio e amizade que me deram desde a graduação.

A todos os amigos de Viçosa e Seropédica, Adriana, Amanda, Denise, Edson, Érica, Francisco, Felipe, Geraldo, Gilberto, Gilson, Giovani, Hinayah, Leonardo, Laís, Lidiane, Luanna, Luiz, Magna, Mariele, Mário, Marjorie, Míriam, Nadson, Odair, Ramon, Rodrigo, Tadeu, Víctor e Yara pelo apoio e amizade.

A todos os colegas, amigos e funcionários do departamento de Zootecnia e do setor de Caprinocultura, pelo apoio e convívio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

ANA LÚCIA PUERRO DE MELO, filha de William Martins de Melo e Lúcia Eliza Puerro de Melo, nascida em 24 de Janeiro de 1984, em Araçatuba, estado de São Paulo, Brasil.

Em 2002, iniciou o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa – MG, graduando-se em 2007.

Em Março de 2007, ingressou no Programa de pós-graduação em Zootecnia - Área de Melhoramento Animal, na Universidade Federal de Viçosa – MG, obtendo título de *Magister Scientiae* em 15 de Fevereiro de 2009, sob orientação do Prof. Dr. Robledo de Almeida Torres.

Em Março de 2009, iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa – MG, tendo realizado parte das análises na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - RJ, sob a coorientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Amélia Menck Soares.

Em Julho de 2012, submeteu-se aos exames finais de defesa de tese para obtenção do título de *Doctor Scientiae* em Genética e Melhoramento, sob orientação do Prof. Dr. Robledo de Almeida Torres.

## RESUMO

MELO, Ana Lúcia Puerro de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Efeito de polimorfismo nos loci *CSN1S1*, *GH*, *DGAT1* e *POU1F1* sobre os valores genéticos de produção e composição do leite de cabra.** Orientador: Robledo de Almeida Torres. Coorientadores: Fabyano Fonseca e Silva, Marcelo Teixeira Rodrigues e Maria Amélia Menck Soares.

Objetivamos com este trabalho, verificar se os polimorfismos nos genes *CSN1S1*, *GH*, *DGAT1* e *POU1F1* de caprinos estão associados com a produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, contagem de células somáticas, produção e porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite. Para este propósito foram consideradas 2173 lactações de 1064 cabras de grupamentos genéticos das raças Saanen e Alpina, pertencentes ao rebanho do Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa, utilizadas para estimar os valores genéticos dos animais para estas características. O modelo animal utilizado continha os efeitos aleatórios de animal e de ambiente permanente; e os efeitos fixos de grupo contemporâneo, tipo de parto, grupamento genético e ordem de parto. Foram obtidos os genótipos de 215, 184, 104 e 182 fêmeas, respectivamente, para *CSN1S1*, *GH*, *DGAT1* e *POU1F1*. Para verificar os efeitos dos genótipos sobre os valores genéticos das características, foram realizadas análises de variância, estimativas de contrastes e comparações de médias pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Observou-se associação entre os diferentes genótipos do *CSN1S1* e os valores genéticos da maioria das características avaliadas. Além disso, foram encontradas evidências de efeitos de sobredominância entre os alelos no genótipo AE para duração da lactação, produções de proteína, lactose e extrato seco total e porcentagem de gordura no leite. Nenhum efeito dos genótipos do *GH* e *POU1F1* sobre os valores genéticos das características de produção e qualidade do leite de cabra foi observado. O polimorfismo VNTR identificado na região promotora do gene *DGAT1* teve influência sobre a duração da lactação, sendo que o alelo com maior número repetições em tandem apresentou uma associação positiva com esta característica.

## ABSTRACT

MELO, Ana Lúcia Puerro de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Effects of polymorphisms in *CSN1S1*, *GH*, *DGAT1* and *POU1F1* loci on breeding values of goat milk production and composition.** Adviser: Robledo de Almeida Torres. Co-advisers: Fabyano Fonseca e Silva, Marcelo Teixeira Rodrigues and Maria Amélia Menck Soares.

The aim with this work was verify if polymorphisms in the goat *CSN1S1*, *GH*, *DGAT1* e *POU1F1* genes are associated with milk production until 270 days of lactation, lactation length, somatic cell count, production and percentages of fat, protein, lactose and total dry extract in milk. For this purpose were considered 2173 lactations of 1064 Saanen and Alpine goats, belonging to the Goat sector of Federal University of Viçosa, used to estimate breeding values for these characteristics. The animal model used contained the random effects of animal and permanent environment, and the fixed effects of contemporary group, type of kidding, genetic grouping, and kidding order. Genotypes were obtained from 215, 184, 104 and 182 females, respectively, for *CSN1S1*, *GH*, *DGAT1* and *POU1F1*. To check the effects of genotypes on breeding values of the characteristics, analyzes of variance, estimates of contrasts and comparisons of means by Tukey test ( $\alpha=0.05$ ) were performed. Association was observed between the different genotypes of *CSN1S1* and genetic values of most traits. In addition, evidence was found of overdominance effects among alleles in the AE genotype for lactation length, production of protein, lactose and total dry extract and fat percentage in milk. No effect of *GH* and *POU1F1* genotypes on breeding values of production and quality characteristics of goat milk was observed. The VNTR polymorphism identified in the promoter region of the *DGAT1* gene had an influence on the duration of lactation, and the allele with more tandem repeats showed a positive association with this traits.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REVISÃO DE LITERATURA .....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17

### **CAPÍTULO 1**

Influência do polimorfismo no gene <i>CSN1S1</i> sobre a produção e composição do leite de cabra	
Resumo .....	26
Abstract .....	28
Introdução .....	30
Material e Métodos .....	31
Resultados e Discussão .....	37
Conclusões .....	48
Referências Bibliográficas .....	49

### **CAPÍTULO 2**

Influência do polimorfismo no gene do hormônio de crescimento ( <i>GH</i> ) sobre a produção e composição do leite de cabras	
Resumo .....	52
Abstract .....	54
Introdução .....	56
Material e Métodos.....	58
Resultados e Discussão .....	59
Conclusão .....	63
Referências Bibliográficas .....	64

### **CAPÍTULO 3**

Influência do polimorfismo na região promotora do gene *DGAT1* sobre a produção e composição do leite de cabras

Resumo .....	66
Abstract .....	68
Introdução .....	69
Material e Métodos .....	70
Resultados e Discussão .....	72
Conclusão .....	75
Referências Bibliográficas .....	76

### **CAPÍTULO 4**

Influência do polimorfismo no gene *POU1F1* sobre a produção e composição do leite de cabra

Resumo .....	78
Abstract .....	80
Introdução .....	82
Material e Métodos .....	83
Resultados e Discussão .....	84
Conclusão .....	88
Referências Bibliográficas .....	88

CONCLUSÕES GERAIS .....	90
-------------------------	----

## INTRODUÇÃO GERAL

A investigação de polimorfismos gênicos pode possibilitar a descoberta de importantes associações com características de interesse econômico na produção animal, como por exemplo, a produção de leite. Desta forma, estas informações podem auxiliar na seleção dos animais mais produtivos e permitir melhor planejamento dos acasalamentos.

Entre os genes que são alvos de estudo por suas associações com a produção e composição de leite pode-se citar os genes da  $\alpha_{s1}$ -caseína, da enzima diacilglicerol aciltransferase 1, do hormônio do crescimento e do fator de transcrição POU1F1.

As caseínas constituem aproximadamente 80% do total de proteínas no leite e, entre as caseínas, a  $\alpha_{s1}$ - caseína representa mais de 40% no leite bovino (FARRELL et al., 2004), enquanto no leite de cabra pode variar de 0 a 25% devido à ocorrência de polimorfismo no gene *CSN1S1* (BOULANGER et al., 1984). O reconhecimento dos principais genes relacionados a efeitos sobre a produção e composição de proteínas do leite, mais precisamente, à composição de caseínas do leite tem direcionado inúmeras pesquisas nesta área, sendo que maior atenção tem sido dada ao gene da  $\alpha_{s1}$ -caseína (BARILLET, 2007).

O gene *DGAT1* codifica a enzima diacilglicerol aciltransferase 1, que catalisa a reação final da síntese de triacilglicerídeos nos adipócitos, os quais são os principais componentes da gordura de depósito, inclusive no leite (CASES et al., 1998; KÜHN et al., 2004). O efeito de um polimorfismo no gene *DGAT1* bovino sobre a composição do leite (GRISART et al., 2004) e a identificação de um QTL (*Quantitative Trait Loci*) para o conteúdo de gordura do leite no cromossomo 9 de ovinos (BARILLET et al., 2005), o qual é ortólogo à região do cromossomo 14 de bovinos que contém o gene *DGAT1*, justifica o interesse em caracterizar a sequência deste gene em caprinos e identificar polimorfismos que poderiam ser utilizados em estudos de associação com características do leite e do queijo.

O hormônio do crescimento (GH) influencia uma série de características relacionadas ao crescimento e desenvolvimento do animal, de forma que a algum tempo, suspeita-se que o GH pode contribuir para o desenvolvimento da glândula mamária e na estimulação da produção de

leite. O hormônio do crescimento poderia desempenhar um papel na estabilização do número de células secretoras ou por aumentar a função destas células (BAUMAN e VERNON, 1993).

O POU1F1 (*Pituitary-specific positive transcription factor 1*) é expresso principalmente na hipófise, sendo um regulador do hormônio do crescimento, da prolactina e do hormônio estimulador da tireóide  $\beta$  em mamíferos. Pelo menos 18 diferentes mutações já foram relatadas, dispersas nos seis exons deste gene. Devido à importância deste gene no controle da expressão gênica de hormônios diretamente associados ao processo de crescimento e produção de leite, é possível considerá-lo como um bom candidato para a seleção assistida por marcadores (BASTOS et al., 2006).

As associações destes genes com as características do leite já foram observadas, principalmente em bovinos. No entanto, nem todos polimorfismos identificados em bovinos também estão presentes em caprinos, havendo também uma variação entre raças da mesma espécie. Assim, estudos que verifiquem a existência de possíveis associações entre variações moleculares e características economicamente importantes em caprinos, principalmente em sistemas de criação brasileiros, são de grande importância. Objetivamos com este trabalho, verificar se os polimorfismos nos genes *CSN1S1*, *GH*, *DGAT1* e *POU1F1* de caprinos estão associados com a produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, contagem de células somáticas, produção e porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite.

## REVISÃO DE LITERATURA

### ***A qualidade do leite de cabras***

No Brasil, os principais produtos explorados na caprinocultura são concentrados na produção de carne, pele e leite, sendo que recentemente, o mercado de leite de cabra vem experimentando uma expansão formal nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do país (LÔBO et al., 2010). Um dos motivos desta expansão possivelmente são as qualidades nutricionais e terapêuticas do leite de cabras, o que faz com que este seja considerado um alimento funcional. Abaixo estão relacionados alguns estudos que indicam as propriedades favoráveis do leite de cabra como fonte de nutrientes na alimentação humana.

De acordo com revisão apresentada por SILANIKOVE et al. (2010), estudos *in vitro* confirmam um padrão de digestão diferente das proteínas do leite de cabra comparado com as proteínas do leite de vaca. JASINSKA (1995) mostrou que 96% da caseína do leite de cabra foi completamente hidrolisada *in vitro* por tripsina comparado a 76-90% no leite de vaca, além disso, após o tratamento com suco gástrico e duodenal humano, apenas uma pequena quantidade (~23%) da lactoglobulina do leite de cabra não foi digerida, em comparação com 83% no leite de vaca (ALMAAS et al., 2006). Já no que se refere aos teores de gordura, estudos em animais e humanos indicam que a gordura do leite de cabra é utilizada de forma mais eficiente do que a gordura do leite de vaca (HACHELAF et al., 1993; ALFEREZ et al., 2001). Esta característica do leite de cabra está provavelmente relacionada à maior proporção de ácidos graxos de cadeia média no leite de cabra, enquanto no leite de vaca é verificada maior quantidade ácidos graxos de cadeia longa.

Outra propriedade favorável foi indicada por BELLIONI-BUSINCO et al. (1999) os quais observaram que em média foi necessário uma quantidade 5 vezes maior de leite de cabra para desencadear uma reação adversa, em relação ao leite de vaca, fornecendo suporte para uma possível diferença no potencial alergênico entre estes leites. BEVILACQUA et al. (2001) sugeriu que a alergenicidade reduzida de leite de cabra pode estar diretamente relacionada com os níveis mais baixos de  $\alpha_{s1}$ -caseína.

A alergenicidade relativamente menor, a maior digestibilidade e os benefícios fisiológicos do leite de cabra descrito por PROSSER et al. (2004) e LARA-VILLOSLADA et al. (2006), sugerem que a alimentação à base de leite de cabra pode revelar-se vantajosa em determinadas situações estressantes, ou para pessoas que sofrem com alergia ao leite de vaca ou doenças pró-inflamatórias intestinais.

No entanto, para assegurar os benefícios nutricionais do leite de cabra é importante que este seja produzido de forma que garanta um produto final de qualidade. A qualidade do leite de cabra é determinada basicamente por dois fatores: o controle microbiológico e os teores dos constituintes do leite. O controle microbiológico está ligado principalmente à sanidade do sistema mamário, indicada pela contagem de células somáticas, e a higiene durante a obtenção e processamento do leite. Os teores dos constituintes do leite são quantificados por análises laboratoriais e estão relacionados à genética e a fatores ambientais, como a nutrição do animal (BRITO et al., 2011).

Em bovinos, a contagem de células somáticas (CCS) é amplamente utilizada para avaliar a qualidade e a forma de pagamento do leite, devido a elevada CCS ser uma consequência de processos inflamatórios causados por infecções intramamárias. A CCS no leite de cabras também é considerada um marcador sensível do estado de saúde do úbere (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2005, 2007), no entanto o nível basal de CCS em úberes saudáveis de cabras (~300.000 células/mL) e ovinos (~200.000 células/mL) é maior do que em vacas (~70.000 células/mL), uma vez que a secreção de leite em cabras ocorre por um processo apócrino, ou seja, parte do conteúdo citoplasmático das células epiteliais mamárias é eliminado durante a secreção do leite (NEVEU et al., 2002). Isto significa que um sistema de classificação com base na CCS em caprinos e ovinos devem ser adequado à situação particular dessas duas espécies (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007).

Segundo RIBEIRO (2008), a maioria do leite de cabra comercializado na forma fluida no Brasil não é remunerada por sua composição química e qualidade microbiológica. No entanto, apesar de alguns produtores brasileiros ainda não receberem efetivamente pela composição do leite, esta

é uma tendência mundial e, portanto, um aspecto que deve ser considerado nos programas de melhoramento genético no Brasil.

### ***O melhoramento de caprinos leiteiros no Brasil***

O Brasil possui cerca de 10 milhões de caprinos e produz anualmente 135 milhões de litros de leite de cabra, sendo o maior produtor do continente americano (FAO, 2008). No entanto muitos sistemas de criação não são eficientes e apresentam baixos índices de produtividade. A eficiência dos sistemas de criação de cabras depende de uma série de fatores como sanidade, nutrição, instalações, manejo, ambiente e genética.

De acordo com LÔBO et al. (2010), entre as ações necessárias para promover o crescimento e desenvolvimento da produção animal, o melhoramento genético é uma das que merece maior atenção, de forma que a seleção e multiplicação de genótipos apropriados para os diversos sistemas de produção do país são necessárias para o desenvolvimento do setor de caprinocultura do Brasil. No entanto, de acordo com estes autores, a maioria dos criadores não coleta nenhum dado sobre o desempenho do animal e não havendo disponibilidade de dados sobre pedigree, produção de leite, e pesos, sendo esta uma das maiores limitações para o desenvolvimento de um programa de melhoramento de caprinos.

De acordo com VAN DER WERF (2009) a maioria dos programas de melhorando de caprinos dos países em desenvolvimento, quando existem, são em uma escala pequena e com objetivos modestos. Normalmente, o desafio é promover o fluxo de informações (medição e avaliação), bem como o fluxo de genes (distribuição do melhoramento nos rebanhos). Estes processos são frequentemente inibidos por questões de infraestrutura, logística e socioeconômica, de forma que apesar de a tecnologia de marcadores genéticos não ser uma prioridade em muitos desses programas, se houver benefícios econômicos, os testes gênicos podem ser bastante úteis e auxiliar na avaliação das características.

Assim, pesquisas na área de melhoramento animal que identifiquem marcadores genéticos associados às características produtivas de interesse econômico podem auxiliar na seleção de animais geneticamente superiores pela análise da sequência do DNA. Uma das técnicas utilizadas para

alcançar este objetivo é a análise da existência de genes polimórficos no genoma dos animais, os chamados genes candidatos. Entre os genes que são alvos de estudo por suas associações com a produção e composição de leite pode-se citar os genes da  $\alpha_{s1}$ -caseína, da enzima diacilglicerol aciltransferase 1, do hormônio do crescimento e do fator de transcrição POU1F1, sendo fornecidas algumas informações sobre estes genes e seus polimorfismos a seguir.

### **A $\alpha_{s1}$ -caseína**

As caseínas constituem aproximadamente 80% do total de proteínas no leite, são as únicas proteínas coagulantes e podem ser divididas em dois grupos: um que precipita na presença de cálcio, as caseínas cálcio-sensíveis ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ , e  $\beta$ -caseína), e as que não precipitam, as cálcio-insensíveis ( $\kappa$ -caseínas), estas possuem o papel de manter a estabilidade e integridade da estrutura das micelas. Os genes que codificam as caseínas estão localizados em *cluster* no cromossomo seis em caprino e bovino, organizadas na seguinte ordem: locus *CSN1S1* ( $\alpha_{s1}$ -caseína), *CSN2* ( $\beta$ -caseína), *CSN1S2* ( $\alpha_{s2}$ -caseína) e *CSN3* ( $\kappa$ -caseína) (RIJNKELS, 2002; COZENZA et al., 2003; SZYMANOWSKA et al., 2003).

A  $\alpha_{s1}$ -caseína é constituída de uma cadeia polipeptídica com 199 aminoácidos e peso molecular de 23,6 kDa. Apresenta, em sua estrutura primária, três regiões apolares e uma polar, que interagem com as demais caseínas no núcleo da micela de caseínas. O gene da  $\alpha_{s1}$ -caseína apresenta uma unidade transcricional de 17,5 kilobase (kb), sub-dividido em 19 exons (RIJNKELS, 2002).

Como revisado por NEVEU et al. (2002), pelo menos 18 alelos do gene *CSN1S1* já foram detectados em raças caprinas, e classificados em quatro níveis de expressão: alelos fortes, intermediários, fracos e nulos. Os alelos de alta expressão, ou fortes, e desejáveis para a produção de queijos (A, B1, B2, B3, B4, C, H, L e M) produzem 3,5 g/L de  $\alpha_{s1}$ -caseína por alelo (BRIGNON et al., 1989; CHIANESE et al., 1997; MARTIN et al., 1999; BEVILACQUA et al., 2002). Os alelos intermediários (E e I) produzem cada um 1,1 g/L de  $\alpha_{s1}$ -caseína, os alelos de baixa expressão, ou fracos, e indesejáveis para a produção de queijos (F, D e G) produzem somente 0,45



g/L de  $\alpha_{s1}$ -caseína (MARTIN et al., 1999) e os alelos nulos (O1, O2 e N) não produzem  $\alpha_{s1}$ -caseína (COSENZA et al., 2003; RAMUNNO et al., 2005). As variações H, I, L e M são raras e foram identificadas em raças locais do sul da Itália (CHIANESE et al., 1997; BEVILACQUA et al., 2002).

Resumidamente, todos os alelos de alta expressão (A, todas as formas de B, C, H, L, M) tem substituições de aminoácidos que não alteram a forma madura da proteína (BRIGNON et al., 1989; CHIANESE et al., 1997; MARTIN et al., 1999; BEVILACQUA et al., 2002). O alelo E possui uma inserção LINE de 457 pares de base no éxon 19 não codificante, que resulta no decréscimo da estabilidade do RNA mensageiro e subsequente redução na concentração de  $\alpha_{s1}$ -caseína no leite associada com este alelo de expressão intermediária (JANSA-PEREZ et al., 1994). Os alelos de baixa expressão (F, D e G) possuem deleções internas de aminoácidos, resultando na produção de uma proteína alterada. Para os alelos nulos diferentes mutações foram identificadas, como o alelo O<sub>1</sub> que é caracterizado por uma grande deleção, começando no exon 12, o alelo O<sub>2</sub> por uma grande inserção (LEROUX, 1990; COSENZA et al., 2003) e o alelo N por uma deleção de uma única citosina na 23ª posição do éxon 9 (RAMUNNO et al., 2005).

As concentrações de  $\alpha_{s1}$ -caseína têm sido correlacionadas positivamente com a quantidade de sólidos totais, proteínas totais e caseínas no leite de cabra e têm sido relacionadas ao aumento na produção de queijo, nos tempos de coagulação, e na consistência da coalhada (AMBROSOLI et al., 1988; PIRISI et al., 1994; CLARK e SHERBON, 2000). Além disso, o leite de cabras com concentrações reduzidas de  $\alpha_{s1}$ -caseína (alelos nulos ou fracos) tem sido associados com menor sensibilidade ao leite em algumas pessoas com intolerância ao leite de vaca (BEVILACQUA et al., 2001; EL-AGAMY, 2007), fornecendo, assim, outra base de seleção para produção de leite fluido baseado na nutrição humana.

Estudos comparativos de microscopia eletrônica de células epiteliais mamárias de cabras em lactação sugerem que existe uma disfunção no mecanismo de secreção em animais homocigotos para os alelos defectivos (O, F ou G e em menor grau, E). O transporte intracelular de caseínas recém-sintetizadas é fortemente retardado, conduzindo ao acúmulo de

formas imaturas nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER), que assumem uma forma dilatada. Desta forma, sugeriu-se uma disfunção no mecanismo de secreção das caseínas totais dependente da participação da  $\alpha_{s1}$ -caseína, já que o mesmo acúmulo não foi observado em cabras portadoras de alelos altos ou mesmo em cabras com genótipos nulos para  $\beta$ -caseína (CHANAT et al., 1999). Segundo NEVEU et al. (2002), a possível interferência da  $\alpha_{s1}$ -caseína no transporte de caseínas e lipídeos pelas células epiteliais mamárias, pode ser um dos fatores determinantes do mecanismo de secreção por via apócrina, descrito no leite de cabra.

Estes estudos, associado com a sugestão de que a secreção apócrina em caprino possa estar relacionada com os alelos defectivos do locus *CSN1S1* levam a outras questões, como se este polimorfismo também pode interferir na duração da lactação e contagem de células somáticas. Assim, devido às implicações econômicas, o efeito do polimorfismo no locus *CSN1S1* tem sido investigado e as frequências alélicas têm sido determinadas em vários países.

### ***O DGAT1 (diacilglicerol aciltransferase 1)***

O gene *DGAT1* codifica a enzima diacilglicerol aciltransferase 1, que catalisa a reação final da síntese de triacilglicerídeos nos adipócitos, que são os principais componentes da gordura de depósito, inclusive no leite (CASES et al., 1998; KÜHN et al., 2004). Esta enzima se expressa em muitos tecidos, com os mais altos níveis de expressão no intestino, testículo, tecido adiposo, glândulas mamárias e tecido epitelial (CASES et al., 1998), sua atividade enzimática é controlada tanto na transcrição como na pós-transcrição da proteína (FURBASS et al., 2006; KÜHN et al., 2004). O gene *DGAT1* ainda participa da regulação plasmática de gordura, concentração de triglicerídeos no sangue, absorção intestinal de compostos gordurosos e estocagem de gordura no tecido adiposo (CASES et al., 1998).

O gene *DGAT1* bovino se estende por 8,6 Kb e é composto por 17 exons medindo 121,8 pb em média (intervalo: 42-436 bp). Em bovino este gene é transcrito em um RNAm que compreende 245 pb da seqüência 5'UTR, 1470 pb que codificam para uma proteína de 489 aminoácidos, e 275

pb da seqüência 3'UTR, incluindo um sinal conservado de poliadenilação AATAAA (GRISART et al., 2002).

ANGIOLILLO et al. (2007) caracterizaram a região codificadora quase completa do gene *DGAT1* caprino pelo seqüenciamento de 1552 pb do cDNA de nove cabras (números de acesso GenBank: DQ380249, DQ380251). Esta seqüência abrangeu os exons 1-17 e compartilhou uma alta identidade de nucleotídeos com seqüências ortólogas de outros mamíferos, como bovino (97%), suíno (91%), humano (91%) e canino (90%).

Pelo seqüenciamento do gene *DGAT1* de animais com o genótipo do QTL conhecido, uma substituição não conservativa de lisina por alanina foi identificada na posição 232 (mutação K232A) e mostrou estar associada com um efeito sobre a produção e composição do leite em várias populações e raças de bovinos leiteiros (GRISART et al., 2002; WINTER et al., 2002; SPELMAN et al., 2002). No entanto, BENNEWITZ et al. (2004); KÜHN et al. (2004) relataram que uma variação genética adicional à mutação *DGAT1* K232A, afetando o teor de gordura no leite de bovinos, poderia estar presente no mesmo QTL, desta forma alelos da região promotora deste mesmo gene, os quais compreendem um número variável de repetições em tandem (VNTR) (WINTER et al., 2002), foram considerados como candidatos, sendo que análises genéticas revelaram que alelos *DGAT1* VNTR estavam associados com a variação no teor de gordura do leite em animais homozigotos *DGAT1* 232A/232A.

O conteúdo de gordura no leite tem um efeito importante sobre a produção de queijo e firmeza, assim como no sabor e na cor do queijo (LAMBERET et al., 2001). Devido à importância econômica desta característica e sua herdabilidade moderada [ $h^2 = 0,32$  para porcentagem de gordura no leite de cabra; (VÁZQUEZ et al., 2009)], considerável esforço tem sido dispendido pelos geneticistas de bovinos e ovinos em dissecar a arquitetura genética pela caracterização de QTLs e genes candidatos. No entanto, há uma considerável falta de conhecimento para cabras, já que pequeno número de genes candidatos foram devidamente caracterizados (ANGIOLILLO et al., 2007).

### **O GH (*growth hormone* – *hormônio do crescimento*)**

O GH, na espécie bovina, é uma proteína de 191 aminoácidos e apresenta uma heterogeneidade complexa, tendo diferentes formas moleculares (SECCHI e BORROMEO, 1997). São encontradas quatro variantes do GH, as quais surgem da combinação de dois possíveis aminoácidos na região amino-terminal (alanina ou fenilalanina) e dois possíveis aminoácidos na posição 127 (leucina ou valina) (WOOD et al., 1989). As sequências de aminoácidos do GH são idênticas para ovino e caprino, tendo 99% de homologia em comparação com a espécie bovina. Considerando os GHs em suíno, eqüino e humano, o GH bovino apresenta, respectivamente, 90,6%; 89,5% e 66,5% de similaridade (SECCHI e BORROMEO, 1997).

Considerando os efeitos no processo da lactação, o GH favorece a síntese do leite com composição normal, permite maior disponibilidade de nutrientes para a produção de leite, aumenta a atividade na célula secretória, assim como a manutenção destas células e proporciona maior aporte sanguíneo para a glândula mamária (ETHERTON e BAUMAN, 1998). Todas estas ações devem ser mediadas pelo IGF1, mas existe evidência de uma ação direta do GH na glândula mamária (FLINT e GARDNER, 1994).

A involução da glândula mamária bovina, um processo importante para as subseqüentes lactações que se caracteriza por perda das células epiteliais devido a apoptose, está associada ao declínio da concentração de prolactina, GH, IGF1 (ACCORSI et al., 2002). O conhecimento atual em biologia do leite indica que animais geneticamente superiores diferem de animais inferiores principalmente na regulação da utilização de nutrientes e que o hormônio do crescimento (GH) exerce um controle chave no uso dos nutrientes (BAUMAN, 1992), desenvolvimento mamário (SEJRSEN et al., 1986), e crescimento (BREIER et al., 1991).

De acordo com MARANHÃO (2003), existem na literatura muitos trabalhos a respeito de polimorfismo no gene *bGH* e sua ação sobre a produção de leite, como por exemplo, os polimorfismos *Mspl*, *Alul* e *Ddel*. Em estudo realizado por QUEIROZ (2008) com bovinos da raça Girolando, dois alelos diferentes foram encontrados para o polimorfismo *Mspl* do *GH*. Nesta análise foi observada uma superioridade do genótipo CC em relação

ao DD ( $p=0,0479$ ) para a produção total de leite (+137,03 kg). Um efeito negativo do DD também foi demonstrado na produção média diária de leite, ao se comparar os genótipos CD ( $p=0,0515$ ) e CC ( $p=0,0222$ ) (- 490 g e - 570 g, respectivamente). No entanto, não houve efeito dos genótipos sobre a duração da lactação.

Segundo YAO et al. (1996), o polimorfismo identificado pela enzima de restrição *Ddel* não implica em mudança de posição do aminoácido codificado (arginina) no GH, mas a presença do polimorfismo detectada por esta enzima está associada a uma maior produção de leite e de gordura e proteína do leite e também a uma maior liberação de GH e IGF-1 em vacas de alta produção.

LUCY et al. (1991) verificaram o polimorfismo na região do exon 5 do *GH*, que caracteriza as variantes leucina (Leu) ou valina (Val) na posição 127 da proteína, o qual foi associado às características relacionadas à produção de leite. Vários trabalhos têm demonstrado que em bovinos selecionado para alta produção de leite a frequência genotípica do *GH* (polimorfismo *Alul*) Leucina/Leucina (L/L) é maior que a frequência Leucina/Valina (L/V) (ambos relacionados a uma maior atividade lipolítica), sendo que a Valina/Valina (V/V) apresenta frequência muito baixa no gene *GH* (SORENSEN et al., 2002; ZWIERZCHOWSKI et al., 2002). Constatou-se também que a concentração de GH no plasma sanguíneo era maior nos animais de genótipo L/L, associado a maiores produções de leite, e que as concentrações de IGF-1 eram maiores nos animais de genótipo L/V (LUCY et al., 1993; SORENSEN et al., 2002).

### ***O POU1F1 (Pituitary-specific positive transcription factor 1)***

O POU1F1 (também chamado PIT-1 ou GHF-1) corresponde a um fator de transcrição expresso principalmente na hipófise, sendo que sua expressão é necessária para que ocorra a diferenciação, desenvolvimento e manutenção normal de três tipos de células da adenohipófise (tireotrofos, somatotrofos e lactotrofos) (LI et al., 1990). É também um regulador do hormônio do crescimento (GH), da prolactina (PRL) (LEFEVRE et al., 1987; NELSON et al., 1988) e do hormônio estimulador da tireóide  $\beta$  (TSH $\beta$ ) em mamíferos (LI et al., 1990), assim, mutações no gene *POU1F1*

possivelmente resultam em diferentes expressões destes hormônios e do próprio *POU1F1* (COHEN et al., 1997). Em bovinos e suínos, variações genéticas neste gene têm sido associadas com o desempenho em características de interesse econômico (YU et al., 1995; RENAVILLE et al., 1997a,b; STANCEKOV et al., 1999; SUN et al., 2002).

Pelo menos 18 diferentes mutações já foram relatadas, dispersas nos 6 exons deste gene. Devido a importância deste gene no controle da expressão gênica de hormônios diretamente associados com o processo de crescimento e produção de leite, é possível considerá-lo como um bom gene candidato para a seleção assistida por marcadores (BASTOS et al., 2006).

RENAVILLE et al. (1997b) encontraram uma associação do alelo A, identificado pelo polimorfismo *HinfI-POU1F1*, com a produção de leite e proteína em bovinos. DI STASIO et al. (2002) não encontraram evidências de associação do polimorfismo neste gene com a produção de carne em bovinos da raça Piamontesa. ZHAO et al. (2004) detectaram polimorfismos nos introns 3 e 4 e no exon 6 do locus *POU1F1*, no entanto não houve associação com características de crescimento e de carcaça em bovinos da raça Angus.

O gene *POU1F1* ainda é pouco estudado em caprinos, sendo que a maioria dos estudos que envolvem a identificação de polimorfismos e seus efeitos sobre características produtivas foram realizados na China.

LAN et al. (2007a) coletaram amostras de sangue de 801 cabras para analisar o gene *POU1F1* e identificou uma mutação T para C (AGT para AGC) no sexto exon, responsável pela adição de um sítio de restrição para a endonuclease *AluI*, de forma que a visualização dos fragmentos amplificados e digeridos com esta enzima permitiu a identificação de dois alelos diferentes, *POU1F1-T* com dois fragmentos (340 e 110 pb) e *POU1F1-C* com três fragmentos (216, 124 e 110 pb). Os autores associaram este polimorfismo com 11.026 registros de desempenho quanto à produção de leite, número de crias, pesagem dos animais e comprimento, espessura e produção de pêlo em 216 cabras de raças leiteiras e 452 cabras da raça Cashmere, sendo que os indivíduos de genótipo TC apresentaram maior produção de leite e peso ao nascimento quando comparados aos animais de

TT. No entanto, nenhum efeito dos genótipos sobre as outras características foi observado.

Em outro estudo LAN et al. (2007b) identificaram quatro mutações no exon 6 do gene *POU1F1* de cabras por PCR-SSCP e sequenciamento, sendo que entre estas mutações a mudança do 60º nucleotídeo do sexto exon, Ser (TCT) por Ser (TCG), resultou em um polimorfismo para a enzima de restrição *Ddel*. De acordo com os testes de associação realizados, os animais com genótipos D<sub>1</sub>D<sub>1</sub> tiveram melhor desempenho que os animais D<sub>1</sub>D<sub>2</sub> para produção de leite, número de crias e peso com um ano de idade, com D<sub>1</sub> caracterizado pela presença de T e D<sub>2</sub> pela presença de G.

Além disso, estes autores utilizaram o sexto exon do gene *POU1F1* para avaliar a existência de “viés de códon” (*codon bias*), fenômeno que refere às frequências com que cada códon sinônimo é usado para codificar um determinado aminoácido, sendo o códon UCU ligado à mutação T (genótipos D<sub>1</sub>D<sub>1</sub>) identificado como *major* códon e UCG ligado à mutação G (genótipos D<sub>2</sub>D<sub>2</sub>) como um códon raro. De acordo com os autores o viés no uso dos códons pode estar associado com o nível de expressão da proteína POU1F1, uma vez que estudos têm sugerido que este fenômeno está correlacionado com um viés correspondente na quantidade do tRNA (KURLAND et al., 1991; EYRE-WALKER et al., 1996; COGHLAN et al., 2000; ARCHETTI et al., 2004; LAVNER et al., 2005). Assim, LAN et al. (2007b) presumiram que a rara quantidade de tRNA para UCG poderia diminuir de forma significativa a velocidade de tradução do mRNA para o aminoácido e restringir seriamente a eficiência de síntese da proteína, o que poderia ter resultado na ausência de identificação de animais com genótipo D<sub>2</sub>D<sub>2</sub> neste estudo.

LAN et al. (2009a) identificaram pela primeira vez a distribuição do polimorfismo *Pst*I no gene *POU1F1* em 847 caprinos da raça Inner Mongolia White Cashmire e avaliou sua associação com a produção, comprimento e espessura do pêlo. A mutação T>C do gene *POU1F1* de caprinos, localizada na posição 110 da região 3'UTR formou um sítio de restrição para a endonuclease *Pst*I, de forma que após a amplificação e digestão foi possível visualizar um fragmento para o alelo T (450 pb) e dois fragmentos para o alelo C (370 e 80 pb). Os animais de genótipo TT foram associados a

maiores produções de pêlo *cashmire* do que animais TC ( $P < 0,05$ ), ao serem avaliados com dois, quatro e cinco anos de idade, assim como para a produção média de pêlos. No entanto os diferentes genótipos não tiveram efeito sobre o comprimento e espessura do pêlos ( $P > 0,05$ ). Os autores consideram que a associação entre este polimorfismo e as características de produção de pêlo pode ocorrer, pois apesar de a mutação na região 3'UTR não alterar a sequência de aminoácidos, esta pode possivelmente regular a expressão dos genes *POU1F1*, *GH* e *PRL* ou ainda pelo fato de que este polimorfismo possa estar em desequilíbrio de ligação com um gene que esteja afetando a variação desta característica.

LAN et al. (2009b) estudaram os exons 1-5 e a região 5'UTR do gene *POU1F1* de caprinos, sendo identificados 12 novos SNPs em cabras da raça Inner Mongolian White Cashmere, sendo que entre os polimorfismos encontrados, dois estavam associados com a produção de pêlos *cashmere*, típicos desta raça. Além disso, os autores observaram que para um dos polimorfismos identificados por SSCP, apenas os genótipos EE e EF foram encontrados, na proporção de 2:1, sendo sugerido que o alelo F poderia ser letal em homozigose recessiva, baseado no fato de que as análises das sequências de aminoácidos do alelo F revelaram uma remoção dos aminoácidos da posição 184 até 291 do *POU1F1* nos animais de genótipo FF, o que resultaria na eliminação parcial do domínio POU (POU-SD) e do homeodomínio (POU-HD) desta proteína, o que poderia fazer com que esta mutação fosse letal, uma vez que estudos anteriores mostraram que estes domínios são essenciais para a alta afinidade de ligação com o DNA e mutações nestas regiões causaram nanismo severo ou morte em humanos (THEILL et al., 1989, 1992). Além disso, nos genótipos FF faltam os exons 5 e 6 e parte do exon 4, semelhante à forma de *splicing* *POU1F1-δ* observada em ovinos (sem o exons 3-5) por BASTOS et al. (2006), a qual resultou na falta de ativação dos promotores do GH e da prolactina.



### ***A análise de genes candidatos***

ROTHSCHILD e SOLLER (1999) organizaram o processo de estudo de genes candidatos em uma série de etapas. Estas etapas se dividem em dois grupos distintos. A primeira tem a ver com a preparação do fundamento básico para o estudo de genes candidatos; por exemplo, escolhendo o gene candidato, projetando sequências de primers para amplificar o gene, descobrindo polimorfismos no gene e desenvolvendo um procedimento conveniente para genotipar os sítios de polimorfismos. A segunda tem a ver com o estudo do gene candidato em si, por exemplo, identificando uma população apropriada, realizando o teste de associação e verificando os resultados. É importante perceber que o primeiro grupo de operações representa um investimento de longo prazo, realizado apenas uma vez para um determinado gene candidato. Uma vez que este fundamento básico foi preparado, o teste de associação do gene candidato com a variação da característica pode ser realizado com custos mínimos em uma população específica.

Os genes candidatos são escolhidos sobre uma convicção a priori, baseada no sistema biológico ou fisiológico envolvido, de que eles são associados com as características de interesse. Esses genes candidatos (chamados genes candidatos biológicos) também podem ser escolhidos com base nos principais efeitos mutacionais em uma característica em humanos ou ratos, sugerindo um papel para o gene nas características correspondentes na pecuária.

As melhores técnicas para detecção dos polimorfismos seriam o PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição), o SSCP (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples) e o seqüenciamento das sequências amplificadas. O ideal é usar métodos que podem facilmente ser expandidos para grandes estudos de associação. O seqüenciamento pode ser a melhor ferramenta na detecção dos polimorfismos, mas não é rápido e barato o suficiente para uso em abordagens populacionais. Portanto, após a detecção dos polimorfismos, o PCR-RFLP e SSCP seriam as técnicas de eleição (ROTHSCHILD e SOLLER, 1999).

A técnica de PCR (MULLIS e FALOONA, 1987) baseia-se na amplificação exponencial de uma sequência genômica alvo, pela utilização, em geral, de um par de iniciadores, conhecidos como *primers*, que flanqueiam a região genômica que se pretende amplificar pela ação de uma DNA polimerase termo-resistente, em geral a *Taq* DNA polimerase. Os passos envolvidos neste processo são automaticamente executados em uma máquina chamada de termociclo ou termociclador, de forma que ao final de 30 ciclos, existirão mais de 1 bilhão de cópias da sequência alvo, permitindo que a partir de quantidades ínfimas de DNA genômico possa se proceder a análise completa dos mais diversos sistemas gênicos.

Para melhor entendimento o protocolo de PCR-RFLP consta basicamente da amplificação por PCR da sequência alvo, a qual é posteriormente submetida a clivagem com diversas enzimas de restrição. No caso de genes sequenciados, pode-se identificar por sua sequência quais enzimas de restrição apresentam sítios, sendo estas, então, utilizadas nos experimentos. É desta maneira que se faz o diagnóstico molecular das variantes alélicas de genes já utilizados em programas de melhoramento animal (PEREIRA, 2008).

O SSCP ocorre quando o indivíduo apresenta duas variantes alélicas para o *locus* amplificado que diferem entre si por deleção ou inserção. Neste caso, após a amplificação de ambas as variantes alélicas, ocorre o pareamento não apenas entre as fitas homólogas, mas também entre aquelas que diferem pela presença ou ausência de alguns pares de base. Nesta situação, há a formação de uma alça, na região não pareada da sequência, que impede a perfeita migração dos fragmentos através do gel durante a eletroforese, formando o que se chama de bandas heteroduplex, caracterizando então o indivíduo heterozigoto. Já os homozigotos apresentam pareamento perfeito, independente se apresentam a inserção/deleção ou o alelo selvagem, não mutado. Eles distinguem do alelo selvagem pelo peso molecular do fragmento amplificado, se a diferença entre a variante alélica selvagem e a mutante for uma deleção, o mutante terá seu fragmento amplificado com menor peso molecular. Se ocorreu uma inserção, o mutante terá banda de maior peso (PEREIRA, 2008).

Efeitos do gene candidato são descobertos através de um teste de associação que examine os efeitos de diferentes alelos do gene candidato sobre o fenótipo, conforme determinado por um único sítio polimórfico (ou por um haplótipo constituído por um número de sítios polimórficos). Isto é realizado usando um modelo linear misto com os alelos ou genótipos como efeitos fixos. Quando genes candidatos múltiplos são usados para uma dada característica em uma população, procedimentos de regressão múltipla podem ser usados (ROTHSCHILD e SOLLER, 1999).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCORSI, P. A.; PACIONI, B.; PEZZI, C.; FORNI, M.; FLINT, D. J.; SEREN, E. Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Lancaster (Pa.), v. 85, n. 3, p. 507-513, Mar. 2002.

ALFEREZ, M.J.M., BARRIONUEVO, M., LOPEZ-ALIAGA, I., SANZ SAMPELAYO, M.R., LISBONA, F., ROBLES, J.C., CAMPOS, M.S. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.451–461, 2001.

ALMAAS, H., CASES, A.L., DEVOLD, T.G., HOLM, H., LANGSRUD, T., AABAKKEN, L., AADNOEY, T., VEGARUD, G.E. In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. **International Dairy Journal**, v.16, p.961–968, 2006.

AMBROSOLI, R.; DI STASIO, L. and MAZZOCCO, P. Content of  $\alpha$ 1- casein and coagulation properties in goat milk. **Journal of Dairy Science** v.71, p.24–28, 1988.

ANGIOLILLO, A.; AMILLS, M.; URRUTIA, B.; et al. Identification of a single nucleotide polymorphism at intron 16 of the caprine Acyl-Coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene. **Journal of Dairy Research**, v.74, p. 47–51, 2007.

ARCHETTI, M. Codon usage bias and mutation constraints reduce the level of error minimization of the genetic code. **Journal of Molecular Evolution** 59(2), p.258-266, 2004.

BARILLET, F. Genetic improvement for dairy production in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v.70, p.60-75, 2007

BARILLET, F.; ARRANZ, J.J. & CARTA, A. Mapping quantitative trait loci for milk production and genetic polymorphisms of milk proteins in dairy sheep. **Genetics Selection and Evolution**, v.37 (Suppl. 1), p.109–123, 2005.

BASTOS, E., SÍLVIA ÁVILA, A., CRAVADOR, R., RENAVILLE, R., GUEDES-PINTO, H., JOSÉ LUIS, A. Identification and characterization of four splicing variants of ovine POU1F1 gene. **Gene**, v.382, p.12–19, 2006.

BAUMAN, D. E., Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. **Journal of Dairy Science** v.75, p.3432-3451, 1992.

BAUMAN, D. E., and VERNON, R. G. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. **Annual Review of Nutrition**, v.13, p.437–461, 1993.

BELLIONI-BUSINCO, B., PAGANELLI, R., LUCENTI, P., GIAMPIETRO, P.G., PERBORN, H., BUSINCO, L. Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.103, p.1191–1194, 1999.

BENNEWITZ, J.; REINSCH, N.; PAUL, S.; et al. The DGAT1 K232A mutation is not solely responsible for the milk production quantitative trait locus on the bovine chromosome 14. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.431–442, 2004.

BEVILACQUA, C.; FERRANTI, P.; GARRO, G.; et al. Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new  $\alpha$ 1-casein variant found in the goat species. **European Journal of Biochemistry**. v.269, p.1293–1303, 2002.

BEVILACQUA, C., MARTIN, P., CANDALH, C., FAUQUANT, J., PIOT, M., ROUCAYROL, A.M., PILLA, F., HEYMAN, M. Goats' milk of defective  $\alpha$ (s1)- casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to beta-lactoglobulin in guinea pigs. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.217–227, 2001.

BOULANGER, A.; GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M.F. Polymorphism des caséines  $\alpha$ S1 at  $\alpha$ S2 de la chèvre (*Capra hircus*). **Genetics Selection Evolution**, v.16, p.157-176, 1984.

BREIER, B. H. and GLUCKMAN, P. D. The regulation of postnatal growth: nutritional influences on endocrine pathways and function of the somatotrophic axis. **Livestock Production Science** v.27, p.77-94, 1991.

BRIGNON, G.; MAHE, M. F; GROSCLAUDE, F.; et al. Sequence of caprine  $\alpha$ s1-casein and characterization of those of its genetic variants which are synthesized at a high level,  $\alpha$ s1-CnA, B and C. **Protein Sequences & Data Analysis** v.2, p.181–188, 1989.

BRITO, L. F.; SILVA, F. G.; MELO, A. L. P.; CAETANO, G. C.; TORRES, R.A.; RODRIGUES, M.T. and MENEZES, G.R.O. Genetic and environmental factors that influence production and quality of milk of Alpine and Saanen goats. **Genetics and Molecular Research**. v.10, p.3794-3802, 2011.

CASES, S.; SMITH, S.J.; ZHENG, Y.W. et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v.95, p.13018-13023, 1998.

CHANAT, E.; MARTIN, P.; OLLIVIER-BOUSQUET, M.  $\alpha$ 1-casein is required for the efficient transport of  $\beta$  and  $\kappa$ -casein from the endoplasmic-reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells, **Journal of Cell Science** v.112 p.3399–3412, 1999.

CHIANESE, L.; FERRANTI, P.; GARRO, G.; et al.. **Occurrence of three novel  $\alpha$ 1-casein variants in goat milk**. In Proc. Int. Dairy Fed.-Fed. Int. Laiterie Semin. Milk Protein Polymorphism II. Int. Dairy Fed., Palmerston North, New Zealand, p.259–267, 1997.

CLARK, S. and SHERBON, J. W. Alphas1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. **Small Ruminant Research**. v.38, p.123–134, 2000.

COGHLAN, A. AND K. H. WOLFE. Relationship of codon bias to mRNA concentration and protein length in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 16(12), p.1131-1145, 2000.

COHEN, L.E., WONDISFORD, F.E., RADOVICK, S. Role of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v.25, p.523–540, 1997.

COZENZA, G.; ILLARIO, R.; RANDO, A. et al. Molecular characterization of the goat CSN1S101 allele. **Journal of Dairy Research**, v.70, p.237-240, 2003.

DI STASIO, L., SARTORE, S. & ALBERA, A. Lack of association of GH1 and POU1F1 gene variants with meat production traits in Piemontese cattle. **Animal Genetics** 33(1): 61, 2002.

EL-AGAMY, E. I. The challenge of cow milk protein allergy. **Small Ruminant Research**. v.68, p.64–72, 2007.

ETHERTON, T. D.; BAUMAN, D. E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 78, n. 3, p. 745-761, July 1998.

EYRE-WALKER, A. Synonymous codon bias is related to gene length in *Escherichia coli*: selection for translational accuracy? **Molecular Biology and Evolution**, v.13, p.864-872, 1996.

FARRELL JR., H.M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G.T. et al. Nomenclature of the proteins of cows milk-sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.1641-1674, 2004.

FLINT, D. J.; GARDNER, M. Evidence that growth hormone stimulates milk synthesis by direct action on the mammary gland and that prolactin exerts effects on milk secretion by maintenance of mammary deoxyribonucleic acid content and tight junction status. **Endocrinology**, Springfield, v. 135, n. 3, p. 1119-1124, Sept. 1994.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO [2008]. **FAOSTAT – FAO Statistics Division / ProdSTAT: livestock (animals and primary)**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/497/default.aspx>> Acesso em: 15/4/2008.

GRISART, B.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F. et al. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research** v.12, p.222–231, 2002.

GRISART, B.; FARNIR, F.; KARIM, L. et al. Genetics and functional confirmation of the causality of the *DGAT1* K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v.101, n.8, p.2398-2403, 2004.

HACHELAF, W., BOUKHRELD, M., BENBOUABDELLAH, M., COQUIN, P., DESJEUX, J.F., BOUDRAA, G., TOUHAMI, M. Comparative digestibility of goats versus cows milk fats in children with digestive malnutrition. **Lait**, v.73, p.593–599, 1993.

HOJ, S.; FREDHOLM, M.; LARSEN, N. J.; NIELSEN, V. H. Growth hormone polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. **Animal Genetics**, v. 24, p. 91-96, 1993.

JANSA-PEREZ, M. J.; LEROUX, C.; SANCHEZ BONASTRE, A.; and MARTIN, P. Occurrence of a LINE sequence in the 3' UTR of the goat  $\alpha$ 1-casein E-encoding allele associated with reduced protein synthesis level. **Gene** v.147, p.179–187, 1994.

JASINSKA, B. The comparison of pepsin and trypsin action on goat, cow, mare and human caseins. **Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku**, v.40, p.486–493, 1995.

KÜHN, C.; Thaller, G.; Winter, A.; Bininda-Emonds, OR.; Kaupe, B.; Erhardt, G.; Bennewitz, J.; Schwerin, M.; and Fries, R. Evidence for multiple alleles at the *DGAT1* locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. **Genetics**, v.167, p.1873–1881, 2004.

KURLAND, C. G. Codon bias and gene expression. **FEBS Letters**, 285(2), p.65-69, 1991.

LAMBERET, G.; DELACROIX-BUCHET, A. & DEGAS, C. Intensity of initial lipolysis in goats' milk and the perception of 'goaty' aroma in the cheese. (Ed. ITPLC). In: Proceedings of the Technical Symposium, 7th International

Conference on Goats: Recent Advances on Goat Milk Quality, Raw Material for Cheesemaking, Poitiers, France, pp. 130–139, 2001.

LAN, X.Y., PAN, C.Y., CHEN, H., ZHANG, C.L., LI, J.Y., ZHAO, M., LEI, C.Z., ZHANG, A.L., ZHANG, L. An *AluI* PCR-RFLP detecting a silent allele at the goat POU1F1 locus and its association with production traits. **Small Ruminant Research**, v.73p.8–12, 2007a.

LAN, X.Y., PAN, C.Y., CHEN, H., LEI, C.Z., HUA, L.S., YANG, X.B., QIU, G.Y., ZHANG, R.F., LUN, Y.Z. *DdeI* polymorphism in coding region of goat POU1F1 gene and its association with production traits. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, 20(9), p.1342–1348, 2007b.

LAN, X. Y., SHU, J. H., CHEN, H., PAN, C. Y., LEI, C. Z., WANG, X., LIU, S. Q., ZHANG, Y. B. A *PstI* polymorphism at 3'UTR of goat POU1F1 gene and its effect on cashmere production. **Molecular Biology Reports**, v.36, p.1371–1374, 2009a.

LAN, X.Y., PAN, C.Y., LI, J.Y., GUO, Y.W., HU, S., WANG, J., LIU, Y.B., HU, S.R., LEI, C.Z, CHEN, H. Twelve novel SNPs of the goat POU1F1 gene and their associations with cashmere traits. **Small Ruminant Research**, v.85, p.116–121, 2009b.

LARA-VILLOSLADA, F., DEBRAS, E., NIETO, A., CONCHA, A., GALVEZ, J., LOPEZ-HUERTAS, E., BOZA, J., OBLED, C., XAUS, J. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. **Clinical Nutrition**, v.25, p.477–488, 2006.

LAVNER, Y. AND KOTLAR, D. Codon bias as a factor in regulating expression via translation rate in the human genome. **Gene**. v.345, p.127–138, 2005.

LEROUX, C.; MARTIN, P; MAHÉ, M. F. et al. Restriction fragment length polymorphism identification of goat *cs1* casein alleles: a potential tool in selection of individuals carrying alleles associated with a high level protein synthesis. **Animal Genetics**, v.21, p.341-351, 1990.

LI, S., CRENSHAW III, E. B., RAWSON, E. J., SIMMONS, D. M., SWANSON, L. W., ROSENFELD, M. G. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene *Pit-1*. **Nature**, v.347, p.528–533, 1990.

LEFEVRE, C., IMAGAWA, M., DANA, S., GRINDLAY, J., BODNER, M. & KARIN, M. Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is covered in part by the binding of a specific trans-acting factor. **EMBO Journal**, v.6, p.971–981, 1987.

LÔBO, R.N. B., FACÓ, O., LÔBO, A.M. B. O., VASQUES VILLELA, L.C. Brazilian goat breeding programs. **Small Ruminant Research**, v.89 p.149–154, 2010.

LUCY, M. C.; HAUSER, S. D.; EPPARD, S. D.; KRIVI, P. J.; CLARK, G. G.; BAUMAN, D. E.; COLLIER, R. J. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 10, n. 4, p. 325-333, 1993.

LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; MICHEL, F. M.; THATCHER, W. W. Energy balance and size of and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 473-482, 1991.

MARANHÃO, A. M. **Efeito do polimorfismo do gene GH e suas relações com níveis de IGF-1, progesterona e escore corporal, produção de leite e dias em aberto em vacas Holandesas no início da lactação.** 2003. 90 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - SP.

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

MULLIS, K. & FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.** v.55, p.335-350, 1987.

NELSON, C., ALBERT, V.R., ELSHOLTZ, H.P., LU, L.I.W. & ROSENFELD, M.G. Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. **Science.** v.239, p.1400–1405, 1988.

NEVEU, C.; RIAUBLANC, A.; MIRANDA, G. et al. Is the apocrine milk secretion process observed in the goat species rooted in the perturbation of the intracellular transport mechanism induced by defective alleles at the  $\alpha$ S1-Cn locus? **Reproduction Nutrition Development**, v.42, p.163-172, 2002.

PEREIRA, J.C.C., 2008. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal.** FEPMVZ Editor, Belo Horizonte.

PIRISI, A.; COLIN, O.; LAURENT, F.; SCHER, J.; and PARMENTIER, M. Comparison of milk composition, cheesemaking properties and textural characteristics of the cheese from two groups of goats with a high or low rate of  $\alpha$ s1-casein synthesis. **International Dairy Journal**, v.4, p.329–345, 1994.

PROSSER, C.G., STELWAGEN, K., CUMMINS, R., GUERIN, P., GILL, N., MILNE, C. Reduction in heat induced gastrointestinal hyperpermeability by bovine colostrum and goat milk powders. **Journal of Applied Physiology**, v.96, p.650–654, 2004.



QUEIROZ, L. B. **Polimorfismo nos genes da via do hormônio do crescimento e efeitos nos índices produtivos em bovinos da raça Girolando**. 2008. 67p. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia – MG.

RAMUNNO, L.; COSENZA, G.; RANDO, A.; PAUCIULLO, A.; ILLARIO, R.; GALLO, D.; DI BERARDINO, D. and MASINA, P. Comparative analysis of gene sequence of goat CSN1S1 F and N alleles and characterization of CSN1S1 transcript variants in mammary gland. **Gene** v.345, p.289–299, 2005.

RAYNAL-LJUTOVAC, K., GABORIT, P., LAURET, A. The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. **Small Ruminant Research**. v.60, p.167–177, 2005.

RAYNAL-LJUTOVAC, K., PIRISI, A., DE CREMOUX, R., GONZALO, C. Somatic cells of goat and sheep milk: analytical, sanitary, productive and technological aspects. **Small Ruminant Research**. v,68, p.126–144, 2007.

RENAVILLE, R., GENGLER, N., VRENCH, E., PRANDI, A., MASSART, S., CORRADINI, C., BERTOZZI, C., MORTIAUX, F., BURNY, A., PORTETELLE, D. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. **Journal of Dairy Science**. v.80, p.3431–3438, 1997a.

RENAVILLE, R., GENGLER, N., PARMENTIER, I., MORTIAUX, F., MASSART, S., BERTOZZI, C., BURNY, A., PORTETELLE, D. Pit-1 gene *HinfI* RFLP and growth traits in double-musled Belgian Blue Cattle. **Journal of Animal Science**. 75 (Suppl. 1), 146 (Abstract), 1997b.

RIBEIRO, A.C. O melhoramento animal e a qualidade do leite dos caprinos no Brasil. In: **Anais do VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal**, 2008, São Carlos, SP.

RIJNKELS, M. Multispecies Comparison of the Casein Gene Loci and Evolution of Casein Gene Family. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.7, p.327-345, 2002.

ROTHSCHILD, M. F. & SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. In: International Symposium on Animal Breeding and Genetics, Viçosa, MG, Brazil, Anais, p. 219-242, 1999.

SECCHI, C.; BORROMEIO, V. Structure and function of bovine growth hormone: bovine growth hormone as an experimental model for studies of protein-protein interactions. **Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v. 688, n. 2, p. 161-177, Jan. 1997.

SEJRSEN, K.; FOLDAGER, J.; SORENSEN, M. T.; AKERS, R. M. and BAUMAN, D. E. Effect of exogenous bovine somatotropin on pubertal mammary development in heifers. **Journal of Dairy Science**. v.69, p.1528-1535, 1986.

SILANIKOVE, N., LEITNER, G., MERIN, U., PROSSER, C.G. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**, v.89, p.110–124, 2010.

SOERENSEN, P.; GROCHOWSKA, L.; HOLM, M.; HENRYON, M.; LOVENDAHL, P. Polimorphism in the bovine growth hormone gene affects endocrine release in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1887-1893, 2002.

SPELMAN, R.J.; FORD, C.A.; MCELHINNEY, P.; et al. Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. **Journal of Dairy Science**. v.85, p.3514–3517, 2002.

STANCEKOV, K., VASICEK, D., PESKOVICOV, D., BULL, J., KUBEK, A. Effect of genetic variability of the porcine pituitary-specific transcription factor (PIT-1) on carcass traits in pigs. **Animal Genetics**, v.30, p.313–315, 1999.

SUN, H.S., ANDERSONA, L.L., YU, T.P., KIM, K.S., KLIND, J., TUGGLE, C.K. Neonatal Meishan pigs show POU1F1 genotype effects on plasma GH and PRL concentration. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.223–237, 2002.

SZYMANOWSKA, M.; STRZALKOWSKA, N.; SIADKOWSKA, E. et al. Effects of polymorphism at 5'-noncoding regions (promoters) of  $\alpha_{s1}$  and  $\alpha_{s2}$  casein genes on selected milk production traits in Polish Black and White cows. **Animal Science Papers and Reports**, v.21, p.97-108, 2003.

THEILL, L.E., CASTRILLO, J.L., WU, D., KARIN, M. Dissection of functional domains of the pituitary-specific transcription factor GHF-1. **Nature**. v.342, p.945–948, 1989.

THEILL, L.E., HATTORI, K., LAZZARO, D., CASTRILLO, J.L., KARIN, M. Differential splicing of the GHF1 primary transcript gives rise to two functionally distinct homeodomain proteins. **The EMBO Journal**. v.11, p.2261– 2269, 1992.

VAN DER WERF, J. H. J., 2009. Marker-Assisted Selection: Current Status and Future Perspectives in Crops, Livestock, Forestry and Fish. Producer: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/010/a1120e/a1120e00.htm>>. Acesso em: 7/8/2012.

VÁZQUEZ, J. A. T.; POSADAS, M. V.; JUÁREZ, H. C.; et al. Genetic and phenotypic parameters of milk yield, milk composition and age at first kidding in Saanen goats from Mexico. **Livestock Science**. v.126, p.147–153, 2009.

WINTER, A.; KRÄMER, W.; WERNER, F.A. et al. Association of a lysine-232-alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. . **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v.99, p.9300-9305, 2002.

WOOD, D. C. et al. Purification and characterization of pituitary bovine somatotropin. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 25, p. 14741-14747, Sept. 1989.

YAO, J.; AGGREY, S. E.; ZADWORNÝ, D.; HAYES, J. F.; KUHNLEIN, U. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in holsteins. **Genetics**, v. 144, p. 1809-1816, 1996.

YU, T.P., TUGGLE, C.K., SCHMITZ, C.B., ROTHSCHILD, M.F. Association of PIT1 polymorphisms with growth and carcass traits in pigs. **Journal of Animal Science**. v.73, p.1282–1288, 1995.

ZHAO, Q., DAVIS, M.E. & HINES, H.C. Associations of polymorphisms in the Pit-1 gene with growth and carcass traits in Angus beef cattle. **Journal of Animal Science**. v.82, p.2229–2233, 2004.

ZWIERZCHOWSKI, L.; KRZYZEWSKI, J.; STRZALKOWSKA, N.; SIADKOWSKA, E.; RYNIEWICZ, Z. Effects of polymorphism of growth hormone (GH), Pit-1, and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black and White cows. **Animal Science Papers and Reports**, v. 20, n. 4, p. 213-227, 2002.

## CAPÍTULO 1

### Influência do polimorfismo no gene *CSN1S1* sobre a produção e composição do leite de cabra

#### RESUMO

A  $\alpha_{S1}$ -caseína, uma das principais proteínas coagulantes do leite, é codificada pelo gene *CSN1S1*, com pelo menos 18 alelos na espécie caprina, classificados em quatro níveis de expressão: alta (alelos A, B<sub>1-4</sub>, C, H, L e M), média (alelos E e I), baixa (D, F e G) e nula produção desta proteína no leite (alelos O<sub>1-3</sub> e N). Devido às implicações econômicas, o efeito do polimorfismo no locus *CSN1S1* tem sido investigado e as frequências alélicas determinadas em vários países. Objetivou-se com este trabalho, verificar se os diferentes alelos no gene *CSN1S1* de caprinos estão associados à produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, contagem de células somáticas, produção e porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite. Para este propósito foram consideradas 2.173 lactações de 1.064 cabras de grupamentos genéticos das raças Saanen e Alpina, pertencentes ao rebanho do Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa, utilizadas para estimar os valores genéticos dos animais para estas características. O modelo animal utilizado continha os efeitos aleatórios de animal e de ambiente permanente; e os efeitos fixos de grupo contemporâneo, tipo de parto, grupamento genético e ordem de parto. Para a obtenção dos genótipos das fêmeas, foram isoladas amostras de DNA a partir de células sanguíneas brancas e através das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR-RFLP (para o alelo F) três diferentes regiões do locus *CSN1S1* foram avaliadas. Desta forma, obtiveram-se os genótipos de 215 fêmeas para os principais alelos, sendo 25 (AA), 26(AE), 35(AF), 55(EE), 57(EF) e 17(FF), observando-se que o alelo denominado de "A" representa qualquer "alelo alto". Para verificar os efeitos dos genótipos sobre os valores genéticos das características, foram realizadas análises de variância, estimativas de contrastes e comparações de médias pelo teste de Tukey. Observou-se associação entre os diferentes genótipos dos alelos que codificam a  $\alpha_{S1}$ -

caseína e os valores genéticos da maioria das características avaliadas ( $P < 0,05$ ). Os animais com genótipos AA e FF foram superiores aos de genótipos AE e EE para as características de produção dos constituintes do leite. Os animais com genótipo FF foram superiores em relação aos animais AE e EE, para duração da lactação e produção de leite até 270 dias de lactação. Os animais com genótipo AA e AE foram superiores em relação aos animais FF para porcentagem de gordura, proteína e extrato seco total no leite. Os animais de genótipo AA consistem em uma alternativa para conciliar a seleção para quantidade e qualidade do leite, por estarem relacionados com maiores produções e porcentagens dos constituintes do leite. Existem evidências de efeitos de sobredominância entre os alelos no genótipo AE para duração da lactação, produções de proteína, lactose e extrato seco total e porcentagem de gordura no leite.

**Palavras-chave:** Alpina,  $\alpha_{s1}$ -caseína, polimorfismo, Saanen.

## CHAPTER 1

### Influence of *CSN1S1* gene polymorphism on production and composition of goat milk

#### ABSTRACT

The  $\alpha_{s1}$ -casein, a major milk-coagulating proteins, is encoded by the gene *CSN1S1*, with at least 18 alleles in goats, divided into four levels of expression: high (A, B<sub>1-4</sub>, C, H, L and M alleles), medium (E and I alleles), low (D, F and G) and null production of this protein in milk (O<sub>1-3</sub> and N alleles). Due to the economic implications, the polymorphism effect of *CSN1S1* locus has been investigated and the allele frequencies have been determined in several countries. Thus, the aim with this work was verify if different alleles in the goat *CSN1S1* gene are associated with milk production until 270 days of lactation, lactation length, somatic cell count, production and percentages of fat, protein, lactose and total dry extract in milk. For this purpose were considered 2173 lactations of 1064 Saanen and Alpine goats, belonging to the Goat sector of Federal University of Viçosa, used to estimate breeding values for these characteristics. The animal model used contained the random effects of animal and permanent environment, and the fixed effects of contemporary group, type of kidding, genetic grouping, and kidding order. To obtain the female genotypes DNA samples were isolated from white blood cells and through Polymerase Chain Reaction (PCR) and PCR-RFLP (for F allele) techniques three different regions of *CSN1S1* locus were evaluated. Thus, the genotypes of 215 females were obtained for the major alleles, 25(AA), 26(AE), 35(AF), 55(EE), 57(EF) and 17(FF), observing that the allele called "A" represents any allele high. To check the effects of genotypes on breeding values of the characteristics, analyzes of variance, estimates of contrasts and comparisons of means by Tukey test were performed. The different genotypes of *CSN1S1* gene influence on the breeding values of most traits ( $P < 0.05$ ). Animals with AA and FF genotypes were higher than AE and EE for the production of the constituents of milk. Animals with genotype FF were higher than the AE and EE animals for the lactation length and milk production until 270 days. Animals with genotype

AA and AE were higher than the FF animals for percentage of fat, protein and total dry extract in milk. The animals of AA genotype are an alternative for conciliate the selection for quantity and quality of milk, being related to higher yields and percentages of milk components. There is evidence of overdominance effects among alleles in the AE genotype for lactation length, production of protein, lactose and total dry extract and fat percentage in milk.

**Keywords:** Alpine,  $\alpha_{s1}$ -casein, polymorphism, Saanen.

## INTRODUÇÃO

A identificação de genes polimórficos e a busca de associações destes polimorfismos com variações na produção e composição de proteínas no leite têm nortado muitas pesquisas. Entre os genes candidatos a desempenhar função sobre estas características, segundo BARILLET (2007), maior atenção tem sido dada ao gene que codifica a  $\alpha_{s1}$ -caseína.

As caseínas ( $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_{s2}$  e  $\kappa$ -caseína) representam cerca de 80% de todo o conteúdo protéico do leite de ruminantes, sendo que entre estas proteínas, a  $\alpha_{s1}$ -caseína ( $\alpha_{s1}$ -Cn) representa mais de 40% no leite bovino (FARRELL et al., 2004), enquanto que no leite de cabra pode variar de 0 a 25%, devido à ocorrência de polimorfismo no gene *CSN1S1* que codifica para esta proteína (BOULANGER et al., 1984). Segundo revisão apresentada por NEVEU et al. (2002), pelo menos 18 alelos neste locus já foram detectados em raças caprinas, e classificados em quatro níveis de expressão: alta (alelos A, B<sub>1-4</sub>, C, H, L e M), média (alelos E e I), baixa (D, F e G) e nula produção desta proteína no leite (alelos O<sub>1-3</sub> e N), sendo que altos níveis de  $\alpha_{s1}$ -caseína têm sido associados com maiores níveis de gordura, proteína total e conteúdo de caseínas, menores micelas de caseína, contendo menos cálcio, melhor potencial na fabricação de queijos, com maior produção e firmeza da coalhada (CLARK e SHERBON, 2000; GROSCLAUDE et al., 1987; REMEUF, 1993; CHILLIARD et al., 2003). Além destas associações, CHANAT et al. (1999), ao realizar estudos comparativos através de microscopia eletrônica e de dados morfológicos de cabras em lactação, concluíram que durante o processo de secreção do leite, a exportação eficiente das  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína para fora do retículo endoplasmático é dependente da  $\alpha_{s1}$ -caseína, pois em animais com alelos defectivos (O e F), a taxa de transporte das outras caseínas para o Aparelho de Golgi foi altamente reduzida, levando ao acúmulo de formas imaturas de caseínas e, conseqüentemente, a uma grande distensão dos retículos endoplasmáticos rugosos das células epiteliais mamárias. Estes resultados levantam a questão de verificar se estes polimorfismos estariam relacionados também com a “vida útil” das células epiteliais mamárias e assim influenciar outras características como a duração da lactação e a contagem de células somáticas. Outra importante consideração a ser feita é que o leite de cabras



com concentrações reduzidas de  $\alpha_{s1}$ -caseína (alelos nulos ou fracos) tem sido associado com menor sensibilidade em algumas pessoas com alergia ao leite de vaca (BEVILACQUA et al., 2001; EL-AGAMY, 2007), fornecendo, assim, outra base de seleção para produção de leite fluido com propriedades nutracêuticas na alimentação humana.

Uma vez que a investigação de polimorfismos gênicos pode possibilitar a descoberta de importantes associações com características de interesse econômico e explicar parte da variabilidade existente, as informações obtidas nestes estudos podem ser agregadas aos métodos de avaliação animal tradicionais, além de permitir um melhor planejamento dos acasalamentos e garantir uma maior frequência dos alelos favoráveis. Devido a isto, o efeito do polimorfismo no locus *CSN1S1* tem sido investigado e as frequências alélicas têm sido determinadas em vários países. No entanto, para caprinos e principalmente nos rebanhos brasileiros ainda há poucos estudos nesta área. Assim, estudos que verifiquem a existência de possíveis associações entre variações moleculares e características economicamente importantes em caprinos, principalmente em sistemas de criação brasileiros, são de grande importância. Objetivou-se com este trabalho, verificar se os polimorfismos no gene *CSN1S1* de caprinos estão associados com a produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, contagem de células somáticas, produção e porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *O banco de dados*

O banco de dados originalmente continha 3856 lactações referentes aos controles leiteiros realizados no período de 2000 a 2012, de 1622 cabras de grupamentos genéticos das raças Saanen e Alpina pertencentes ao rebanho do Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa (UFV/ MG). Os controles leiteiros foram realizados uma vez por semana, nos períodos da manhã e da tarde, e as coletas e análises do leite foram feitas mensalmente no Laboratório de Qualidade do Leite para quantificação da

contagem de células somáticas e dos teores de gordura, proteína, lactose e extrato seco total.

Para maior confiabilidade dos registros só foram consideradas lactações de partos simples ou duplos, com ordem do parto entre 1 e 6, primeiro controle leiteiro realizado antes do 35º dia de lactação, duração da lactação maior que 100 e menor que 450 dias e com produções superiores a 100 kg. Foram retiradas também as informações de 181 lactações que ainda não haviam sido encerradas até a data das análises. Feitas as restrições restaram 2.173 lactações com dados de produção de leite e duração da lactação, 1.585 lactações com dados de composição do leite e 1.469 de contagem de células somáticas.

Os animais foram classificados em 12 grupamentos genéticos (GG), de acordo com a composição racial: 50% Alpina : 50% Saanen (GG1); 51 a 68% Alpina (GG1); 69 a 81% Alpina (GG2); 82 a 93% Alpina (GG3); superior à 93% Alpina (GG4); 50% Alpina : 50% SRD (GG5); 51 a 68% SRD (GG5); 69 a 81% SRD (GG6); superior à 93% SRD (GG7); 50% Saanen : 50% SRD (GG8); 51 a 68% Saanen (GG8); 69 a 81% Saanen (GG9); 82 a 93% Saanen (GG10); superior à 93% Saanen (GG11) e 50% Alpina : 25% Saanen : 25% SRD (GG12). Os animais utilizados neste estudo são exclusivamente das raças Alpina ou Saanen, sendo SRD a denominação utilizada nos casos em que não havia a informação do reprodutor utilizado, se Saanen ou Alpino.

MENEZES et al. (2010) e BRITO et al. (2011), em diferentes estudos com caprinos leiteiros, sugeriram a utilização de algumas adaptações das medidas encontradas na literatura de bovinos de leite, como por exemplo, a utilização da duração de lactação de 268 dias (9 meses), em vez de 305 dias. Desta forma, no presente trabalho optou-se por estimar a produção total de leite até 270 dias de lactação (PL270), a qual foi estimada pela seguinte fórmula:

$$PL270 = \sum_{i=1}^{n-1} \left[ \left( \frac{pldc_i + pldc_{i+1}}{2} \right) * I_{i,i+1} \right],$$

em que: PL270 é a produção de leite acumulada até 270 dias da lactação;  $pldc_i$  é a produção de leite no controle leiteiro  $i$ ;  $pldc_{i+1}$  é a produção de leite

no controle leiteiro seguinte;  $I_{i,i+1}$  é o intervalo em dias entre dois controles consecutivos.

As produções dos constituintes do leite foram obtidas através do produto do valor de PL270 pela porcentagem média de gordura, proteína, lactose e extrato seco total. A contagem de células somáticas (CCS) foi transformada para escore de célula somática (ECS) através de:  $ECS = \log_2 (CCS / 100.000) + 3$ , em que CCS é o número de células por microlitro, contornando assim os problemas da CCS não seguir distribuição normal e não apresentar relação linear com a produção de leite (SHUTZ et al., 1995).

### A avaliação genética

Antes de estimar os valores genéticos dos animais, foram realizadas análises de variâncias (Tabela 1), através do método dos quadrados mínimos generalizados pelo procedimento GLM do SAS<sup>®</sup>(1995), para verificar os efeitos dos fatores grupo contemporâneo (determinado pelas classes de ano-estação de parto, sendo estação 1 de agosto a janeiro e estação 2 de fevereiro a julho), tipo de parto (simples ou duplo), grupamento genético e ordem de parto sobre as características em estudo, e assim determinar quais destes fatores seriam considerados como efeitos fixos no modelo de avaliação genética.

Tabela 1 - Resumo das análises de variância para as características de produção e composição do leite

Característica	Fonte de variação			
	Grupo contemporâneo	Grupamento genético	Tipo de parto	Ordem de parto
GL	23	11	1	5
PL270	*	*	*	*
Durl	*	NS	*	*
ECS	*	*	NS	*
Gord.	*	*	*	*
Prot.	*	*	*	*
Lact.	*	*	*	*
EST	*	*	*	*
% Gord.	*	*	*	NS
% Prot.	*	*	NS	*
% Lact.	*	*	NS	*
% EST	*	NS	*	NS

\* $P < 0,05$ . NS=Não significativo, GL = Graus de Liberdade, PL270 = produção de leite até 270 dias, DURL = duração da lactação, ECS = escore de células somáticas, Gord, Prot, Lact, EST, %Gord, %Prot, %Lact e %EST = produção e porcentagem de gordura, proteína, lactose e extrato seco total.

O arquivo de dados usado para estimar os valores genéticos dos animais foi obtido de forma a incluir todas as lactações com informação para pelo menos uma das características avaliadas, contendo, portanto, dados de 2173 lactações de 1064 cabras.

Para esta análise foi utilizado o aplicativo REMLF90, descrito por MISZTAL (2002), que utiliza a metodologia de máxima verossimilhança restrita (REML) e o algoritmo de Maximização da Esperança (EM), sendo realizada uma avaliação multicaracterísticas através de um modelo animal, contendo os efeitos aleatórios de animal e de ambiente permanente; e os efeitos fixos que foram significativos nas análises anteriores.

O modelo misto utilizado neste estudo pode ser descrito matricialmente por:

$$y = Xb + Zg + Wp + \varepsilon,$$

em que;

y é o vetor nq x 1 de observações de q características (PL270, Durl, ECS e Gord., Prot., Lact., EST, %Gord, %Prot., %Lact. e %EST) medidas em n animais;

X é a matriz nq x fq de incidência de f níveis dos efeitos fixos;

b é o vetor fq x 1 de efeitos fixos;

Z é a matriz nq x Nq de incidência dos efeitos aleatórios genéticos aditivos diretos;

g é o vetor Nq x 1 de valores genéticos;

W é a matriz nq x nq de incidência do efeito aleatório de ambiente permanente;

p é o vetor nq x 1 de soluções para o efeito de ambiente permanente;

$\varepsilon$  é o vetor nq x 1 de erros aleatórios.

Onde n = número de animais com observação; q = número de características avaliadas simultaneamente no mesmo modelo; f = número de níveis de efeitos fixos e N = número total de animais relacionados na matriz N x N do numerador dos coeficientes de parentesco de Wright (A).

As equações de modelos mistos (EMM), para características múltiplas, com efeito de ambiente permanente, podem ser representadas da seguinte forma:

$$\begin{bmatrix} X'R^{-1}X & X'R^{-1}Z & X'R^{-1}W \\ Z'R^{-1}X & Z'R^{-1}Z + G^{-1} & Z'R^{-1}W \\ W'R^{-1}X & W'R^{-1}Z & W'R^{-1}W + P^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b^0 \\ \hat{g} \\ \hat{p} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'R^{-1}y \\ Z'R^{-1}y \\ W'R^{-1}y \end{bmatrix};$$

em que;

$G=A \otimes G_0$ , sendo:

$G_0$  a matriz q x q de variâncias e covariâncias genética aditiva entre as características;

$P=I \otimes P_0$ , sendo:

I a matriz identidade n x n,

$P_0$  matriz  $q \times q$  de variâncias e covariâncias de efeito de ambiente permanente;

$R = I \otimes R_0$ , sendo:

$R_0$  a matriz  $q \times q$  de variâncias e covariâncias residuais entre as características;

$\otimes$  é o operador de produto direto.

As estimativas dos coeficientes de herdabilidade e repetibilidade para as características avaliadas foram obtidas por:

- Herdabilidade ( $h^2$ ):

$$\hat{h}^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_p^2};$$

- Repetibilidade ( $r$ ):

$$\hat{r} = \frac{\hat{\sigma}_g^2 + \hat{\sigma}_{ep}^2}{\hat{\sigma}_p^2};$$

em que;

$\hat{\sigma}_g^2$  é a estimativa da variância genética aditiva;

$\hat{\sigma}_{ep}^2$  é a estimativa da variância de ambiente permanente;

$\hat{\sigma}_p^2$  é a estimativa da variância fenotípica.

#### Obtenção dos genótipos para o locus CSN1S1

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Para a obtenção dos genótipos das fêmeas, foram isoladas amostras de DNA a partir de células sanguíneas brancas e realizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com posterior digestão dos fragmentos amplificados para o alelo F, técnica conhecida por PCR - *Restriction Fragment Length Polymorphis* (PCR-RFLP). Desta maneira, três diferentes regiões do locus *CSN1S1* foram avaliadas no total. A metodologia detalhada pode ser encontrada em SOARES et al. (2009).

Após a amplificação, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de poli(acrilamida) (PAGE) a 5% e corado com nitrato de prata, para visualizar os diferentes genótipos dos animais.

Associação dos polimorfismos no locus CSN1S1 com os valores genéticos das características avaliadas

Foram realizadas análises de variância e testes de médias para verificar os efeitos dos genótipos AA, AE, AF, EE, EF e FF sobre os valores genéticos das características em estudo. Nesta análise foram utilizadas informações dos genótipos de 215 animais, sendo 25 (AA), 26 (AE), 35 (AF), 55 (EE), 57 (EF) e 17 (FF).

O modelo utilizado para a análise de variância univariada pode ser descrito como:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + e_{ij}$$

em que:

$Y_{ij}$  é o valor genético do animal  $i$  ( $i = 1$  a 215) para cada característica avaliada;  $\mu$  é a média geral;  $\alpha_j$  é o efeito do genótipo  $j$  ( $j = AA, AE, AF, EE, EF$  e  $FF$ ) e  $e_{ij}$  é o efeito aleatório do resíduo, observando-se que o alelo denominado de “A” representa qualquer alelo alto.

Como os valores genéticos (VG) são as melhores estimativas disponíveis do componente genético aditivo, nenhum efeito ambiental foi incluído neste modelo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As estimativas de herdabilidade e repetibilidade para as características avaliadas (tabela 2) foram consistentes com os valores relatados na literatura (ANALLA et al., 1996; BREZNIK et al., 2000; BRITO et al., 2011; GONÇALVES et al., 2001; RIBEIRO, 1997; VÁZQUEZ et al., 2009).

A maioria das estimativas de herdabilidade e repetibilidade foi baixa, sendo que para as características com baixas estimativas de herdabilidade (menor que 0,20) e repetibilidade espera-se obter menores ganhos por meio de seleção, além disso uma única determinação das características estudadas pode não representar de forma acurada o desempenho dos animais em lactações futuras.

No entanto, as herdabilidades para a porcentagem dos constituintes do leite foram maiores, chegando à 0,36 para porcentagem de proteína. Resultados semelhantes foram encontrados por BRITO et al. (2011) ao avaliar características produtivas de caprinos, sendo ressaltado pelos autores o fato de no Brasil a seleção para aumento da produção de leite já ser realizada a algum tempo, enquanto a seleção para melhorar a qualidade do leite de cabra, através do aumento do teor de seus constituintes, é algo relativamente novo, logo para estas características ainda haveria um componente de variância genética aditiva proporcionalmente maior para ser explorado pela seleção.

A duração da lactação e escore de células somáticas apresentaram os menores valores de herdabilidade (0,07 e 0,009) e repetibilidade (0,12 e 0,24). RIBEIRO (1997) estudou a duração da lactação em cabras da raça Saanen e verificou herdabilidade de 0,06. SOARES FILHO et al. (2001), ao estudar a mesma característica em cabras Saanen, Alpinas e Toggenburg, encontraram, respectivamente, 0,07; 0,07 e 0,03 de herdabilidade. Já PIMENTA FILHO et al. (2004), ao estudar cabras mestiças Pardo Alpina x Gurguéia no Nordeste do Brasil, observaram herdabilidade e repetibilidade de 0,20 e 0,24, respectivamente, para duração da lactação.

Outros estudos também relataram baixas herdabilidades para CCS (ANDRADE et al., 2007; PEREIRA et al., 2008), desta forma, para esta característica espera-se obter respostas mais rápidas por melhoria nas condições ambientes, como a utilização de boas práticas higiênico-sanitárias.



Tabela 2 – Estimativas dos componentes de variância genético aditivo ( $\hat{\sigma}_a^2$ ) e de ambiente permanente ( $\hat{\sigma}_p^2$ ), herdabilidade ( $\hat{h}^2$ ) e repetibilidade ( $\hat{r}$ ).

Característica	$\hat{\sigma}_a^2$	$\hat{\sigma}_p^2$	$\hat{h}^2$	$\hat{r}$
PL270	4718	31902	0,15	0,38
Durl	339,8	5135,3	0,07	0,12
Gord	3,735	40,885	0,09	0,30
Prot	3,255	32,256	0,10	0,32
Lact	7,071	59,261	0,12	0,34
EST	45,350	437,4	0,10	0,32
%Gord	0,7156E-05	0,37837E-04	0,19	0,26
%Prot	0,345E-05	0,96195E-05	0,36	0,44
%Lact	0,1607E-05	0,925E-05	0,17	0,30
%EST	0,2176E-04	0,7662 E-04	0,28	0,41
ECS	0,007317	0,768917	0,009	0,24

PL270 = produção de leite até 270 dias, DURL = duração da lactação, ECS = escore de células somáticas, Gord, Prot, Lact, EST, %Gord, %Prot, %Lact e %EST = produção e porcentagem de gordura, proteína, lactose e extrato seco total.

Na Tabela 3 estão apresentadas as estimativas das correlações genéticas e de ambiente permanente entre as características avaliadas. Todas as correlações genéticas estimadas entre PL270 e as produções dos constituintes (em kg) do leite foram altas e positivas (>0,80). Assim como a correlação genética entre PL270 e duração da lactação (0,78), de forma que ao selecionar para aumentar a produção de leite, indiretamente estará selecionando para maior duração da lactação e maior produção de gordura, proteína, lactose e sólidos totais no leite.

A maioria das correlações genéticas entre PL270 e as porcentagens dos constituintes do leite foram negativas (exceto para porcentagem de lactose, a qual apresentou correlação com PL270 próxima de zero). Isto indica que parte dos genes que determinam a produção de leite também influencia em sua composição, porém no sentido de reduzir os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais, causando um efeito de diluição. Contudo, apesar das correlações genéticas entre PL270 e teores dos

constituintes do leite serem negativas, sua magnitude não é alta, sendo a maior magnitude encontrada entre PL270 e %Gord (-0,52).

No Brasil, apesar de alguns laticínios já efetuarem pagamento diferenciado, de acordo com a composição do leite, a maioria do leite de cabra ainda é consumido na forma fluída. No entanto, em alguns países, como a França, onde a maior parte do leite de cabra é destinada para a produção de queijos e derivados, a seleção para melhorar a composição do leite já é uma realidade.

A maioria das correlações genéticas entre as produções (kg) de gordura, proteína, lactose e sólidos totais foi superior a 0,90 e foram todas positivas. As correlações entre os teores (%) de gordura, proteína, lactose e sólidos totais foram também todas positivas, no entanto variaram mais quanto à magnitude, sendo os menores valores observados entre %Lact e %Prot (0,08) e %Lact e %Gord (0,26), e o maior valor entre %Gord e %EST (0,92).

As correlações genéticas entre o ECS e PL270, ECS e DURL e ainda ECS e produção dos constituintes do leite (kg) foram todas positivas e de magnitudes baixas a medianas, sendo que entre os constituintes do leite, a proteína foi a que apresentou maior correlação com o ECS (0,41). Já as correlações entre ECS e as porcentagens desses constituintes foram todas negativas, variando de -0,21 para %Prot e ECS a -0,41 para %Lact e ECS.

Tabela 3 - Estimativas das correlações genéticas (acima da diagonal) e das correlações de ambiente permanente (abaixo da diagonal) entre as características avaliadas

	Gord	%Gord	Prot	%Prot	Lact	%Lact	EST	%EST	DURL	PL270	ECS
Gord		-0,02	0,94	-0,01	0,87	0,18	0,95	0,04	0,65	0,81	0,37
%Gord	-0,05		-0,28	0,62	-0,45	0,26	-0,29	0,92	-0,47	-0,52	-0,31
Prot	0,97	-0,18		-0,03	0,92	0,10	0,98	-0,15	0,73	0,87	0,41
%Prot	-0,26	0,36	-0,15		-0,36	0,08	-0,18	0,79	-0,36	-0,48	-0,21
Lact	0,98	-0,14	0,99	-0,26		0,24	0,97	-0,34	0,83	0,97	0,37
%Lact	0,08	0,71	-0,04	0,07	0,04		0,18	0,48	0,26	0,08	-0,41
EST	0,99	-0,13	0,99	-0,23	0,99	0,03		-0,19	0,78	0,93	0,40
%EST	-0,07	0,95	-0,16	0,53	-0,14	0,78	-0,13		-0,34	-0,48	-0,39
DURL	0,75	0,14	0,66	-0,51	0,74	0,25	0,72	0,05		0,78	0,20
PL270	0,96	-0,18	0,98	-0,23	0,98	0,03	0,98	-0,15	0,71		0,44
ECS	-0,36	-0,20	-0,30	0,14	-0,34	-0,44	-0,34	-0,22	-0,42	-0,36	

PL270 = produção de leite até 270 dias, DURL = duração da lactação, ECS = escore de células somáticas, Gord, Prot, Lact, EST, %Gord, %Prot, %Lact e %EST = produção e porcentagem de gordura, proteína, lactose e extrato seco total.

Na Tabela 4 está apresentado um resumo das análises de variância dos valores genéticos das características em função dos genótipos do gene *CSN1S1* (AA, AE, AF, EE, EF e FF). Pode-se observar que o *p-value* foi menor que 0,05 para a maioria das características, o que indica que (considerando um nível de significância de 5%) os diferentes genótipos do gene *CSN1S1* influenciaram de alguma forma os valores genéticos destas características. Logo, para verificar quais genótipos foram favoráveis, testes de médias foram realizados.

Tabela 4 - Resumo das análises de variância para os valores genéticos (VG) das características estudadas em função dos genótipos do gene *CSN1S1* (AA, AE, AF, EE, EF e FF).

Característica	QMgenótipo	QMresidual	<i>p-value</i>
PL270	8694,1832	2107,4261	0,0014
DURL	488,40234	128,11786	0,0025
Gord.	5,0696602	1,4634672	0,0050
Prot.	4,0289174	1,3041755	0,0103
Lact.	12,6565799	3,0271870	0,0012
EST	68,971069	18,797207	0,0033
%Gord.	0,00001120	0,00000256	0,0008
%Prot.	0,00000620	0,00000162	0,0024
%Lact.	0,00000053	0,00000072	0,5954
%EST	0,00003057	0,00000955	0,0083
ECS	0,00253313	0,00133849	0,0969

PL270 = produção de leite até 270 dias, DURL = duração da lactação, ECS = escore de células somáticas, Gord, Prot, Lact, EST, %Gord, %Prot, %Lact e %EST = produção e porcentagem de gordura, proteína, lactose e extrato seco total.

Como os valores genéticos estimados seguem distribuição normal, com média igual a zero, as médias comparadas pelo teste de Tukey podem apresentar valores negativos ou mesmo nulos, como pode ser observado na

Tabela 5. De acordo com os resultados para este teste foi possível observar que os animais de genótipo AA apresentaram maiores valores genéticos para produção de gordura do que os de genótipos AE e EE. E de forma semelhante os genótipos FF e AA foram superiores a AE para produção de proteína, FF foi superior a EE e AE para produção de lactose, FF foi superior a EE e AE e ainda AA foi superior a AE para produção de extrato seco total. Assim, de forma geral, observou-se que os genótipos AA e FF foram superiores aos genótipos AE e EE para as características de produção, em kg, dos constituintes do leite de cabra.

Os testes de Tukey para duração da lactação e produção de leite (kg) até 270 dias de lactação mostraram também uma superioridade dos animais com genótipo FF em relação aos animais EE e AE, para estas características. No entanto, quando são analisados os resultados para os teores dos componentes do leite, observou-se uma tendência de inversão dos papéis entre os genótipos, de forma que o genótipo AE foi superior ao EF e FF e ainda AA e AF foram superiores ao FF para porcentagem de gordura e que os genótipos AA e AE foram superiores ao FF para porcentagem de proteína e de extrato seco total. Não foi observada nenhuma diferença entre os genótipos, para a contagem de células somáticas e para a porcentagem de lactose no leite, pelo teste de Tukey. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por REMEUF (1993), BARBIERI et al. (1995), SCHMIDELY et al. (2002) e CHILLIARD et al. (2003), nos quais foram observados teores de proteína e gordura do leite de animais FF significativamente menores que aqueles de animais AA e EE. HAYES et al. (2006) também observaram efeitos significativos do locus de  $\alpha_{s1}$ -caseína sobre as porcentagens de proteína e gordura e sobre a produção de gordura, mas não sobre a produção de leite de cabra. CHILLIARD et al. (2003) apontaram uma superioridade de 3g/kg no teor de gordura dos leites de cabras homocigotas para o genótipo AA em comparação às cabras do genótipo FF.

Tabela 5 – Teste de Tukey para as características avaliadas.

<b>Gord</b>			<b>Prot</b>			<b>Lact</b>		
$\alpha_{s1}$ - Cn médias			$\alpha_{s1}$ - Cn médias			$\alpha_{s1}$ - Cn médias		
AA	0,4737	A	FF	0,5368	A	FF	1,1181	A
FF	0,3407	A B	AA	0,5000	A	AA	0,3229	A B
AF	0,1865	A B	AF	0,1848	A B	AF	0,3162	A B
EF	-0,0434	A B	EF	0,1018	A B	EF	0,2112	A B
AE	-0,4290	B	EE	-0,2581	A B	EE	-0,4723	B
EE	-0,4835	B	AE	-0,3907	B	AE	-0,9012	B
<b>EST</b>			<b>Durl</b>			<b>PL270</b>		
FF	2,228	A	FF	8,321	A	FF	34,61	A
AA	1,404	A B	EF	2,994	A B	AF	12,81	A B
AF	0,767	A B C	AA	2,489	A B	AA	12,53	A B
EF	0,330	A B C	AF	2,107	A B	EF	11,94	A B
EE	-1,301	B C	EE	-0,814	B	EE	-9,16	B
AE	-1,873	C	AE	-5,314	B	AE	-15,80	B
<b>%Gord</b>			<b>%Prot</b>			<b>%EST</b>		
AE	0,00043	A	AA	0,00039	A	AE	0,00031	A
AA	-0,00007	A B	AE	0,00036	A	AA	0,00000	A
AF	-0,00027	A B	EE	-0,00005	A B	AF	-0,00073	A B
EE	-0,00046	A B C	AF	-0,0003	A B	EE	-0,00093	A B
EF	-0,00087	B C	EF	-0,00047	A B	EF	-0,00177	A B
FF	-0,00157	C	FF	-0,00092	B	FF	-0,00265	B

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si à 5% de significância. PL270 = produção de leite até 270 dias, DURL = duração da lactação, ECS = escore de células somáticas, Gord, Prot, Lact, EST, %Gord, %Prot, %Lact e %EST = produção e porcentagem de gordura, proteína, lactose e extrato seco total.

O teste de Tukey só permite comparar as médias duas a duas, enquanto através de contrastes (Tabela 6) foi possível comparar também grupos de médias entre si, além do fato de o teste F, utilizado para verificar a significância dos contrastes, ter se apresentado mais sensível em detectar diferenças entre as médias dos genótipos. De forma que além das diferenças já visualizadas pelo teste de Tukey, foi observado também superioridade do genótipo EF em relação ao EE para as características PL270 e produções de lactose e extrato seco total, superioridade do genótipo AA em relação ao EE para produção de proteína e de extrato seco

total. Quanto aos teores dos constituintes foi possível observar maior porcentagem de gordura e proteína para o genótipo AF em comparação ao FF e maior porcentagem de gordura para AE em comparação ao EE, o que confirma a superioridade do alelo A em relação aos alelos E e F, quando se trata de um leite mais rico em nutrientes.

Através dos contrastes também pode ser observado que os genótipos AE e EE apresentaram menores escores de células somáticas que o alelo AA (contrastes 3 e 6) e que o grupo formado por FF e AF (contraste 9). O maior ECS verificado em animais FF e AF reforça a suposição levantada anteriormente de que devido a uma disfunção no mecanismo de secreção do leite em cabras homocigotas para os alelos defectivos (O e F), com conseqüente retardamento no transporte intracelular de caseínas recém-sintetizadas e dilatação do retículo endoplasmático rugoso, como relatado por CHANAT et al. (1999), pode haver também uma relação entre os alelos defectivos e a descamação do epitélio da glândula mamária, o que justificaria o fato dos genótipos FF e AF terem apresentado maiores valores genéticos para escore de células somáticas quando comparados ao grupo de animais AE e EE. Quanto ao alelo intermediário E, CHANAT et al. (1999) observaram retículos endoplasmáticos somente moderadamente distendidos, no entanto no presente estudo os genótipos AE e EE foram associados a menores valores genéticos para escore de células somáticas, indicando que ao contrário do que poderia se pensar, o alelo E apresenta-se como o mais favorável para esta característica.

Apesar da característica escore de células somáticas ter apresentado herdabilidade muito baixa, indicando que melhorias maiores e mais rápidas podem ser conseguidas pela alteração das condições ambientes, a relação dos genótipos da  $\alpha_{s1}$ -caseína com o ECS é aqui discutida, pois tem seu valor biológico para a melhor compreensão do mecanismo de secreção do leite de cabras. Além disso, esta relação pode vir a se tornar importante se o objetivo do programa de seleção for produzir leite com pouco ou nenhuma quantidade de  $\alpha_{s1}$ -caseína, voltado para o consumo por pessoas alérgicas a esta proteína. Neste caso os animais FF seriam os mais desejáveis, por apresentarem maior produção de leite, com menor porcentagem de  $\alpha_{s1}$ -caseína.

Por outro lado se o objetivo do programa de melhoramento for obter um leite mais rico em nutrientes, para maior rendimento na produção de derivados, os animais AA deveriam ser selecionados, uma vez que estes produziram um leite com maiores porcentagens de gordura, proteína e EST, assim como maiores produções (kg) desses constituintes, sendo, portanto uma opção para melhorar a qualidade do leite de cabras.

Os programas de melhoramento podem apresentar diferentes objetivos de seleção, e desta forma atender aos diferentes nichos de mercado, tanto a produção de leite com baixa concentração de  $\alpha_{s1}$ -caseína, como a produção de um leite com maiores teores dos constituintes. Neste sentido, as informações obtidas neste estudo podem ser úteis, uma vez que a seleção unicamente pela produção de leite, sem considerar os efeitos dos alelos da  $\alpha_{s1}$ -caseína sobre a produção e composição do leite de cabra, poderia resultar na fixação de um determinado alelo favorável para produção de leite, no entanto com conseqüente perda de variabilidade. Assim, poderia ocorrer a perda de alelos favoráveis para outras características que venham apresentar maior importância econômica no mercado brasileiro, como os teores dos constituintes do leite, antes mesmo da abordagem destas características pelos programas de seleção.



Tabela 6 – Estimativas dos contrastes entre os genótipos para as características avaliadas.

		PL270	Durl	Gord	Prot	Lact	EST	%Gord	% Prot	%EST	ECS
<b>1</b>	AA + AE - FF - EF	-49,82*	-14,14*	-0,25	-0,53	-1,91*	-3,03	0,0027974*	0,00213*	0,0047367*	-0,01455
<b>2</b>	AA - FF	-22,07	-5,83	0,13	-0,04	-0,79	-0,82	0,0014986*	0,0013056*	0,0026529*	0,000191
<b>3</b>	AA - AE	28,34*	7,80*	0,90*	0,89*	1,22*	3,28*	-0,000499	3,03E-05	-0,0003154	0,02159*
<b>4</b>	FF - EF	22,66	5,33	0,38	0,43	0,91	1,90	-0,000699	-0,0004509	-0,0008845	0,006655
<b>5</b>	AA + AF - EE - EF	22,56	2,42	1,19*	0,84*	0,90	3,14*	0,0009892	0,0005991	0,0019632	0,01661
<b>6</b>	AA - EE	21,69	3,30	0,96*	0,76*	0,79	2,71*	0,0003916	0,0004353	0,0009291	0,019168*
<b>7</b>	AA - AF	-0,28	0,38	0,29	0,31	0,007	0,64	0,0002023	0,0006909*	0,0007343	0,009404
<b>8</b>	EE - EF	-21,1*	-3,81	-0,44	-0,36	-0,68*	-1,63*	0,0004083	0,0004194	0,0008393	-0,01232
<b>9</b>	FF + AF - EE - AE	72,38*	16,56*	1,44*	1,37*	2,81*	6,17*	-0,001808*	-0,001531*	-0,002773*	0,031163*
<b>10</b>	FF - EE	43,76*	9,13*	0,82*	0,79*	1,59*	3,53*	-0,001107*	-0,000870*	-0,001724*	0,018977
<b>11</b>	FF - AF	21,79	6,21	0,15	0,35	0,80	1,46	-0,001296*	-0,0006147	-0,001919*	0,009213
<b>12</b>	EE - AE	6,65	4,5	-0,05	0,13	0,43	0,57	-0,000891*	-0,000405	-0,0012445	0,002422
<b>13</b>	AA -2AF + FF	21,51	6,60	0,44	0,67	0,81	2,10	-0,00109	0,00008	-0,00118	0,0186
<b>14</b>	AA -2AE + EE	34,98	12,30*	0,85	1,02	1,65*	3,85	-0,00139	-0,00037	-0,00156	0,0240
<b>15</b>	EE -2EF + FF	1,57	1,52	-0,05	0,07	0,22	0,26	-0,00029	-0,00003	-0,00004	-0,0057

\*P<0,05 pelo teste F. PL270 = produção de leite até 270 dias, DURL = duração da lactação, ECS = escore de células somáticas, Gord, Prot, Lact, EST, %Gord, %Prot, %Lact e %EST = produção e porcentagem de gordura, proteína, lactose e extrato seco total. 1 = (AA e AE) vs (FF e EF), 2 = AA vs FF, 3 = AA vs AE, 4 = FF vs EF, 5 = (AA e AF) vs (EE e EF), 6 = AA vs EE, 7 = AA vs AF, 8 = EE vs EF, 9 = (FF e AF) vs (EE e AE), 10 = FF vs EE, 11 = FF vs AF, 12 = EE vs AE, 13 = (AA e FF) vs AF, 14 = (AA e EE) vs AE e 15 = (EE e FF) vs EF.

Outra questão importante para o entendimento da forma como estes alelos podem influenciar no fenótipo destas características está no fato de que através do contraste 14 (Tabela 6) foi possível observar efeitos de sobredominância para duração da lactação ( $p\text{-value} = 0,0192$ ), produção de proteína ( $p\text{-value} = 0,0530$ ), lactose ( $p\text{-value} = 0,0403$ ) e extrato seco total ( $p\text{-value} = 0,0552$ ) e para a porcentagem de gordura no leite ( $p\text{-value} = 0,0608$ ), sendo que o heterozigoto AE apresentou menor duração da lactação, menores produções de proteína, lactose e EST, contudo maior porcentagem de gordura do que os homozigotos AA e EE.

DAGNACHEW et al. (2011), também identificaram efeito de dominância significativo em um polimorfismo de base única (SNP14), caracterizado por uma deleção no exon 12 do gene *CSN1S1*, para produção (kg) e composição do leite, ou seja, o heterozigoto apresentou maior produção de leite e menores porcentagens de proteína, gordura e lactose do que os valores médios dos homozigotos. Além disso, ao estimar o grau de dominância, os autores observaram um efeito de dominância parcial para porcentagens de proteína e gordura e um efeito de sobredominância significativo para produção de leite ( $P < 0,01$ ) e porcentagem de lactose, porém com significância mais fraca ( $P < 0,10$ ) para a porcentagem de lactose.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que os diferentes genótipos do gene *CSN1S1* influenciam nos valores genéticos da maioria das características avaliadas.

Os animais de genótipo AA consistem em uma alternativa para conciliar a seleção para quantidade e qualidade do leite, por estarem relacionados com maiores produções e porcentagens dos constituintes do leite.

Existem evidências de efeitos de sobredominância entre os alelos no genótipo AE para duração da lactação, produções de proteína, lactose e extrato seco total e porcentagem de gordura no leite.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANALLA, M.; JIMÉNEZ-GAMERO, I.; MUÑOS-SERRANO, A. et al. Estimation of genetic parameters for milk yield and fat and protein contents of milk from Murciano-Granadina goats. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1895-1898, 1996.
- ANDRADE, L.M.; EL FARO, L.; CARDOSO, V. L.; ALBUQUERQUE, L. G.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Efeitos genéticos e de ambiente sobre a produção de leite e a contagem de células somáticas em vacas holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.343-349, 2007
- BARBIERI, M. E.; MANFREDI, E.; ELSEN, J. M.; et al. Influence du locus de la casein  $\alpha$ 1 sur les performances laitières et les paramètres génétiques des chèvres de race Alpine. **Genetics Selection and Evolution**, v.27, p.437-450, 1995.
- BARILLET, F. Genetic improvement for dairy production in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v.70, p.60-75, 2007
- BEVILACQUA, C.; MARTIN, P.; CANDALH, C.; et al. Goats milk of defective [alpha]s1-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to [beta]-lactoglobulin in guinea pigs. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.217-227, 2001.
- BOULANGER, A.; GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M.F. Polymorphism des caséines  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 de la chèvre (*Capra hircus*). **Genetics Selection and Evolution**, v.16, p.157-176, 1984.
- BREZNIK, S.; MALOVRH, S.; KOVAC, M. et al. Additive genetic and environmental variance components for milk traits in goat with test day model. **Zootehnika**, v.76, n.1, p.61-66, 2000.
- BRITO, L. F.; SILVA, F. G.; MELO, A. L. P.; CAETANO, G. C.; TORRES, R.A.; RODRIGUES, M.T. and MENEZES, G.R.O. Genetic and environmental factors that influence production and quality of milk of Alpine and Saanen goats. **Genetics and Molecular Research**. v.10, p.3794-3802, 2011.
- CHANAT, E.; MARTIN, P.; OLLIVIER-BOUSQUET, M.  $\alpha$ 1-casein is required for the efficient transport of  $\beta$  and  $\kappa$ -casein from the endoplasmic-reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells, **Journal of Cell Science**, v.112 p.3399-3412, 1999.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.5, p.1751-1770, 2003.

CLARK, S. and SHERBON, J. W. Alphas1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. **Small Rumin. Res.** v.38, p.123–134, 2000.

DAGNACHEW, B. S., THALLER, G., LIEN, S. AND ÅDNØY, T. Casein SNP in Norwegian goats: additive and dominance effects on milk composition and quality. **Genetics Selection and Evolution**, 43:31, 2011.

EL-AGAMY, E. I. The challenge of cow milk protein allergy. **Small Ruminant Research**, v.68, p.64–72, 2007.

FARRELL JR., H.M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G.T. et al. Nomenclature of the proteins of cows milk-sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.1641-1674, 2004.

GONÇALVES H.C., SILVA M.A., WECHSLER F.S. AND RAMOS A.A. Fatores genéticos e de meio na produção de leite de caprinos leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.30, p.719-729, 2001.

GROSCLAUDE F.; MAHÉ, M.F.; BRIGNON, G.; DI STASIO, L.; JEUNET, R. A mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat  $\alpha$ 1-casein. **Genetics Selection and Evolution**, v.19, p.399–412, 1987.

HAYES, B.; HAGESAETHER, N.; ADNOY, T.; PELLERUD, G.; BERG, P. R.; and LIEN, S. Effects on production traits of haplotypes among casein genes in Norwegian goats and evidence for a site of preferential recombination. **Genetics**, v.174, p.455–464, 2006.

MENEZES, G.R.O.; TORRES,R.A.; SARMENTO, J.L.R.; RODRIGUES, M. T.; MELO, A. L. P.; SILVA, F. G.; BRITO, L. F. Avaliação de medidas da persistência da lactação de cabras da raça Saanen sob modelo de regressão aleatória. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 1691-1698, 2010.

MISZTAL I (2002). REMLF90 Manual, 2002. Disponível em: [<http://nce.ads.uga.edu/~ignacy/numpub/blupf90/docs/remlf90.pdf>]. Acessado em Março 15, 2008.

NEVEU, C.; RIAUBLANC, A.; MIRANDA, G. et al. Is the apocrine milk secretion process observed in the goat species rooted in the perturbation of the intracellular transport mechanism induced by defective alleles at the  $\alpha$ S1-Cn locus? **Reproduction Nutrition Development**, v.42, p.163-172, 2002.

PEREIRA, R. J.; MELO, A. L. P.; SANTANA JÚNIOR, M. L.; BRITO, L. F.; ANGELINI, M. S.; MENEZES, G. R.O.; SILVA, F. G.; COSTA, E. V.; TORRES, R. A.; RODRIGUES, M. T. **Parâmetros genéticos para composição do leite e contagem de células somáticas de caprinos da raça Alpina**. VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, São Carlos, SP, 10 e 11 de julho de 2008.

PIMENTA FILHO, E.C.; SARMENTO, J.L.R.; RIBEIRO, M.N. Efeitos genéticos e ambientais que afetam a produção de leite e duração da lactação de cabras mestiças no estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1426-1431 2004.

REMEUF, F. Influence du polymorphisme de La caséine  $\alpha$ 1 caprine sur les caractéristiques physico-chimiques et technologiques du lait, **Lait**, v.73, p.549–557, 1993.

RIBEIRO, A.C. **Estudo dos efeitos genéticos e de ambiente sobre características de importância econômica em caprinos da raça Saanen**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 1997. 85p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, 1997.

SAS Institute (1995). SAS/ETS User's Guide. Version 6. 2nd edn. Cary.

SCHMIDELY, Ph; MESCHY, F.; TESSIER, J.; SAUVANT, D. Lactation response and nitrogen, calcium, phosphorus utilization of dairy goats differing by the genotype for  $\alpha$ 1- casein in milk, and fed diets varying in crude protein concentration. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.9, p.2399-2307, 2002.

SCHUTZ, M.M.; VANRADEN, P.M.; WIGGANS, G.R. et al. Standardization of lactation means of somatic cell scores for calculation of genetic evaluations. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.1843-1854, 1995.

SOARES, M. A. M.; RODRIGUES, M. T.; MOGNOL, G. P. et al. Polymorphism of alphas1-casein gene in a dairy goat herd in the southeastern region of Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.6, p.1026-1032, 2009.

SOARES FILHO, G.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A. S. Fatores Genéticos e Ambientais que Influenciam Algumas Características de Reprodução e Produção de Leite em Cabras no Distrito Federal. **Revista Brasileira de zootecnia**, v.30, p.133-140, 2001.

VÁZQUEZ, J. A. T.; POSADAS, M. V.; JUÁREZ, H. C.; et al. Genetic and phenotypic parameters of milk yield, milk composition and age at first kidding in Saanen goats from Mexico. **Livestock Science**. v.126, p.147–153, 2009.

## CAPÍTULO 2

### **Influência do polimorfismo no gene do hormônio de crescimento (*GH*) sobre a produção e composição do leite de cabras**

#### **RESUMO**

A influência do hormônio do crescimento (*GH*) sobre características relativas ao crescimento, lactação, reprodução e metabolismo é abordada em vários trabalhos, de forma que a identificação de polimorfismos no gene que codifica este hormônio (*GH*) é de interesse pela possibilidade de estarem associados com características de interesse econômico e desta maneira, serem utilizados como marcadores moleculares para auxiliar em programas de melhoramento animal. Em caprinos são poucos os trabalhos que relacionam polimorfismos no *GH* com características de produção e qualidade do leite, sobretudo nas condições de criação do Brasil. Assim, objetivou-se com este trabalho verificar se o polimorfismo existente nos exons 2 e 3 deste gene (*gGH*) em caprinos está associado com os valores genéticos estimados para a produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, contagem de células somáticas, produção e porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite. Para este propósito foram consideradas 2173 lactações de 1064 cabras de grupamentos genéticos das raças Saanen e Alpina, pertencentes ao rebanho do Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa, utilizadas para estimar os valores genéticos dos animais para estas características. O modelo animal utilizado continha os efeitos aleatórios de animal e de ambiente permanente; e os efeitos fixos de grupo contemporâneo, tipo de parto, grupamento genético e ordem de parto. Amostras de DNA foram isoladas a partir de células sanguíneas brancas e por intermédio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e subsequente digestão dos fragmentos amplificados (PCR-RFLP), foram obtidos os genótipos de 184 fêmeas, sendo 65 (AA), 107 (AB) e 12(BB). Para verificar os efeitos dos genótipos sobre os valores genéticos das características, foram realizadas análises de variância, estimativas de contrastes e comparações de médias pelo teste de Tukey. Nenhum efeito dos

genótipos do *GH* sobre os valores genéticos das características de produção e qualidade do leite de cabra foi observado ( $P>0,05$ ). Assim, apesar de outros estudos terem encontrado associação deste polimorfismo com características de crescimento, o mesmo não foi verificado no presente trabalho quando se considerou a produção e composição do leite. Entretanto, outros polimorfismos neste mesmo gene podem ser detectados e avaliados quanto à associação de melhor desempenho.

**Palavras-chave:** Alpina, hormônio do crescimento, polimorfismo, Saanen.

## CHAPTER 2

### **Influence of gene polymorphism of growth hormone (*GH*) on production and composition of milk goats**

#### **ABSTRACT**

The influence of growth hormone (GH) on characteristics related to growth, lactation, reproduction and metabolism is discussed in several papers, so the identification of polymorphisms in the gene encoding this hormone (*GH*) is of interest because of the possibility of being associated with characteristics of economic interest and in this way be used as molecular markers to assist in breeding programs. In goats there are few works that relate polymorphisms in the *GH* with production and quality of milk characteristics, especially in Brazil breeding conditions. Thus, the aim with this study was verify if the existing polymorphism in exons 2 and 3 of this gene (*gGH*) in goats is associated with estimated breeding values for milk production until 270 days of lactation, lactation length, somatic cell count, production and percentages of fat, protein, lactose and total dry extract in milk. For this purpose were considered 2173 lactations of 1064 Saanen and Alpine goats, belonging to the Goat sector of Federal University of Viçosa, used to estimate breeding values for these characteristics. The animal model used contained the random effects of animal and permanent environment, and the fixed effects of contemporary group, type of kidding, genetic grouping, and kidding order. DNA samples were isolated from white blood cells and through Polymerase Chain Reaction (PCR) technique and subsequent digestion of the amplified fragment (PCR-RFLP), genotypes were obtained from 184 females, 65 (AA), 107 (AB) and 12 (BB). To check the effects of genotypes on breeding values of the characteristics, analyzes of variance, estimates of contrasts and comparisons of means by Tukey test were performed. No effect of *GH* genotypes on breeding values of production and quality characteristics of goat milk was observed ( $P>0.05$ ). Thus, although other studies have found an association between this polymorphism and growth traits, the same was not observed in this study when considering the production and milk



composition. However, other polymorphisms in this gene can be detected and evaluated for association with the best performance.

**Keywords:** Alpine, growth hormone, polymorphism, Saanen.

## INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta em 1920, a influência do hormônio do crescimento (GH) sobre características relativas ao crescimento (BREIER, 1999), lactação (BALDI, 1999), reprodução (SCARAMUZZI et al., 1999) e metabolismo (BAUMAN, 1999) é abordada em vários trabalhos. No entanto, MARANHÃO (2003) ressaltou que devido os níveis plasmáticos de GH sofrerem variações em função de uma série de fatores, como estado fisiológico, nível nutricional e meio ambiente, a utilização direta desta característica em programas de melhoramento genético se torna inviável, sendo a determinação dos polimorfismos e genótipos dos animais para o gene *GH* uma alternativa para o uso como marcador molecular.

Uma das formas utilizadas para identificar os polimorfismos no gene *GH* é através do uso da técnica de amplificação de fragmentos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguido de digestão por enzimas de restrição, técnica conhecida como PCR-RFLP (do inglês: *Polymerase chain reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), ou seja, uma vez que animais apresentem sítios de clivagem não existentes em outros, ocorre a identificação de diferenças nas sequências do gene em estudo, correspondendo aos diferentes alelos presentes na população. ZHANG et al. (1992) e UNANIAN et al. (1994), por exemplo, identificaram dois polimorfismos no *bGH* através desta técnica, um no exon 5 e outro na região 3'UTR (do inglês: *untranslated region*), região anterior à sequência codificante do gene, que é transcrita mas não é traduzida. VUKASINOVIC et al. (1999), investigaram a associação de polimorfismos encontrados no locus *bGH*, através do uso de três enzimas de restrição (*MspI*, *AluI* e *HaeIII*), com características de produção de leite e concluiu que o locus *bGH* estaria supostamente ligado a um QTL (*quantitative trait locus*) que afetou a porcentagem de proteína e que poderia ainda estar ligado a um QTL com efeito sobre outras características do leite.

Polimorfismos no *GH* também foram identificados, pela técnica SSCP (*single strand conformation polymorphism*), em bovinos por KIRKPATRICK (1992); LAGZIEL et al. (1996) e YAO et al. (1996), em ovinos por MARQUES et al. (2001) e em caprinos por MALVEIRO et al. (2001), sendo que um dos polimorfismos encontrados por MARQUES et al. (2001) foi associado a

maior produção de leite e quatro polimorfismos encontrados por MALVEIRO et al. (2001) foram associados com produção de leite, gordura e proteína.

Tão importante quanto identificar o polimorfismo é verificar sua associação com características de interesse econômico, devido a isto, MOIOLI et al. (2007) ao fazer revisão sobre os genes que afetam a qualidade do leite de caprinos e ovinos ressaltou que apesar de muitos *loci* e seus efeitos serem investigados, nem todos os genes e características de qualidade são estudados a nível populacional, sendo que muitas vezes não há um sistema de controle que disponibilize informações de genealogia e de características de qualidade do leite, dificultando uma investigação de todas as possíveis associações entre alelos e estas características. YAO et al. (1996) consideraram as informações de genealogia ao investigar as variações nas sequências do gene *bGH*, pois utilizou os valores genéticos estimados pelo *BLUP* (*Best Linear Unbiased Prediction*) para as características do leite, através de um modelo animal. Assim, ao fazer a associação dos polimorfismos com os valores genéticos, nenhum efeito ambiental foi incluído no modelo, uma vez que os valores genéticos são as melhores estimativas do componente genético aditivo disponível.

Desta forma, estudos que verifiquem a existência de possíveis associações entre variações no DNA e características economicamente importantes em caprinos, principalmente em sistemas de criação brasileiros, são de grande importância. Além disso, as técnicas que investigam polimorfismo direto nesta molécula estão se tornando economicamente mais viáveis e tecnicamente mais fáceis de serem aplicadas em rebanhos comerciais. No entanto, apesar da importância do *GH* em mamíferos, a maioria dos estudos que envolvem a identificação de polimorfismos e seus efeitos sobre características produtivas foram realizados com bovinos e poucos foram os trabalhos encontrados envolvendo caprinos. Dado o exposto, objetivou-se com este trabalho, verificar se o polimorfismo *HaeIII* no exon 2 do gene *GH* de caprinos está associado com os valores genéticos estimados para a produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, contagem de células somáticas, produção e porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização da avaliação genética e estimação dos valores genéticos dos animais para as características avaliadas (produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, escore de células somáticas, produção e porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite) foi utilizado o mesmo banco de dados e metodologia apresentada no capítulo 1.

### Obtenção dos genótipos para o GH

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Para a obtenção dos genótipos das fêmeas, foram isoladas amostras de DNA a partir de células sanguíneas brancas e por intermédio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) um fragmento de 422 pb, referente aos éxons 2 e 3 do gene *GH*, foi amplificado, utilizando-se dos *primers* GH1F e GH1R, descritos por HUA et al. (2009).

Na reação de amplificação, além dos *primers* específicos (5 pmoles de cada) e do DNA genômico (aproximadamente 50 ng), foram adicionados 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Phoneutra - Brasil), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, e água ultra-pura, em um volume final de 20 µL. O programa de amplificação utilizado no termociclador constou de um passo inicial de desnaturação do DNA genômico a 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos, formados por três etapas, que compreenderam 30 segundos a 94°C para a abertura da fita molde, 30 segundos a 64°C para anelamento dos *primers* e 45 segundos a 72°C para a extensão da fita pela DNA polimerase. Ao final dos ciclos, foi deixado por mais 7 minutos para extensão final a 72°C.

Após a amplificação dos fragmentos por PCR, os fragmentos sofreram digestão por enzima de restrição, metodologia denominada de PCR-RFLP, (do inglês PCR- *Restriction Fragment Length Polymorphism*, No protocolo seguido foram utilizadas duas unidades da enzima de restrição *HaeIII* (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. Após a digestão, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de

poliacrilamida (PAGE) a 5% e corado com nitrato de prata, para interpretar os diferentes genótipos dos animais.

Associação dos polimorfismos no gene GH com os valores genéticos das características avaliadas

Foram realizadas análises de variância e testes de médias para verificar os efeitos dos genótipos sobre os valores genéticos das características em estudo. Nesta análise foram utilizadas informações dos genótipos de 184 animais.

O modelo utilizado para a análise de variância pode ser descrito como:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + e_{ij}$$

em que:

$Y_{ij}$  é o valor genético do animal  $i$  ( $i = 1$  a 184) para cada característica avaliada;  $\mu$  é a média geral;  $\alpha_j$  é o efeito do genótipo  $j$  ( $j = AA, AB$  e  $BB$ ) e  $e_{ij}$  é o efeito aleatório do resíduo.

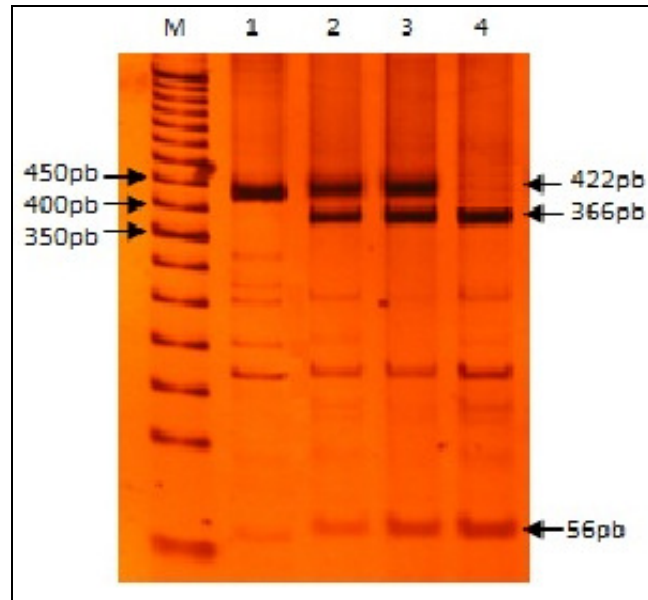
Como os valores genéticos são as melhores estimativas disponíveis do componente genético aditivo, nenhum efeito ambiental foi incluído neste modelo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estimativas da herdabilidade, repetibilidade e dos componentes de variância genético aditivo e de ambiente permanente, assim como as estimativas das correlações genéticas e de ambiente permanente obtidos na análise multicaracterística para as características avaliadas foram apresentadas no capítulo 1.

Neste estudo, avaliando as raças leiteiras, foi encontrado o mesmo polimorfismo relatado para a raça Bôer (HUA et al., 2009). Na Figura 1 podem ser observados os padrões de banda para animais homozigotos (AA), sem corte pela enzima *HaeIII* e heterozigotos (AB), com um sítio de corte para esta mesma enzima. Foram encontrados 65 cabras AA, 107 AB e 12 BB, enquanto no estudo realizado pelos autores citados anteriormente,

nenhum animal BB foi encontrado e as cabras com genótipo AB apresentaram cerca de 2 kg a mais ao desmame e cerca de 1,4 cm a mais de altura no perímetro torácico ao nascimento do que aquelas com genótipo AA ( $P < 0,05$ ).



**Figura 1.** Gel de eletroforese de poliacrilamida (PAGE) 5% de produtos de digestão pela enzima *HaeIII* do *gGH*. M = marcador de 50 pb (Amresco®). Canaleta 1 = fragmentos de 422 pb (produto de PCR), canaletas 2 e 3 = animais heterozigotos AB (com fragmentos de 422, 366 e 56 pb) e canaleta 4 = animal homozigoto AA (com fragmentos de 366 e 56 pb).

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados, respectivamente, o resumo das análises de variância e as estimativas dos contrastes dos valores genéticos das características em função do polimorfismo identificado para este gene. Nenhum efeito dos genótipos do *GH* sobre os valores genéticos das características foi observado pelas análises de variâncias, testes de Tukey e pelos contrastes estimados ( $p\text{-value} > 0,05$ ), de forma que o polimorfismo identificado neste estudo não é indicado como marcador para seleção dos animais com melhor desempenho para as características avaliadas. O polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) identificado está localizado no exon 2 e refere-se a substituição de uma A por G (A781G), causando a substituição de um aminoácido por outro na proteína (serina por glicina). Entretanto, esta substituição não deve ter influenciado nas funções

do hormônio do crescimento sobre às características avaliadas, uma vez que não foram observados efeitos significativos nos testes de associação.

Tabela 1 - Resumo das análises de variância dos valores genéticos (VG) das características estudadas em função dos genótipos para o gene *GH* (AA, AB e BB).

Característica	QMgenótipo	QMresidual	<i>p-value</i>
PL270	179,9682	2120,7548	0,9187
Durl	23,85741	127,53052	0,8295
Gord.	0,3457767	1,4548055	0,7887
Prot.	0,1510173	1,2369531	0,8851
Lact.	0,2730830	3,0506673	0,9144
EST	1,807776	18,528517	0,9071
%Gord.	0,00000311	0,00000277	0,3272
%Prot.	0,00000002	0,00000180	0,9880
%Lact.	0,00000034	0,00000072	0,6252
%EST	0,00000594	0,00001069	0,5748
ECS	0,00002879	0,00149462	0,9809

PL270 = produção de leite até 270 dias, Durl = duração da lactação, ECS = escore de células somáticas, Gord, Prot, Lact, EST, %Gord, %Prot, %Lact e %EST = produção e porcentagem de gordura, proteína, lactose e extrato seco total.

Tabela 2 – Estimativas dos contrastes entre os genótipos do gene *GH* (AA, AB e BB) para as características avaliadas.

Características	<b>AA-BB</b>	( <i>p-value</i> )	<b>AA-AB</b>	( <i>p-value</i> )	<b>AB-BB</b>	( <i>p-value</i> )
PL270	-3,68	(0,80)	1,65	(0,82)	-5,33	(0,70)
Durl	0,42	(0,90)	1,08	(0,54)	-0,66	(0,85)
Gord.	-0,25	(0,50)	-0,07	(0,72)	-0,18	(0,61)
Prot.	-0,08	(0,82)	0,06	(0,73)	-0,14	(0,68)
Lact.	-0,15	(0,78)	0,06	(0,83)	-0,21	(0,69)
EST	-0,51	(0,70)	0,06	(0,92)	-0,58	(0,66)
%Gord.	-5,13E-04	(0,33)	-3,62E-04	(0,17)	-1,51E-04	(0,77)
%Prot.	-6,15E-05	(0,88)	-2,04E-05	(0,92)	-4,11E-05	(0,92)
%Lact.	-2,31E-04	(0,39)	-9,12E-05	(0,49)	-1,40E-04	(0,59)
%EST	-7,90E-04	(0,44)	-4,75E-04	(0,36)	-3,14E-04	(0,75)
ECS	1,54E-03	(0,90)	1,10E-03	(0,85)	4,40E-04	(0,97)

Não significativo ( $p\text{-value}>0,05$ ). PL270 = produção de leite até 270 dias, Durl = duração da lactação, ECS = escore de células somáticas, Gord, Prot, Lact, EST, %Gord, %Prot, %Lact e %EST = produção e porcentagem de gordura, proteína, lactose e extrato seco total.

MALVEIRO et al. (2001) também estudaram os efeitos de polimorfismo do gene *gGH* sobre características de produção e qualidade do leite em cabras da raça portuguesa Algarvia, no entanto os autores utilizaram a metodologia de SSCP para detecção de variações genéticas. Neste estudo foram identificados polimorfismos de conformação em cinco exons do gene sendo que dois padrões de conformação foram encontrados nos exons 1 e 2, quatro no exon 3, seis no exon 4 e cinco no exon 5. A associação entre esses padrões de SSCP e as características do leite indicaram que os padrões dos exons 4 e 5 foram associados com produção de leite ( $P<0,05$ ), mas não com características de qualidade do leite, de forma que os autores sugeriram a utilização do *gGH* como gene candidato na seleção assistida por marcadores para produção de leite de cabras. MARQUES et al. (2003) também identificaram polimorfismos SSCP em cabras da raça portuguesa Serrana, sendo que os polimorfismos detectados nos exons 2 e 4 influenciaram a produção de leite e os polimorfismos nos exons 1 e 2 influenciaram a porcentagem de proteína no leite. Enquanto, DETTORI (2009) encontrou associação ( $P<0,01$ ) entre um padrão de



polimorfismo SSCP no éxon 3 deste gene com produção de leite e porcentagens de gordura, proteína e lactose.

Em estudo realizado por QUEIROZ (2008) com bovinos da raça Girolando, dois alelos diferentes foram encontrados para um polimorfismo no íntron 3 do *bGH*, por intermédio da enzima *MspI*. Os indivíduos homocigotos para o alelo C foram caracterizados pelos fragmentos de 526, 193, 109 e 63 pb, enquanto homocigotos para o alelo D foram determinados pela presença de 635, 193 e 63 pb. Os animais heterocigotos apresentaram cinco fragmentos de 635, 526, 193, 109 e 63 pb. Nesta análise foi observada uma superioridade do genótipo CC em relação ao DD ( $p=0,0479$ ) para a produção total de leite (+137,03 kg). Um efeito negativo do DD também foi demonstrado na produção média diária de leite, ao se comparar os genótipos CD ( $p=0,0515$ ) e CC ( $p=0,0222$ ) (- 490 g e - 570 g, respectivamente). No entanto, não houve efeito dos genótipos sobre a duração da lactação.

Desta forma, apesar do polimorfismo identificado neste estudo não ter influenciado as características de produção e qualidade de leite, outros estudos podem ser desenvolvidos no sentido de identificar outros polimorfismos no gene *gGH* que possam ser utilizados como marcadores moleculares para estas características e conseqüentemente auxiliar na seleção para os animais mais eficientes quanto ao desempenho produtivo.

### **CONCLUSÃO**

Conclui-se que o polimorfismo no éxon 2 (*HaeIII*) do gene *GH* de caprinos não influencia nenhuma das características de produção e qualidade do leite avaliadas neste estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDI, A. Manipulation of milk production and quality by use of somatotropin in dairy ruminants other than cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, p.131–137, 1999.

BAUMAN, D.E. Somatotropin mechanism in lactating cows: from basic science to commercial application. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, p.101–116, 1999.

BREIER, B.H. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotropic axis. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, p.209–218, 1999.

DETTORI, M. L., ROCCHIGIANI, A. M., PAZZOLA, M. et al. PCR-SSCP analysis of GH gene in Sarda goats: a high variability and its preliminary effects on dairy performances. **Italian Journal Animal Science**, v.8 (Suppl. 2), p.75-77, 2009.

HUA, G.H., CHEN, S.L., YU, J.N. et al. Polymorphism of the growth hormone gene and its association with growth traits in Boer goat bucks. **Meat Science**, v.81, p.391–395, 2009.

KIRKPATRICK, B.W. Detection of three-allele single strand conformation polymorphism (SSCP) in the fourth intron of the bovine growth hormone gene. **Animal Genetics**, v.23, p.179–181, 1992.

LAGZIEL, A., LIPKIN, E., SOLLER, M. Association between SSCP haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. **Genetics**, v.142, p.945–951, 1996.

MARANHÃO, A. M. **Efeito do polimorfismo do gene GH e suas relações com níveis de IGF-1, progesterona e escore corporal, produção de leite e dias em aberto em vacas Holandesas no início da lactação.** 2003. 90 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - SP.

MALVEIRO, E., PEREIRA, M., MARQUES, P.X., SANTOS, I.C., BELO, C., RENAUVILLE, R., CRAVADOR, A. Polymorphisms at the five exons of the growth hormone gene in the Algarvia goat: possible association with milk traits. **Small Ruminant Research**, v.41, p.163–170, 2001.

MARQUES, P.X., PEREIRA, M., MARQUES, M.R., SANTOS, I.C., BELO, C.C., RENAUVILLE, R., CRAVADOR, A. Association of milk traits with SSCP polymorphisms at the growth hormone gene in the Serrana goat. **Small Ruminant Research**, 50, 177–185, 2003.

MOIOLI, B., D'ANDREA, M., PILLA, F. Candidate genes affecting sheep and goat milk quality. **Small Ruminant Research**, v.68, p.179–192, 2007.

QUEIROZ, L. B. **Polimorfismo nos genes da via do hormônio do crescimento e efeitos nos índices produtivos em bovinos da raça Girolando**. 2008. 67p. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia – MG.

SCARAMUZZI, R.J., MURRAY, J.F., DOWNING, J.A., CAMPBELL, B.K. The effects of exogenous growth hormone on follicular steroid secretion and ovulation rate in sheep. **Domestic Animal Endocrinology** v.17, p.269–277, 1999.

UNANIAN, M.M., DENISE, S.K., ZHANG, H.M., AX, R.L. Rapid communication: polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in the bovine growth hormone gene. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2203, 1994.

VUKASINOVIC, N., DENISE, S.K., FREEMAN, A.E. Association of growth hormone loci with milk yield traits in Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.788–794, 1999.

YAO, J.; AGGREY, S. E.; ZADWORNÝ, D.; HAYES, J. F.; KUHNLEIN, U. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in holsteins. **Genetics**, v. 144, p. 1809-1816, 1996.

ZHANG, H.M., BROWN, D.R., DENISE, S.K., AX, R.L. Nucleotide sequence determination of a bovine somatotropin allele. **Animal Genetics**, v.23, p.578, 1992.

## CAPÍTULO 3

### Influência do polimorfismo na região promotora do gene *DGAT1* sobre a produção e composição do leite de cabras

#### RESUMO

O gene *DGAT1* codifica a enzima diacilglicerol aciltransferase 1, que catalisa a reação final da síntese de triacilglicerídeos nos adipócitos e que apresenta os níveis mais altos de expressão no intestino, testículo, tecido adiposo, glândulas mamárias e tecido epitelial. O gene *DGAT1* em bovinos têm apresentado um número significativo de polimorfismos associados com a produção de leite e com os teores dos constituintes do leite, principalmente com os teores de gordura. Um destes polimorfismos encontra-se na região promotora do gene e consiste em um número variável de repetições em tandem (*VNTR*), havendo evidências desta região de *VNTR* ser um importante sítio de ligação de fatores de transcrição e desta forma influenciar na expressão do *DGAT1*. Assim, objetivou-se com este trabalho, verificar se os polimorfismos *VNTR* no gene *DGAT1* de caprinos estão associados com a produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, contagem de células somáticas, produção e porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite. Para este propósito foram consideradas 2173 lactações de 1064 cabras de grupamentos genéticos das raças Saanen e Alpina, pertencentes ao rebanho do Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa, utilizadas para estimar os valores genéticos dos animais para estas características. O modelo animal utilizado continha os efeitos aleatórios de animal e de ambiente permanente; e os efeitos fixos de grupo contemporâneo, tipo de parto, grupamento genético e ordem de parto. Para realizar a genotipagem, amostras de DNA foram isoladas a partir de células sanguíneas brancas e por intermédio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase foram obtidos os genótipos de 104 fêmeas, 31 (*VNTR1/1*), 23 (*VNTR1/2*) e 50 (*VNTR2/2*). Para verificar os efeitos dos genótipos sobre os valores genéticos das características, foram realizadas análises de variância, estimativas de contrastes e comparações de médias pelo teste de Tukey. O polimorfismo *VNTR* identificado no gene

*DGAT1* de caprinos teve influência sobre os valores genéticos da duração da lactação, sendo que o alelo com maior número repetições em tandem (2/2) apresentou uma associação positiva com esta característica.

**Palavras-chave:** Alpina, polimorfismo, Saanen, VNTR.

## CHAPTER 3

### **Influence of polymorphism in the promoter region of the *DGAT1* gene on production and composition of goat milk**

#### **ABSTRACT**

*DGAT1* gene encoding the enzyme diacylglycerol acyltransferase 1, which catalyzes the final reaction of triglycerides synthesis in adipocytes and has the highest levels of expression in intestine, testis, fat, and mammary gland epithelial tissue. The bovine *DGAT1* gene has shown a significant number of polymorphisms associated with milk production and the proportion of milk components, especially with fat contents. One of this polymorphism is found in the promoter region of the gene and consists of a variable number of tandem repeats (VNTRs), with evidence of this region of VNTR be an important binding site of transcription factors and thus influence the expression of *DGAT1*. Thus, the aim with this work was verify if the VNTR polymorphism in *DGAT1* gene of goats are associated with milk production until 270 days of lactation, lactation length, somatic cell count, production and percentages of fat, protein, lactose and total dry extract in milk. For this purpose were considered 2173 lactations of 1064 Saanen and Alpine goats, belonging to the Goat sector of Federal University of Viçosa, used to estimate breeding values for these characteristics. The animal model used contained the random effects of animal and permanent environment, and the fixed effects of contemporary group, type of kidding, genetic grouping, and kidding order. To perform the genotyping DNA samples were isolated from white blood cells and through the technique of polymerase chain reaction (PCR) the genotypes of 104 females were obtained, 31 (VNTR1/1), 23 (VNTR1/2) and 50 (VNTR2/2). To check the effects of genotypes on breeding values of the characteristics, analyzes of variance, estimates of contrasts and comparisons of means by Tukey test were performed. The VNTR polymorphism identified in caprine *DGAT1* had an influence on breeding values of lactation length, and the allele with more tandem repeats (2/2) showed a positive association with this trait.

**Keywords:** Alpine, polymorphism, Saanen, VNTR

## INTRODUÇÃO

O gene *DGAT1* codifica a enzima diacilglicerol aciltransferase 1, que catalisa a reação final da síntese de triacilglicerídeos nos adipócitos, que são os principais componentes da gordura de depósito, inclusive no leite (CASES et al., 1998; KÜHN et al., 2004). Esta enzima se expressa em muitos tecidos, com os mais altos níveis de expressão no intestino, testículo, tecido adiposo, glândulas mamárias e tecido epitelial (CASES et al., 1998).

Pelo sequenciamento deste gene foi identificada uma substituição não conservativa de lisina (K) por alanina (A) na posição 232, a qual mostrou estar associada com a produção e composição do leite em várias populações e raças de bovinos leiteiros (WINTER et al., 2002 e SPELMAN et al., 2002). Em estudo realizado por GRISART et al. (2002) esta mutação, denominada de K232A, teve um efeito extremamente significativo sobre a produção de leite (kg), de proteína (kg) e gordura (kg) e porcentagens de proteína e de gordura no leite de bovinos. Uma característica interessante do efeito deste QTL é que a substituição de "q" (alanina) para "Q" (lisina) aumentou a produção de gordura, enquanto diminuiu a produção de leite e de proteína, apesar da correlação positiva destas três características de produção.

No entanto, diferenças aparentes nos tamanhos dos efeitos observados entre famílias e populações podem não ser completamente explicadas somente por este polimorfismo dialélico, de forma que BENNEWITZ et al. (2004) e KÜHN et al. (2004) relataram que uma variação genética adicional à mutação *DGAT1* K232A, afetando o teor de gordura no leite, poderia estar presente no mesmo QTL. Alelos da região promotora do gene *DGAT1*, os quais compreendem um número variável de repetições de uma sequência de 18 nucleotídeos (AGGCCCGCCCTCCCGG) foram considerados como candidatos já que análises genéticas revelaram que estes VNTRs (*variable number of tandem repeat*) estavam associados com a variação no teor de gordura do leite em animais homocigotos *DGAT1* 232A/232A (KÜHN et al., 2004). A associação dos alelos VNTR, com características de produção de leite está em conformidade com a hipótese de que características complexas podem resultar mais frequentemente a partir de variações nas regiões regulatórias do que na sequência de

codificação (GLAZIER et al., 2002), sendo que há evidências da região com polimorfismo VNTR possuir um importante sítio de ligação de fatores de transcrição (FURBASS et al., 2006).

Os teores dos constituintes do leite têm um efeito importante sobre a produção, firmeza, sabor e cor do queijo (LAMBERET et al., 2001), assim, considerável esforço tem sido dispendido pelos geneticistas de bovinos e ovinos em dissecar a arquitetura genética pela caracterização de QTLs e genes candidatos. No entanto, há uma considerável falta de conhecimento para cabras, já que muito poucos genes candidatos foram devidamente caracterizados (ANGIOLILLO et al., 2007). Objetivou-se com este trabalho, verificar se os polimorfismos VNTR no gene *DGAT1* de caprinos estão associados com a produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, contagem de células somáticas, produção e porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização da avaliação genética e estimação dos valores genéticos dos animais para as características avaliadas (produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, escore de células somáticas, produção e porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite) foi utilizado o mesmo banco de dados e metodologia apresentada no capítulo 1.

### Obtenção dos genótipos para o *DGAT1*

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Para a obtenção dos genótipos das fêmeas, foram isoladas amostras de DNA a partir de células sanguíneas brancas com o uso de CTAB, conforme descrito em SOARES et al. (2009).

Para a amplificação dos fragmentos de DNA contendo a região promotora do gene da *DGAT1* foram desenhados os *primers* (R) AGTAGCCACTGACGAGTGAAG e (F) GCCTAGCCTTGTCTCCACAG, baseados nas sequências já disponíveis no *GenBank* (no acesso



AJ318490.1) para bovinos, sendo esperado a obtenção de um fragmento de 777 pb. Na amplificação foram utilizados, além dos *primers* específicos (5 pmoles de cada) e do DNA genômico (aproximadamente 50 ng), foram adicionados 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Phoneutra - Brasil), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, e água ultra-pura, em um volume final de 20 µL. O programa de amplificação utilizado no termociclador constou de três etapas que compreenderam: desnaturação da fita molde, anelamento dos *primers* e a extensão da fita pela DNA polimerase. Estes passos foram repetidos para obtenção de quantidade suficiente de fragmentos. Nesta etapa foi utilizado o seguinte protocolo: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 40 segundos a 64°C para o anelamento e 2 minutos a 72°C, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Após a amplificação, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 5% e corado com nitrato de prata, para visualizar os diferentes genótipos dos animais, visto que eles diferem de tamanho. No total, 104 animais foram analisados quanto ao polimorfismo nesta região.

#### Associação dos polimorfismos no gene *DGAT1* com os valores genéticos das características avaliadas

Foram realizadas análises de variância e testes de médias para verificar os efeitos do polimorfismo na região promotora do gene *DGAT1* sobre os valores genéticos das características em estudo. O modelo utilizado para a análise de variância pode ser descrito como:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + e_{ij}$$

em que:

$Y_{ij}$  é o valor genético do animal  $i$  ( $i = 1$  a 104) para cada característica avaliada;  $\mu$  é a média geral;  $\alpha_j$  é o efeito do genótipo  $j$  ( $j = \text{VNTR1/1}$ ,  $\text{VNTR1/2}$  e  $\text{VNTR2/2}$ ) e  $e_{ij}$  é o efeito aleatório do resíduo.

Como os valores genéticos são as melhores estimativas disponíveis do componente genético aditivo, nenhum efeito ambiental foi incluído neste modelo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estimativas da herdabilidade, repetibilidade e dos componentes de variância genético aditivo e de ambiente permanente, assim como as estimativas das correlações genéticas e de ambiente permanente obtidos na análise multicaracterística para as características avaliadas foram apresentadas no capítulo 1.

Ao utilizar os *primers* projetados foi possível amplificar um fragmento com o tamanho esperado (777 pb em bovino), sendo identificado um polimorfismo na região promotora do gene *DGAT1* de caprinos, de forma que os animais apresentaram os seguintes genótipos 31 animais homocigotos para a banda mais baixa (VNTR1/1), 23 heterocigotos (VNTR1/2) e 50 homocigotos para a banda alta (VNTR2/2).

Observa-se que o polimorfismo identificado não influenciou nenhuma das características de produção e qualidade do leite de cabras, pela análise de variância à 5% de significância (Tabela 1), sendo que o menor *p-value* observado foi referente a análise para a duração de lactação.

Tabela 1 - Resumo das análises de variância para os valores genéticos (VG) das características estudadas em função do polimorfismo na região promotora do gene *DGAT1*.

Características	QMgenótipo	QMresidual	<i>p-value</i>
PL270	2093,2452	1828,3557	0,3224
Durl	306,52865	126,21209	0,0933
Gord.	1,0067225	1,4526639	0,5024
Prot.	1,6925921	1,2866918	0,2729
Lact.	3,8243758	2,8208831	0,2624
EST	21,287800	18,214631	0,3149
%Gord.	0,00000363	0,00000246	0,2339
%Prot.	0,00000033	0,00000121	0,7588
%Lact.	0,00000070	0,00000062	0,3277
%EST	0,00000815	0,00000872	0,3962
ECS	0,00191466	0,00132974	0,2418

PL270 = produção de leite até 270 dias, Durl = duração da lactação, ECS = escore de células somáticas, Gord, Prot, Lact, EST, %Gord, %Prot, %Lact e %EST = produção e porcentagem de gordura, proteína, lactose e extrato seco total.

O teste F, utilizado para verificar a significância dos contrastes, se mostrou mais sensível em detectar diferenças nos valores genéticos dos animais com diferentes VNTRs na região promotora do gene *DGAT1*, de forma que foi possível verificar efeito significativo ( $P < 0,05$ ) deste polimorfismo sobre a duração da lactação (Tabela 2). Assim, foi observado que os animais heterozigotos (VNTR1/2) apresentaram maiores valores genéticos para duração de lactação em relação aos animais homozigotos VNTR1/1, sendo que também foi observada uma tendência de superioridade dos animais VNTR2/2 em relação aos VNTR1/1 ( $p\text{-value} = 0,07$ ), indicando que o alelo alto, com maior número de VNTRs pode ser mais favorável para esta característica.

De acordo com KÜHN et al. (2004), a variação do número de repetições em tandem da sequência de 18 nucleotídeos na região promotora pode ser causal para a variabilidade no nível de transcrição do gene *DGAT1*. Esta hipótese é baseada no fato da região que compreende a VNTR conter o motivo CCCGCC, o qual é um potencial sítio de ligação para o fator de transcrição SP1 (ALBERTS et al., 1989). Os sítios de ligação SP1 frequentemente ocorrem em *clusters* e análises de mutação mostraram que o número de sítios de ligação SP1 dentro do *cluster* poderia determinar a taxa de transcrição do gene correspondente (YANG et al., 1995). Assim, a variabilidade no número de sítios de ligação, que é gerado pelo polimorfismo VNTR na região promotora do *DGAT1*, pode ser responsável pela variação na expressão e na atividade deste gene sobre a glândula mamária.

Observa-se, entretanto, que embora os fragmentos encontrados neste trabalho tenham recebido arbitrariamente a classificação de "1" e "2", não sabemos ainda exatamente a quantidade de repetições que cada fragmento apresenta e que, pela diferença de tamanho, provavelmente a diferença seja superior a 18pb, tamanho do VNTR encontrado em bovino por KÜHN et al. (2004).

ANGIOLILLO et al. (2007) caracterizaram 94% da região codificante do gene *DGAT1* caprino, através do sequenciamento de 1552 pares de base de nove cabras. Como nenhum polimorfismo foi identificado, os autores sequenciaram um fragmento genômico de 1 kb (do exon 12 ao 17) em 21 cabras com o objetivo de detectar maior variabilidade nas regiões dos

introns, no entanto apenas um SNP (transição de uma T por C) no intron 16 foi identificado, de forma que os autores concluíram que, de acordo com estes resultados, o polimorfismo no gene *DGAT1* em caprinos parece ser limitado. O que contrasta com o notável nível de polimorfismo no gene *DGAT1* bovino. De acordo com KÜHN et al. (2004) a manutenção de um maior número de alelos do gene *DGAT1* em bovinos do que em cabras, pode ser devido ao fato de que muitos destes alelos, e não somente o polimorfismo K232A, são positivamente selecionados por suas associações favoráveis com características do leite.

Tabela 2 – Estimativas dos contrastes entre os genótipos (VNTR1/1, VNTR1/2 e VNTR2/2) para as características avaliadas.

Características	2/2-1/1	(p-value)	2/2-1/2	(p-value)	1/2-1/1	(p-value)
PL270	10,72	(0,275)	-6,43	(0,552)	17,15	(0,148)
Durl	4,67	(0,072)	-1,52	(0,592)	6,19*	(0,048)
Gord.	0,18	(0,508)	-0,21	(0,497)	0,39	(0,243)
Prot.	0,27	(0,293)	-0,22	(0,433)	0,50	(0,113)
Lact.	0,51	(0,189)	-0,20	(0,644)	0,70	(0,131)
EST	1,05	(0,282)	-0,69	(0,524)	1,74	(0,141)
%Gord.	-4,61E-04	(0,201)	2,45E-04	(0,537)	-7,06E-04	(0,105)
%Prot.	-1,61E-04	(0,523)	3,62E-05	(0,896)	-1,97E-04	(0,516)
%Lact.	1,35E-04	(0,454)	2,93E-04	(0,142)	-1,58E-04	(0,467)
%EST	-5,01E-04	(0,460)	6,09E-04	(0,415)	-1,11E-03	(0,175)
ECS	1,08E-03	(0,897)	-1,41E-02	(0,126)	1,52E-02	(0,132)

\*p-value<0,05. PL270 = produção de leite até 270 dias, Durl = duração da lactação, ECS = escore de células somáticas, Gord, Prot, Lact, EST, %Gord, %Prot, %Lact e %EST = produção e porcentagem de gordura, proteína, lactose e extrato seco total. 2/2-1/1 = VNTR2/2-VNTR1/1, 1/1-1/2 = VNTR1/1-VNTR1/2 e 1/2-1/1 = VNTR1/2-VNTR1/1.

LUIZETTI (2010) analisou a existência de polimorfismos VNTR na região promotora do gene *DGAT1* em 72 vacas, predominantemente da raça Holandesa, 35 cabras das raças Alpina, Saanen e Bôer e 5 ovelhas da raça Santa Inês, sendo encontrados quatro alelos em bovinos e um polimorfismo em caprinos das raças Alpina e Saanen. Os fragmentos amplificados para caprinos apresentaram tamanhos de aproximadamente 700 pares de base,

pois o desenho dos *primers* foi feito baseado na sequência de nucleotídeos bovina, em que é esperado um fragmento de 777 pares de base. No entanto, neste estudo não foi feita o estudo de associação dos polimorfismos com características de produção.

SCATA et al. (2009) sequenciaram 8676 pb do gene *DGAT1*, incluindo introns e parte das regiões 5'UTR e 3'UTR em três raças italianas de ovinos (Sarda, Altamura e Gentile di Puglia), e encontrou 5 novos SNPs, sendo que um SNP (5553 C>T) localizado no intron 2 apresentou frequência similar nas três raças e associação negativa com teor de gordura no leite. Além disso, os autores encontraram um SNP na região 5'UTR (127C>A) de ocorrência rara nas raças de maior teor de gordura no leite (Altamura e Gentile di Puglia), que está localizado em um sítio de ligação do fator de transcrição SP1.

O forte efeito do polimorfismo K232A e VNTR no gene *DGAT1* bovino na composição do leite e a identificação de um QTL para o conteúdo de gordura do leite no cromossomo 9 de ovinos (BARILLET et al., 2005), o qual é ortólogo à região do cromossomo 14 de bovinos que contém o gene *DGAT1*, justifica o interesse em caracterizar a seqüência deste gene em caprinos e identificar polimorfismos que poderiam ser utilizados em estudos de associação com características do leite e do queijo. No entanto, o polimorfismo identificado neste estudo não teve nenhuma influência sobre a composição do leite de cabras.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que o polimorfismo VNTR identificado gene *DGAT1* de caprinos têm influência a duração da lactação, sendo que o alelo com um maior número repetições em tandem apresenta uma associação positiva com esta característica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. *et al.* **Molecular Biology of the Cell**, pp. 551–612. Garland Publishing, New York/London, 1989.

ANGIOLILLO, A.; AMILLS, M.; URRUTIA, B.; *et al.* Identification of a single nucleotide polymorphism at intron 16 of the caprine Acyl-Coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene. **Journal of Dairy Research**, v.74, p. 47–51, 2007.

BARILLET, F.; ARRANZ, J.J. & CARTA, A. Mapping quantitative trait loci for milk production and genetic polymorphisms of milk proteins in dairy sheep. **Genetics Selection and Evolution**, v.37 (Suppl. 1), p.109–123, 2005.

BENNEWITZ, J.; REINSCH, N.; PAUL, S.; *et al.* The DGAT1 K232A mutation is not solely responsible for the milk production quantitative trait locus on the bovine chromosome 14. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.431–442, 2004.

CASES, S.; SMITH, S.J.; ZHENG, Y.W. *et al.* Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v.95, p.13018-13023, 1998.

FÜRBASS, R.; WINTER, A.; FRIES, R. *et al.* Alleles of the bovine *DGAT1* variable number of tandem repeat associated with a milk fat QTL at chromosome 14 can stimulate gene expression. **Physiological Genomics**, v.25, p.116-120, 2006.

GLAZIER, A. M.; NADEAU, J. H. and AITMAN, T. J. Finding genes that underlie complex traits. **Science**. v.298, p.2345–2349, 2002.

GRISART, B.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F. *et al.* Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research**, v.12, p.222–231, 2002.

KÜHN, C.; Thaller, G.; Winter, A.; Bininda-Emonds, OR.; Kaupe, B.; Erhardt, G.; Bennewitz, J.; Schwerin, M.; and Fries, R. Evidence for multiple alleles at the DGAT1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. **Genetics** 167: 1873–1881, 2004.

LAMBERET, G.; DELACROIX-BUCHET, A. & DEGAS, C. Intensity of initial lipolysis in goats' milk and the perception of 'goaty' aroma in the cheese. (Ed. ITPLC). In: Proceedings of the Technical Symposium, 7th International Conference on Goats: Recent Advances on Goat Milk Quality, Raw Material for Cheesemaking, Poitiers, France, pp. 130–139, 2001.

LUIZETTI, F. **Polimorfismo de VNTR na região promotora do gene *dgat1* em bovinos leiteiros, caprinos e ovinos**. 2010. 43 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá – PR.

SCATA, M.C., F. NAPOLITANO, S. CASU, A. CARTA AND G. DE MATTEIS et al. Ovine acyl CoA: Diacylglycerol acyltransferase 1-molecular characterization, polymorphisms and association with milk traits. **Animal Genetics**, v.40, p.737-742, 2009.

SOARES, M. A. M.; RODRIGUES, M. T.; MOGNOL, G. P. et al. Polymorphism of alphas1-casein gene in a dairy goat herd in the southeastern region of Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.6, p.1026-1032, 2009.

SPELMAN, R.J.; FORD, C.A.; MCELHINNEY, P.; et al. Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.3514–3517, 2002.

WINTER, A.; KRÄMER, W.; WERNER, F.A. et al. Association of a lysine-232-alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v.99, p.9300-9305, 2002.

YANG, X., FYODOROV, D. AND DENNERIS, E. S. Transcriptional analysis of acetylcholine receptor  $\alpha 3$  gene promoter motifs that bind Sp1 and AP2. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.8514–8520, 1995.

## CAPÍTULO 4

### Influência do polimorfismo no gene *POU1F1* sobre a produção e composição do leite de cabra

#### RESUMO

O *POU1F1* (*Pituitary-specific positive transcription factor 1*) é um fator de transcrição, expresso principalmente na glândula pituitária (hipófise), que exerce uma função reguladora do hormônio do crescimento (GH), da prolactina (PRL) e do hormônio estimulador da tireóide  $\beta$  (TSH $\beta$ ) em mamíferos, de forma que variações genéticas neste gene têm sido associadas com desempenho para características de interesse econômico em bovinos e suínos. No entanto, o gene *POU1F1* ainda é pouco estudado em caprinos, sendo que a maioria dos estudos que envolvem a identificação de polimorfismos e seus efeitos sobre características produtivas foram realizados na China. Estudos que verifiquem a existência deste tipo de associação, principalmente em sistemas de criação brasileiros, podem auxiliar na seleção dos animais mais produtivos. Assim, objetivou-se com este trabalho, verificar a existência de polimorfismo no *POU1F1* em caprinos das raças Saanen e Alpina e verificar a associação com a produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, contagem de células somáticas, produção e porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite. Para este propósito foram consideradas 2173 lactações de 1064 cabras de grupamentos genéticos das raças Saanen e Alpina, pertencentes ao rebanho do Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa, utilizadas para estimar os valores genéticos dos animais para estas características. O modelo animal utilizado continha os efeitos aleatórios de animal e de ambiente permanente; e os efeitos fixos de grupo contemporâneo, tipo de parto, grupamento genético e ordem de parto. Amostras de DNA foram isoladas a partir de células sanguíneas brancas e por intermédio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e subsequente digestão dos fragmentos amplificados (PCR-RFLP), foram obtidos os genótipos de 182 fêmeas, sendo 163 animais (AA), 16 (AB) e 3 (BB). Para verificar os efeitos dos genótipos sobre os valores genéticos das



características, foram realizadas análises de variância, estimativas de contrastes e comparações de médias pelo teste de Tukey. Nenhum efeito dos genótipos do *POU1F1* sobre os valores genéticos das características de produção e qualidade do leite de cabra foi observado ( $P>0,05$ ), de forma que o polimorfismo identificado neste estudo não é indicado como marcador para seleção dos animais de melhor desempenho. Outros estudos podem ser feitos no sentido de avaliar uma região maior do gene *POU1F1* e identificar outros polimorfismos que apresentem influência sobre estas características.

**Palavras-chave:** Alpina, fator de transcrição, polimorfismo, Saanen.

## CHAPTER 4

### Influence of *POU1F1* gene polymorphism on production and composition of goat milk

#### ABSTRACT

The *POU1F1* (Pituitary-specific positive transcription factor 1) is a transcription factor expressed primarily in the pituitary gland (hypophysis), which plays a regulatory role of growth hormone (GH), prolactin (PRL) and thyroid stimulating hormone  $\beta$  (TSH $\beta$ ) in mammals, so that genetic variations in this gene have been associated with performance traits of economic interest in cattle and pigs. However, the *POU1F1* gene has been little studied in goats, and the majority of studies involving the identification of polymorphisms and its effects on traits have been conducted in China. Studies to verify the existence of such association, especially in farming systems in Brazil, can assist in the selection of more productive animals. Thus, the aim with this work was verify the existence of polymorphism in the *POU1F1* in goats of Saanen and Alpine breeds and its association with milk production until 270 days of lactation, lactation length, somatic cell count, production and percentages of fat, protein, lactose and total dry extract in milk. For this purpose were considered 2173 lactations of 1064 Saanen and Alpine goats, belonging to the Goat sector of Federal University of Viçosa, used to estimate breeding values for these characteristics. The animal model used contained the random effects of animal and permanent environment, and the fixed effects of contemporary group, type of kidding, genetic grouping, and kidding order. DNA samples were isolated from white blood cells and through Polymerase Chain Reaction (PCR) technique and subsequent digestion of the amplified fragment (PCR-RFLP), genotypes were obtained from 182 goats, 163 (AA), 16 (AB) e 3 (BB). To check the effects of genotypes on breeding values of the characteristics, analyzes of variance, estimates of contrasts and comparisons of means by Tukey test were performed. No effect of *POU1F1* genotypes on breeding values of production and quality characteristics of goat milk was observed ( $P > 0.05$ ), so the polymorphism identified in this study is not indicated as a marker for

selection of animals with better performance. Other studies can be made to evaluate a larger region of the *POU1F1* and identify others polymorphisms that have influence on these characteristics.

**Keywords:** Alpine, polymorphism, Saanen, transcription factor

## INTRODUÇÃO

O *POU1F1* (*Pituitary-specific positive transcription factor 1*, também chamado *PIT-1* ou *GHF-1*) corresponde a um fator de transcrição expresso principalmente na hipófise, sendo que sua expressão é necessária para que ocorra a diferenciação, desenvolvimento e manutenção normal de três tipos de células da adenohipófise (tireotrofos, somatotrofos e lactotrofos) (LI et al., 1990). É também um regulador do hormônio do crescimento (GH), da prolactina (PRL) e do hormônio estimulador da tireóide  $\beta$  (TSH $\beta$ ) em mamíferos, assim, mutações no gene *POU1F1* possivelmente resultam em diferentes expressões destes hormônios e do próprio *POU1F1* (COHEN et al., 1997). Em bovinos e suínos, variações genéticas neste gene têm sido associadas com o desempenho em características de interesse econômico (YU et al., 1995; RENAUILLE et al., 1997a,b; STANCEKOV et al., 1999; SUN et al., 2002).

Apesar da importância observada deste gene em outros mamíferos, o *POU1F1* ainda é pouco estudado em caprinos, sendo que a maioria dos estudos que envolvem a identificação de polimorfismos e seus efeitos sobre características produtivas foram realizados na China. Assim, entre os polimorfismos encontrados nestes estudos pode-se citar uma mutação T>G no 60º nucleotídeo do exon 6, a qual resultou em um alelo silencioso (S241S na proteína de 291 aminoácidos) identificado pela endonuclease *Ddel*, que mostrou estar associado ( $P < 0,05$ ) com a produção de leite de cabras nativas da China (LAN et al., 2007a). Além da mutação T>G (S241S), outras três mutações, T-C no sexto exon e T-C e A-G na região 3'UTR, foram encontradas por LAN et al. (2007c), sendo que a mutação T-C no 174º nucleotídeo do sexto exon também corresponde a um alelo silencioso (S279S), que foi identificado pela endonuclease *AluI* e apresentou associação ( $P < 0,05$ ) com a produção de leite e peso ao nascimento.

Uma vez que a associação entre polimorfismos genéticos e características de interesse econômico é encontrada, essa informação pode ser agregada aos métodos de avaliação tradicionais. Assim, estudos que verifiquem a existência dessas possíveis associações, principalmente em sistemas de criação brasileiros, são de grande importância. Objetivou-se com este trabalho, verificar se existe associação do polimorfismo *AluI*/exon 6

no gene *POU1F1* com a produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, contagem de células somáticas, produção e porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite, em caprinos das raças Saanen e Alpina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização da avaliação genética e estimação dos valores genéticos dos animais para as características avaliadas (produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, contagem de células somáticas, produção e porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite) foi utilizado o mesmo banco de dados e metodologia apresentada no capítulo 1.

### Obtenção dos genótipos para o *POU1F1*

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Para a obtenção dos genótipos das fêmeas, foram isoladas amostras de DNA a partir de células sanguíneas brancas e por intermédio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) um fragmento de 530 pb, referente ao éxon 6 do gene *POU1F1*, foi amplificado, utilizando-se dos *primers* (P3) descritos por LAN et al. (2007c).

Na amplificação foram utilizados, além dos *primers* específicos (5 pmoles de cada) e do DNA genômico (aproximadamente 50 ng), foram adicionados 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Phoneutra - Brasil), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, e água ultra-pura, em um volume final de 20 µL.

O programa de amplificação utilizado no termociclador constou de um passo inicial de desnaturação do DNA genômico a 95°C por 4 minutos seguido de 35 ciclos, formados por três etapas, que compreenderam 45 segundos a 94°C para a abertura da fita molde, 45 segundos a 54,5°C para anelamento dos *primers* e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita pela DNA polimerase. Ao final dos ciclos, foi deixado por mais 5 minutos para extensão final a 72°C.

Após a amplificação dos fragmentos por PCR, os fragmentos sofreram digestão por enzima de restrição, metodologia denominada de PCR-RFLP, (do inglês PCR- *Restriction Fragment Length Polymorphism*). No protocolo seguido foram utilizadas duas unidades da enzima de restrição *AluI* (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. Após a digestão, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 5% e corado com nitrato de prata, para interpretar os diferentes genótipos dos animais.

*Associação dos polimorfismos no gene POU1F1 com os valores genéticos das características avaliadas*

Foram realizadas análises de variância e testes de médias para verificar os efeitos dos genótipos sobre os valores genéticos das características em estudo. Nesta análise foram utilizadas informações dos genótipos de 182 animais. O modelo utilizado para a análise de variância pode ser descrito como:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + e_{ij}$$

em que:

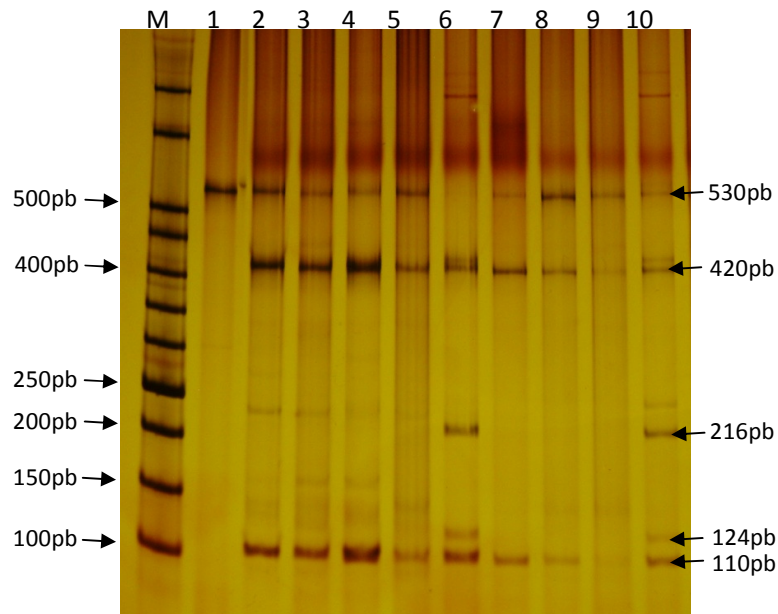
$Y_{ij}$  é o valor genético do animal  $i$  ( $i = 1$  a  $182$ ) para cada característica avaliada;  $\mu$  é a média geral;  $\alpha_j$  é o efeito do genótipo  $j$  e  $e_{ij}$  é o efeito aleatório do resíduo.

Como os valores genéticos são as melhores estimativas disponíveis do componente genético aditivo, nenhum efeito ambiental foi incluído neste modelo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As estimativas da herdabilidade, repetibilidade e dos componentes de variância genético aditivo e de ambiente permanente, assim como as estimativas das correlações genéticas e de ambiente permanente obtidos na análise multicaracterística para as características avaliadas foram apresentadas no capítulo 1.

Com os *primers* utilizados foi amplificado um fragmento de aproximadamente 530 pb, maior que o fragmento de 450 pb descrito por LAN et al. (2007c), de onde as sequências dos *primers* foram obtidas. Estes autores, ao digerir o fragmento com a enzima *AluI* verificaram dois padrões de corte, sendo denominado de alelo A o padrão com dois fragmentos (340 e 110 pb) e de alelo B o padrão com três fragmentos (216, 124 e 110 pb). No presente trabalho, ao realizar a digestão com a mesma enzima, verificou-se que o fragmento de 340 pb não apareceu no alelo A, sendo substituído por outro fragmento estimado em 420 pb (Figura1), o que torna este polimorfismo um pouco diferente do descrito pelos autores. Entretanto, foram mantidas as mesmas denominações até que estudos de sequenciamento possam esclarecer o polimorfismo encontrado.



**Figura 1.** Gel de eletroforese de poliacrilamida (PAGE) 5% de produtos de digestão pela enzima *AluI* do *POU1F1*. M = marcador de 50 pb (Amresco®). Canaleta 1 = fragmentos de 530 pb (produto de PCR), canaletas 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9 = animais homocigotos AA (com fragmentos de 110 e 420 pb) e canaletas 6 e 10 = animais heterocigotos AB (com fragmentos de 110, 124, 216 e 420 pb).

Nenhum efeito dos genótipos do *POU1F1* (AA, AB e BB) sobre os valores genéticos das características de produção e qualidade do leite de cabras foi observado a 5% de significância (Tabelas 1 e 2), sendo o menor

*p-value* encontrado para PL270 (0,06) ao comparar os genótipos AA e AB (Tabela 2).

Neste estudo foram observados 163 animais (AA), 16 (AB) e 3 (BB), de acordo com o polimorfismo identificado no gene *POU1F1* de caprinos. O fato da frequência observada de animais com genótipo BB ser muito baixa, pode ter dificultado a estimação dos efeitos do alelo B, de forma que se houvessem mais animais com este genótipo, talvez fosse possível verificar maiores diferenças devido ao polimorfismo identificado. A baixa frequência do alelo B pode ser devido a simplesmente pelo fato de este ser um alelo raro ou devido este ser um alelo menos favorável, que veio a ter sua frequência reduzida diante de um processo de seleção natural e/ou artificial, através da reprodução dos animais mais adaptados e produtivos.

Tabela 1 - Resumo das análises de variância para os valores genéticos das características estudadas em função dos genótipos do gene *POU1F1* (AA, AB e BB).

Características	QMgenótipo	QMresidual	<i>p-value</i>
PL270	4818,8867	1866,1456	0,0784
Durl	169,24099	140,26442	0,3016
Gord.	4,3255136	1,6129985	0,0712
Prot.	3,2332489	1,4725853	0,1143
Lact.	7,6469981	3,0564227	0,0848
EST	51,917842	20,204864	0,0794
%Gord.	0,00000044	0,00000242	0,8321
%Prot.	0,00000103	0,00000121	0,4283
%Lact.	0,00000065	0,00000059	0,3340
%EST	0,00000348	0,00000808	0,6512
ECS	0,00165615	0,00128576	0,2783

PL270 = produção de leite até 270 dias, Durl = duração da lactação, ECS = escore de células somáticas, Gord, Prot, Lact, EST, %Gord, %Prot, %Lact e %EST = produção e porcentagem de gordura, proteína, lactose e extrato seco total.



Tabela 2 – Estimativas dos contrastes entre os genótipos (AA, AB e BB) para as características avaliadas.

Características	<b>AA-BB</b>	( <i>p-value</i> )	<b>AA-AB</b>	( <i>p-value</i> )	<b>AB-BB</b>	( <i>p-value</i> )
PL270	-34,18	(0,176)	-21,22	(0,062)	-12,96	(0,634)
Durl	-6,34	(0,360)	-4,00	(0,199)	-2,34	(0,754)
Gord.	-1,24	(0,094)	-0,55	(0,099)	-0,69	(0,387)
Prot.	-1,12	(0,115)	-0,46	(0,153)	-0,66	(0,387)
Lact.	-1,43	(0,162)	-0,82	(0,074)	-0,61	(0,581)
EST	-4,10	(0,119)	-2,00	(0,091)	-2,10	(0,458)
%Gord.	-2,66E-04	(0,769)	2,11E-04	(0,605)	-4,77E-04	(0,626)
%Prot.	-4,96E-04	(0,440)	2,94E-04	(0,309)	-7,89E-04	(0,255)
%Lact.	-5,17E-04	(0,251)	-1,98E-04	(0,327)	-3,19E-04	(0,512)
%EST	-1,32E-03	(0,425)	3,26E-04	(0,662)	-1,65E-03	(0,357)
ECS	-1,46E-02	(0,485)	-1,38E-02	(0,143)	-7,90E-04	(0,972)

\**p-value*<0,05. PL270 = produção de leite até 270 dias, Durl = duração da lactação, ECS = escore de células somáticas, Gord, Prot, Lact, EST, %Gord, %Prot, %Lact e %EST = produção e porcentagem de gordura, proteína, lactose e extrato seco total.

LAN et al. (2009a) estudaram os exons 1-5 e a região 5'UTR do gene *POU1F1* de caprinos, sendo identificados 12 novos SNPs em cabras da raça Inner Mongolian White Cashmere, sendo que entre os polimorfismos encontrados, dois estavam associados ( $P < 0,05$ ) com a produção de pêlos *cashmere*, típicos desta raça. Além disso, os autores observaram que para um dos polimorfismos identificados por SSCP, apenas os genótipos EE e EF foram encontrados, na proporção de 2:1, sendo sugerido que o alelo F poderia ser letal em homozigose recessiva, baseado no fato de que as análises das sequências de aminoácidos do alelo F mostraram uma remoção de 184-291 aminoácidos do *POU1F1* nos animais de genótipo FF, o que resultaria na eliminação parcial do domínio *POU* (*POU-SD*) e do homeodomínio (*POU-HD*) desta proteína, o que poderia fazer com que esta mutação fosse letal, uma vez que estudos anteriores mostraram que estes domínios são essenciais para a alta afinidade de ligação com o DNA e mutações nestas regiões causaram nanismo severo ou morte em humanos (THEILL et al., 1989, 1992). Além disso, nos genótipos FF faltam os exons 5 e 6 e parte do exon 4, semelhante à forma de *splicing* *POU1F1-δ* observada

em ovinos (sem o exons 3-5) por BASTOS et al. (2006), a qual resultou na falta de ativação dos promotores do GH e da prolactina.

Apesar de o polimorfismo encontrado neste estudo não ter apresentado relação com as características produtivas avaliadas, outros polimorfismos no gene *POU1F1* de caprinos têm sido relatados na literatura (LAN et al., 2007c, LAN et al., 2007b; LAN et al., 2009b), de forma que outros estudos podem ser feitos no sentido de verificar se estes polimorfismos são verificados nas principais raças utilizadas nos sistemas de criação do Brasil.

### CONCLUSÃO

Conclui-se que o polimorfismo avaliado neste estudo para o gene *POU1F1* de caprinos não influencia nenhuma das características de produção e qualidade do leite.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS, E., SÍLVIA ÁVILA, A., CRAVADOR, R., RENAVILLE, R., GUEDES-PINTO, H., JOSÉ LUIS, A. Identification and characterization of four splicing variants of ovine *POU1F1* gene. **Gene**, v.382, p.12–19, 2006.

COHEN, L.E., WONDISFORD, F.E., RADOVICK, S. Role of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin. **Metabolism Clinics of North America**, v.25, p.523–540, 1997.

LAN, X.Y., PAN, C.Y., CHEN, H., LEI, C.Z., A *Ddel* PCR–RFLP detecting genetic variation of goat *POU1F1* gene. **Canadian Journal Animal Science**, v.87 (1), p.13–14, 2007a.

LAN, X.Y., PAN, C.Y., CHEN, H., LEI, C.Z., HUA, L.S., YANG, X.B., QIU, G.Y., ZHANG, R.F., LUN, Y.Z., *Ddel* polymorphism in coding region of goat *POU1F1* gene and its association with production traits. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, v.20 (9), p.1342–1348, 2007b.

LAN, X.Y., PAN, C.Y., CHEN, H., ZHANG, C.L., LI, J.Y., ZHAO, M., LEI, C.Z., ZHANG, A.L., ZHANG, L., An *AluI* PCR–RFLP detecting a silent allele at the goat *POU1F1* locus and its association with production traits. **Small Ruminant Research**, v.73, p.8–12, 2007c.

LAN, X.Y., PAN, C.Y., LI, J.Y., GUO, Y.W., HU, S., WANG, J., LIU, Y.B., HU, S.R., LEI, C.Z., CHEN, H. Twelve novel SNPs of the goat POU1F1 gene and their associations with cashmere traits. **Small Ruminant Research**, v.85 p.116–121, 2009a.

LAN, X.Y., SHU, J.H., CHEN, H., PAN, C.Y., LEI, C.Z., WANG, X., LIU, S.Q., ZHANG, Y.B., A *Pst*I polymorphism at 3'UTR of goat POU1F1 gene and its effect on cashmere production. **Molecular Biology Reports**, v.36, p.1371–1374, 2009b.

LI, S., CRENSHAW III, E. B., RAWSON, E. J., SIMMONS, D. M., SWANSON, L. W., ROSENFELD, M. G. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene Pit-1. **Nature**, v.347, p.528–533, 1990.

RENAVILLE, R., GENGLER, N., VRENCH, E., PRANDI, A., MASSART, S., CORRADINI, C., BERTOZZI, C., MORTIAUX, F., BURNY, A., PORTETELLE, D. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.3431–3438, 1997a.

RENAVILLE, R., GENGLER, N., PARMENTIER, I., MORTIAUX, F., MASSART, S., BERTOZZI, C., BURNY, A., PORTETELLE, D., Pit-1 gene *Hinf*I RFLP and growth traits in double-musled Belgian Blue Cattle. **Journal of Animal Science**, v.75 (Suppl. 1), p.146 (Abstract), 1997b.

STANCEKOV, K., VASICEK, D., PESKOVICOV, D., BULL, J., KUBEK, A. Effect of genetic variability of the porcine pituitary-specific transcription factor (PIT-1) on carcass traits in pigs. **Animal Genetics**, v.30, p.313–315, 1999.

SUN, H.S., ANDERSONA, L.L., YU, T.P., KIM, K.S., KLIND, J., TUGGLE, C.K., Neonatal Meishan pigs show POU1F1 genotype effects on plasma GH and PRL concentration. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.223–237, 2002.

THEILL, L.E., CASTRILLO, J.L., WU, D., KARIN, M. Dissection of functional domains of the pituitary-specific transcription factor GHF-1. **Nature**, v.342, p.945–948, 1989.

THEILL, L.E., HATTORI, K., LAZZARO, D., CASTRILLO, J.L., KARIN, M. Differential splicing of the GHF1 primary transcript gives rise to two functionally distinct homeodomain proteins. **The EMBO Journal**, v.11, p.2261–2269, 1992.

YU, T.P., TUGGLE, C.K., SCHMITZ, C.B., ROTHSCHILD, M.F. Association of PIT1 polymorphisms with growth and carcass traits in pigs. **Journal of Animal Science**, v.73, p.1282–1288, 1995.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os diferentes genótipos do gene *CSN1S1* influenciam a maioria das características avaliadas, sendo os animais de genótipo AA uma alternativa para conciliar a seleção para quantidade e qualidade do leite, por estarem relacionados com maiores produções e porcentagens dos constituintes do leite. Além disso, foram observadas evidências de efeitos de sobredominância entre os alelos do genótipo AE para duração da lactação, produções de proteína, lactose e extrato seco total e porcentagem de gordura no leite.

O polimorfismo VNTR identificado no gene *DGAT1* de caprinos têm influência sobre os valores genéticos da duração da lactação, sendo que o alelo com um maior número repetições em tandem apresenta uma associação positiva com esta característica.

Existe uma carência de estudos moleculares relacionados a caprinocultura de leite, de forma que as associações observadas entre estes polimorfismos e as características avaliadas neste trabalho podem auxiliar na seleção dos animais mais produtivos e eficientes.

Os polimorfismos avaliados neste estudo para os genes *GH* e *POU1F1* de caprinos não influenciam nenhuma das características de produção e qualidade do leite, no entanto outros polimorfismos nestes mesmos genes podem ser estudados.