

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Polimorfismo no Gene que Codifica a  $\beta$ -lactoglobulina e Associação  
com Características de Produção em Caprinos Leiteiros**

**Ramon de Sousa Rego**

**2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**Polimorfismo no Gene que Codifica a  $\beta$ -lactoglobulina e Associação  
com Características de Produção em Caprinos Leiteiros**

**RAMON DE SOUSA REGO**

*Sob a orientação do professor*

**Marcelo Jangarelli**

*Co-orientação da professora*

**Ana Lúcia Puerro de Melo**

Dissertação submetida  
como requisito para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências** no  
Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia, Área de Concentração em  
Produção Animal.

**Seropédica-RJ,  
Agosto, 2014**

658.4012

L732p

T

Rego, Ramon de Sousa. 1989-

Polimorfismo no Gene que Codifica a  $\beta$ -  
lactoglobulina e associação com  
características de produção em caprinos  
leiteiros / Ramon de Sousa Rego - 2016.  
48 f. : il.

Orientador: Marcelo Jangarelli.

Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de  
Pós-Graduação em Zootecnia.

Bibliografia: f. 38-45

1. Capra hircus - Teses. 2. PCR-RFLP -  
Teses. 3. Proteína do soro do leite -  
Teses. I. Jangarelli, Marcelo. 1979-. II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em  
Zootecnia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**RAMON DE SOUSA REGO**

Dissertação submetida como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM:**

---

Marcelo Jangarelli Dr. UFRRJ  
(Orientador)

---

Maria Amélia Menck Soares Dra. UFRRJ

---

Eliane Gasparino Dra UEM

## DEDICATÓRIA

*A Deus.*

*Aos meus pais.*

*Aos meus irmãos e amigos.*

*A meus orientadores.*

*A minha namorada Fernanda Ragazzi.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por tornar tudo possível. Pela vida e por estar nos milagres diários.

A minha querida e amada mãe, Niete Maria de Sousa, que me tem oferecido seus incessantes cuidados durante todos os anos de minha existência. Sei que nunca chegarei aos seus anseios secretos por mim, mas estou tentando!

Ao meu pai, Ubaldo Antônio, pelo apoio e dedicação e por todo amor.

Ao meu irmão, Renan de S. Rego, pelos momentos felizes, pelo amor, e por me ensinar muito e me fazer sempre melhor.

A todos os meus familiares, pelo apoio e amor.

A minha maravilhosa companheira, Fernanda Ragazzi, a quem devo boa parte dos ensinamentos e sabedoria adquirida durante todos esses anos, e a toda paciência, amizade, amor e companheirismo.

A todos os meus irmãos de coração, Rodrigo, Leandro, Vitor Pedroso, Joneci, Guti, Mauro, Wagner e a do capítulo Grande Rio. Obrigado pelos incentivos e conversas, pelos conselhos e pela presença em momentos difíceis, obrigado pela amizade verdadeira.

Aos amigos que colaboraram diretamente com a realização desse projeto e na minha formação, Adriana, Amanda, Érica, Ingrid, Odair, Leonardo, Victor, e Francisco, respeito e admiro.

Aos meus orientadores pela maestria no ensino e por todo o ensinamento científico e pelas conversas motivacionais e pela amizade, Ana Lúcia e Marcelo Jangarelli.

A Professora Maria Amélia pela dedicação no ensino, por todo o carinho e respeito que tenho por seu trabalho, por todas as conversas e momentos dedicados. Agradeço pela oportunidade de trabalhar no grupo tão seletivo de pesquisa e discussão e por fazer do departamento de Genética um ótimo lugar para se trabalhar e viver.

A todos os amigos que estão sempre presentes em minha vida. Por fazerem daqui um lugar mais agradável e ótimo de se viver. Aos amigos feitos durante todos esses anos morando em Seropédica e convivendo diariamente com cada um. O que nos fez compartilhar de momentos incríveis e inesquecíveis. Aos de longos anos e aos mais recentes. Obrigado por estarem em minha vida!

Ao apoio de todos os professores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Instituto de Zootecnia, e ao Instituto de Biologia pela estrutura e ensinamentos.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro pelo financiamento deste projeto, bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos que possibilitou a realização deste projeto.

## RESUMO

REGO, Ramon de Sousa. **Polimorfismo no Gene que Codifica a  $\beta$ -lactoglobulina e Associação com Características de Produção em Caprinos Leiteiros**. 56p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A qualidade proteica do leite de cabras e a digestibilidade da fração lipídica são importantes fatores que o destacam, quando comparado ao leite de vacas. A  $\beta$ -Lactoglobulina é a proteína de maior abundância no soro do leite em ruminantes sendo produzida na glândula mamária durante o período de lactação. Ela pode representar até 12% do total proteico. Buscamos com o presente trabalho, avaliar o gene da  $\beta$ -Lactoglobulina (*BLG*) com seus polimorfismos genéticos nas regiões promotoras 5' e 3' UTR e associá-los as características de produção de leite no rebanho caprino experimental. Para isso foram utilizadas 150 cabras (*Capra hircus*) das raças Saanen e Alpinas, genotipadas para os polimorfismos do gene *BLG*. Para a genotipagem foram coletados 10 mL de sangue por animal. O sangue foi utilizado para a extração de DNA e amplificação de 2 fragmentos do gene *BLG* por intermédio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os fragmentos amplificados foram então submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida e avaliados pelo polimorfismo no tamanho do fragmento por restrição (PCR-RFLP). Foram utilizadas as enzimas *SmaI* e *SacII*, para a região promotora (região promotora + éxon 1) e para a região do éxon 7 (éxon 7 + região 3'), respectivamente. As diferenças nos padrões de corte foram visualizadas em gel de poliacrilamida. Na região promotora o polimorfismo de base única (SNP) na posição -60 (C/T) foi identificado e apresentou associação com a percentagem de proteínas no leite. Esse resultado sugere uma relação entre os genótipos da região promotora do gene *BLG* e o nível proteico do leite. Foi observado na região do éxon 7 a presença de dois polimorfismos +4641 (I<sub>2</sub>/I<sub>3</sub>) e +4601 (A/G). A variação I<sub>2</sub>-I<sub>3</sub> é caracterizada pela repetição de uma sequência de 10 pb, variando em duas e três vezes, e sendo possível identifica-la por eletroforese. A variação I<sub>3</sub> teve frequência muito baixa, e não houve associação entre esse polimorfismo e nenhuma característica de produção. O polimorfismo +4601 (A/G) foi identificado por meio da digestão da enzima *SacII*. Os alelos identificados tiveram frequências próximas às relatadas por outros autores e apresentaram associação com a percentagem de gordura no leite cabras, sendo que os animais com o genótipo S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> apresentaram maior percentagem de gordura que animais S<sub>1</sub>S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>S<sub>2</sub>. A maior produção de conteúdo lipídico pode estar relacionada com a característica de transporte de ácidos graxos da  $\beta$ -Lactoglobulina.

Palavras chaves: *Capra hircus*. PCR-RFLP. Proteína do soro leite.



## ABSTRACT

REGO, Ramon de Sousa. **Polymorphism in the gene encoding the  $\beta$ -lactoglobulin and Association with Traditional Production in Dairy Goats.** 56p. Dissertation (Master in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The protein quality of milk of goats and digestibility of the lipid fraction are important factors that stand out when compared to milk from cows. The  $\beta$ -lactoglobulin is the higher abundant protein in whey ruminants being produced in the mammary gland during lactation. It may represent up to 12% of the total protein. We seek to present work was to evaluate the gene  $\beta$ -Lactoglobulin (BLG) with their genetic polymorphisms in the promoter regions 5' and 3' UTR and associate them the characteristics of milk production in experimental goat herd. For this 150 goats (*Capra hircus*) of Saanen and Alpine, genotyped for polymorphisms of the BLG gene were used. For genotyping 10 mL of blood per animal were collected. The blood was used for DNA extraction and amplification of two fragments of the BLG gene by means of polymerase chain reaction (PCR). The amplified fragments were submitted to electrophoresis on polyacrylamide gel and evaluated by by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The *Sma*I and *Sac*II enzymes were used for the promoter (promoter + exon 1 region) region and the region of exon 7 (exon 7 + region 3'), respectively. The differences in cutting patterns were visualized on a polyacrylamide gel. In the promoter region of the single nucleotide polymorphism (SNP) at position -60 (C/T) was identified and was associated with the percentage of protein in milk. This result suggests a relationship between genotypes of the promoter region of the *BLG* gene and the protein level of the milk. The presence of two polymorphisms +4641 (I<sub>2</sub>/I<sub>3</sub>) and +4601 (A/G) was observed in the region of exon 7. The I<sub>2</sub>-I<sub>3</sub> variation is characterized by a repeat sequence of 10 bp, varying in two and three times, and it being possible to identify by electrophoresis. The I<sub>3</sub> variation was often very low, and there was no association between this polymorphism and any production trait. Polymorphism +4601 (G/A) was identified by enzyme *Sac*II digestion. Alleles were identified frequencies close to those reported by other authors and were associated with the percentage of fat in milk goats, and the animals with the S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> genotype had higher fat percentage than S<sub>1</sub>S<sub>1</sub> animals and S<sub>2</sub>S<sub>2</sub>. The increased production of lipid content may be related to the characteristic of transporting fatty acids  $\beta$ -lactoglobulin.

Key words: Milk whey protein. PCR-RFLP. *Capra hircus*.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	14
Tabela 2.....	15
Tabela 3.....	17
Tabela 4.....	21
Tabela 5.....	22
Tabela 6.....	24
Tabela 7.....	27
Tabela 8.....	28
Tabela 9.....	28
Tabela 10.....	28

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	15
Figura 2.....	19
Figura 3.....	19
Figura 4 .....	20
Figura 5.....	24
Figura 6.....	25
Figura 7.....	26
Figura 8.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AGCM- Ácidos graxos de cadeia média

AP-2 - *activator protein-2*

BLG - Gene que codifica a  $\beta$ -Lactoglobulina

BLG Pro - Fragmento de DNA que contém a região promotora 5' + éxon 1 do gene *BLG*.

BLG-7 - Fragmento de DNA que contém o éxon 7 + a região promotora 3' do gene *BLG*.

cDNA - DNA complementar

CSN3 - gene que codifica a  $\kappa$ -caseína

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

LDL - *Low Density Lipoproteins*

PCR- *Polimerase Chair Reaction*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SNP- *Single Nucleotide Polymorphisms*

SSR- *Simple Sequence Repeat*

STAT - *sinal transduction- activaded transcription*

STAT5-*sinal transduction- activaded transcription 5*

TCM- Triglicerídeos de Cadeia Média

UTR- *Untranslated Region*

VNTR- *Variable Number Tandem Repeats*

$\alpha$ -La- Proteína  $\alpha$ -lactalbumina

$\alpha$ 1-Cn - Proteína  $\alpha$ 1 caseína

$\beta$ -Cn- Proteína  $\beta$ -caseína

$\beta$ -Lg – Proteína  $\beta$ -Lactoglobulina

$\kappa$ -Cn –  $\kappa$ - Caseína

## Sumário

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTA DE TABELAS .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	13
2.1 Leite Caprino .....	13
2.1.1 Perfil proteico .....	14
2.2 Marcadores Genéticos .....	14
2.2.1 Polimorfismo de base única (SNP) .....	15
2.2.2 Número variável de repetições em tandem (VNTR) .....	16
2.2.3 Reação em cadeia da polimerase - polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP) .....	16
2.3 $\beta$ -Lactoglobulina .....	17
2.3.1 Estrutura .....	17
2.3.2 Funções fisiológicas .....	17
2.3.3 Interações .....	18
2.3.4 Gene .....	19
2.3.5 Regulação gênica .....	19
2.3.6 Polimorfismo .....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.1 Material Biológico e Coleta de Dados: .....	21
3.2 Extração de DNA .....	21
3.3 Escolha de <i>Primers</i> .....	21
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese .....	22
3.5 PCR-RFLP .....	22
3.6 Dados de Produção de Leite .....	23
3.7 Análises Estatísticas .....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
4.1 Amplificação dos Fragmentos .....	25
4.2 Região BLG-Pro .....	26

4.3 Região BLG-7 .....	29
5. CONCLUSÃO.....	37
6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	38

# 1 INTRODUÇÃO

O leite é um importante alimento para neonatos, e possui uma cadeia produtiva em ascensão, tanto para o leite bovino quanto para o leite caprino. A produção de leite caprino tem se destacado no agronegócio brasileiro de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2006). O número estimado do rebanho é superior a sete milhões de animais, distribuídos em cerca de 290 mil estabelecimentos agropecuários com produção de leite de mais de 35 milhões de litros por ano, gerando cerca de R\$ 45 milhões para o crescimento do PIB.

O leite de cabra é um alimento de alto valor nutritivo e possui distinções quando comparado ao leite bovino. Podemos citar, por exemplo, a alta qualidade proteica, menor alergenicidade, maior digestibilidade da fração lipídica e a presença de fatores terapêuticos. Por estes motivos, o leite de cabra é considerado um alimento nutracêutico, sendo recomendado para idosos, recém-nascidos e pessoas alérgicas (HAENLEIN, 2004).

A  $\beta$ -Lactoglobulina é uma proteína de grande importância para a produção de leite por ser a proteína de maior abundância no soro do leite de ruminantes. Inicialmente a  $\beta$ -Lactoglobulina, por não estar presente no leite humano, foi considerada uma das proteínas com maior potencial alergênico. Porém, atualmente são conhecidas algumas de suas funções, que são benéficas quando presente na alimentação humana. Vários estudos (PEREZ & CALVO, 1995; FLOWER, 1996) apontam diversos papéis ímpares em ciclos fisiológicos para essa proteína, tornando-a uma importante fonte de estudo.

A identificação de polimorfismos nos genes que codificam as proteínas presentes no leite é importante na compreensão dos processos produtivo e fisiológico. Um grande número de variações para as principais proteínas do leite é conhecido ( $\alpha$ -s1,  $\alpha$ -s2,  $\beta$ ,  $\kappa$  - Caseínas,  $\beta$ -Lactoglobulina e  $\alpha$ -Lactoalbumina) em diferentes populações e raças de caprinos. Logo, há o interesse no uso desses genes como marcadores para o melhoramento genético na produção de leite, tendo em vista a composição, o volume de leite, a saúde humana e o rendimento de produtos lácteos.

A utilização do gene que codifica a  $\beta$ -Lactoglobulina como marcador genético em pesquisas de melhoramento genético em caprinos é recente. A associação com a produção de leite em caprinos, percentagem de proteínas, gordura e extrato seco total ainda é muito pouco conhecido. Na literatura, por exemplo, associações de polimorfismos do gene *BLG* com a duração da lactação e contagem de células somáticas não foram encontradas.

Com o presente estudo avaliou-se o gene da  $\beta$ -Lactoglobulina como marcador para características produtivas de caprinos utilizando polimorfismos genéticos do gene *BLG* nas regiões promotoras 5' e UTR 3'. Para isso os genótipos foram associados aos valores genéticos estimados para as características de produção de leite, duração da lactação, contagem de células somáticas, percentagem de proteínas, gordura e extrato seco total do leite.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leite Caprino

Como principal alimento de mamíferos neonatos, o leite é uma substância produzida e secretada pelas glândulas mamárias, que fornece os nutrientes necessários a seu crescimento e desenvolvimento. Esse fluido biológico possui diversos constituintes importantes para o metabolismo como, por exemplo: aminoácidos que estimulam a síntese muscular; algumas proteínas e peptídeos com efeitos benéficos sobre a pressão sanguínea; inflamação e desenvolvimento tecidual; vitaminas, minerais e ácidos graxos. Além disso, existem indicativos de que o leite fermentado estimula o sistema imune contra o câncer, vírus e alergias (HAUG et al., 2007).

Para o conhecimento das propriedades nutracêuticas características do leite de cabras, foram realizados inúmeros ensaios para verificar as relações entre a ingestão deste alimento e a saúde humana.

Em um estudo de nutrição humana, o leite de cabra foi utilizado como substituto do leite de vaca em 38 crianças durante um período de cinco meses. As crianças alimentadas com o leite de cabra superaram as alimentadas com leite de vaca no ganho de peso, altura, mineralização do esqueleto e conteúdo séricos de vitamina A, cálcio, tiamina, riboflavina, niacina e hemoglobina (MACK, 1952).

No estudo de Sabbahet et al. (1997) foi avaliada a mesma substituição do leite durante duas décadas e concluíram que a utilização do leite de cabras sempre é seguida de melhoras. Em outros estudos clínicos com crianças alérgicas ao leite de vaca, o tratamento com leite de cabra produziu resultados positivos em 93% das crianças e foi recomendado como uma valiosa ajuda na nutrição infantil por causa da menor alergenicidade e melhor digestibilidade do que o leite de vaca (REINERT & FABRE, 1997).

Um fator que torna o leite de cabra mais digestível em relação ao leite bovino é o tamanho dos glóbulos de gordura que tem tamanho diferenciado entre essas duas espécies. Em geral, o diâmetro destes glóbulos para ambos os tipos de leite é de 1 a 10 micros, entretanto, 28% dos glóbulos de gordura do leite de cabra e 10% dos de leite de vaca apresentam diâmetro igual ou inferior a 1,5 microns. Esta variação pode justificar a maior digestibilidade atribuída ao leite de cabra e torna-lo recomendável para a alimentação de pessoas idosas, com problemas gástricos ou de crianças (FURTADO, 1985).

Também é conhecido que o consumo de leite de cabra pode reduzir os níveis de colesterol total e da fração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL – *Low Density Lipoproteins*), devido à maior presença de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) (36% em leite de cabra e 21% no leite de vaca), diminuindo a síntese de colesterol endógeno. (BARRIONUEVO et al., 2002).

Teores médios de gordura do leite de cabra diferem significativamente em ácidos graxos em relação ao leite de vaca, sendo mais elevado os ácidos butírico (C4:0), capríco (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), linoleico (C18:2), e menores no ácido esteárico (C18:0) e ácido oleico (C18:1). Três triglicerídeos de cadeia média (TCM) (C6-C14) foram efetivamente nomeados após o estudo do leite de cabras, devido à sua predominância no mesmo (JENNESS, 1980).

Os ácidos graxos cáprico, caprílico e os AGCM se estabeleceram em tratamentos médicos para uma série de distúrbios clínicos, incluindo síndromes de má absorção, hiperlipoproteinemia, ressecção intestinal, alimentação de prematuros, desnutrição infantil,



epilepsia e fibrose cística devido à sua capacidade de fornecer energia direta metabólica única em vez de ser depositada no tecido adiposo. Também por causa de suas ações de redução do colesterol sérico, inibindo e limitando a deposição de colesterol (SCHWABE et al., 1964)

Num estudo sobre o comportamento da resposta imune em crianças com intolerância ao leite de vacas, Albenzio et al. (2012) concluíram que a substituição pelo leite de cabras na alimentação é viável pela diferença no perfil proteico do leite. Assim, a alta qualidade proteica, pela menor alergenicidade, e maior digestibilidade da fração lipídica, quando comparado ao leite de vacas, justificam o interesse crescente no estudo dos fatores associados à composição do leite de cabras, inclusive sobre a contribuição dos componentes genéticos.

### 2.1.1 Perfil proteico

Le Jaouen (1981) e Swaisgood (1996) dividem as principais proteínas do leite em três grupos. 1) Caseínas, que é a parte coagulável das proteínas e é representada em ordem decrescente pela  $\alpha_s$ -caseína ( $\alpha_{s1}$  e  $\alpha_{s2}$ ),  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -Cn),  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -Cn) e  $\gamma$ -caseína. 2) Proteínas solúveis não coaguláveis representadas pela  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina. 3) Proteases, peptonas, albumina sérica e imunoglobulinas, as quais ocorrem em baixas concentrações.

O leite caprino é similar quanto à classificação das principais proteínas do leite bovino, porém difere em concentrações, e nas variações genéticas e suas frequências (MARTIN, 1993). As proteínas presentes no leite caprino e bovino se apresentam em diferentes concentrações mesmo quando produzidos em iguais condições para as duas espécies, principalmente quando comparados às caseínas, que apresentam menor concentração em relação ao leite bovino (CEBALLOS, 2009). Esse fato é uma das razões que explica a maior digestibilidade do leite caprino. E os aminoácidos da sua constituição são eficientemente melhores absorvidos do que os de leite de vaca (BOULANGER et al., 1984).

As micelas de caseína também diferem acentuadamente quando comparado os dois tipos de leite. A micela no leite caprino possui menor taxa de sedimentação, melhor solubilização de  $\beta$ -Cn, menor tamanho da micela, maior quantidade de cálcio e fósforo e baixa estabilidade térmica quando comparado ao leite bovino (JENNESS, 1980).

A  $\beta$ -Lg não está presente no leite humano e por isso inicialmente foi acusada de ser a proteína mais alergênica no leite bovino. Porém estudos comparativos não mostraram diferença entre a alergenicidade da  $\beta$ -Lg e caseínas (BUERGIN-WOLFF et al. 1980, TAYLOR 1986).

A grande quantidade de polimorfismo para a  $\alpha_{s1}$ -Caseína ( $\alpha_{s1}$ -Cn) tem sido muito estudada pela existência de diferenças quanto às proporções entre caseínas provenientes dos diferentes genótipos para esta proteína. Essas variações podem resultar em diferentes digestibilidade e propriedades favoráveis à produção de leite (REMEUF, 1993).

Além das distinções do perfil proteico, a composição de aminoácidos também apresenta proporções significativamente distintas no leite de cabras. Os níveis de Leucina, Lisina, Fenilalanina e Valina se apresentam superiores e os níveis de Metionina, Tirosina, Arginina, Asparagina, Glicina e Serina se apresentaram inferiores ao leite bovino (CEBALLOS et al., 2009).

### 2.2 Marcadores Genéticos

Marcadores genéticos são definidos como um gene ou qualquer sequência conhecida de DNA, que podem ser utilizados para identificar indivíduos ou semelhantes (FERREIRA &

GRATTAPAGLIA, 1998). Características morfológicas, fisiológicas ou moleculares podem ser usadas como marcadores genéticos.

Durante as últimas décadas o melhoramento genético tem buscado um modelo diferente do que foi apresentado durante toda a história. Com o desenvolvimento da sociedade e a necessidade de produção de alimentos cada vez maior, houve a necessidade de buscar novas estratégias para a seleção dos animais reprodutores e proporcionar maiores ganhos genéticos em um menor espaço de tempo.

A partir do desenvolvimento de biotécnicas, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (MULLIS & FALOONA, 1987), a utilização de endonucleases de restrição (ARBER & LINN, 1970) e o sequenciamento de DNA (SANGER et al., 1977), tornou-se possível a realização de análises de sequências de DNA. As quais vêm sendo largamente empregadas nas pesquisas e descobertas de marcadores genéticos, que aprofundam o conhecimento de características quantitativas no melhoramento genético animal.

Em programas de melhoramento genético, os marcadores podem ser usados não só para seleção de indivíduos com características de interesse, mas também para caracterização da variabilidade genética, em testes de paternidade, na análise do comportamento de genes em populações e na reconstrução da história evolutiva de populações (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A utilização de marcadores presentes no DNA é comum em pesquisas no melhoramento animal e vegetal. Os marcadores em DNA são caracterizados pela detecção de variações naturais nas sequências de DNA. Existe uma grande diversidade de marcadores em DNA e a sua utilização depende de uma série de fatores, entre eles a disponibilidade de recursos, conhecimento da região e estrutura do laboratório.

Entre os marcadores moleculares mais utilizados, que se baseiam na análise do DNA genômico, estão os Polimorfismos de Base única (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNP), o polimorfismo no tamanho do fragmento por restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP), os minissatélites ou número variável de repetições em tandem (*Variable Number Tandem Repeats* - VNTR), o polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - AFLP) e os microsatélites (*Simple Sequence Repeat* - SSR) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

### **2.2.1 Polimorfismo de base única (SNP)**

As principais formas de variações genéticas nos organismos são derivadas de mutações e recombinações. As mutações podem ser originadas espontaneamente ou induzidas pelo meio. Mutações espontâneas surgem de uma variedade de fontes. Uma fonte é um erro na maquinaria de replicação do DNA. (GRIFFITHIS et al., 2008 ).

O SNP é uma pequena mutação ou variação genética que ocorre na sequência de DNA, um único nucleotídeo substituindo um dos outros três nucleotídeos (GRIFFITHIS et al., 2008; BROOKES, 1999). A princípio, poderia envolver até quatro variações de nucleotídeos diferentes em um determinado local, porém é mais raro esse tipo de variação (BROOKES, 1999). O SNP pode ser resultante de uma transição ou transversão. Nas transições ocorre uma troca de bases nitrogenadas de mesmas características químicas, entre purinas (A/G) ou entre pirimidinas (T/C), nas transversões ocorre troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa. As transições são mais comuns. As mutações podem ocorrer na região codificante do gene, proporcionando ou não alterações nos códons de leitura, e possíveis modificações na estrutura da proteína codificada. Em regiões transcritas e não traduzidas (*Untranslated Region* - UTR) ou reguladoras, os SNPs podem modificar sítios de ligações da RNA polimerase, de fatores associados ao início de transcrição ou proteínas

específicas reguladoras da expressão gênica. A modificação de uma região de reconhecimento de um fator qualquer pode acarretar em uma modificação da expressão do gene em questão, ou alterar a resposta a estímulos ambientais (GRIFFITHS et al., 2008).

Com a alta frequência de SNPs no genoma, essa mutação é uma fonte valiosa de variabilidade que pode ser utilizada para saturação de mapas genéticos, mapeamento de características e estudos de associação com fenótipos de interesse (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; BROOKES, 1999).

### **2.2.2 Número variável de repetições em tandem (VNTR)**

As sequências VNTR ou minissatélites variam de 6 a 100 pares de base em comprimento e são encontradas em conjuntos contendo até 3.000 repetições. Os números de variações dessas sequências tendem a ser instáveis e podem variar entre gerações. Cada VNTR se constitui em um loco de minissatélite, cujos alelos se diferenciam por variações no número de repetições, logo o comprimento de um locus de VNTR é altamente variável numa população (JEFFREYS et al., 1985)

Essa alta variação em VNTR é utilizada como marcador genético para identificação de indivíduos e testes de paternidade por meio da técnica de identificação individual pelo DNA (DNA *fingerprinting*). Modificações na sequência de minissatélites podem alterar a transcrição gênica por modificações na matriz de leitura do promotor. A detecção de um VNTR é facilmente feita pela simples diferença de comprimento do fragmento, AFLP, em pares de bases nitrogenadas em gel de eletroforese.

### **2.2.3 Reação em cadeia da polimerase - polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP)**

Desenvolvida por Mullis & Faloona (1987), a PCR é uma reação enzimática catalisada por uma DNA Polimerase que permite a amplificação e reprodução (*in vitro*) de grandes quantidades de uma região específica de DNA, a partir de uma pequena quantidade de DNA molde. Para a reação é necessário a síntese de um par de oligonucleotídeos chamados de *primers*, no qual a sequência é complementar as regiões 5' e 3' de interesse para a amplificação.

O PCR-RFLP é o método de genotipagem mais comumente utilizado, no qual são utilizadas endonucleases de restrição precisas para o sítio da troca de bases. A enzima de restrição é adicionada ao produto do PCR para a digestão, gerando assim diferentes padrões de tamanhos para cada variante da mutação.

As variações detectadas pela técnica RFLP decorrem de mutações simples, rearranjos dos segmentos de DNA, por efeito de deleções, inserções ou translocações e recombinação. Essas modificações podem ocasionalmente alterar a sequência ou substituir bases nitrogenadas em um ou mais sítios de reconhecimento de uma determinada enzima (CAIXETA et al., 2009). As enzimas de restrição clivam o DNA em locais específicos, denominados sítios de restrição, ao longo da molécula de DNA e geram polimorfismos em tamanho dos fragmentos cortados (SCOTT et al., 2000).

Quando é existente a diferença genética entre indivíduos, esta técnica explora a possibilidade dessa modificação se encontrar no interior da sequência de reconhecimento de uma enzima de restrição. Desta forma, a comparação dos perfis resultantes, em gel de eletroforese, pode detectar pequenos polimorfismos que diferenciem os DNAs e evidencie os alelos.

## 2.3 $\beta$ -Lactoglobulina

### 2.3.1 Estrutura

A  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) é a proteína de maior abundância no soro do leite em ruminantes e é produzida na glândula mamária durante o período de lactação. De acordo com Fox e Mc Sweeney (1998), cerca de 20% da proteína total do leite bovino pertence a um grupo de proteínas genericamente chamado de soro, proteínas do soro ou nitrogênio não-caseínico. A  $\beta$ -Lg é a proteína em maior abundância no soro do leite de ruminantes, podendo representar cerca de 50% da proteína do soro e 12% do total proteico do leite de bovinos.

A  $\beta$ -Lg também é encontrada no leite de outros mamíferos, porém, ausente do leite de roedores, lagomorfos, e seres humanos (HAMBLING et al., 1992). Ela é uma proteína globular, pertencente à família lipocáína, pequenas proteínas caracterizadas por várias propriedades, tais como a capacidade de se ligar a pequenas moléculas hidrofóbicas (FLOWER, 1996).

A estrutura da  $\beta$ -Lg é composta por uma sequência de 162 de aminoácidos com peso molecular de 18,4 kDa (KONTOPIDIS et al., 2004). Foi relatada inicialmente por Aschaffenburg & Drewry (1955), quando fizeram a primeira menção a um polimorfismo proteico. Este trabalho incentivou a investigação dessa diferença entre as proteínas e sua relação com as características de composição do leite e os fatores genéticos que têm influência sobre a produção dessa proteína.

As diferenças entre a estrutura primária das proteínas podem resultar em alterações das propriedades físico-químicas do leite (HILL et al., 1996). É conhecido um grande número de polimorfismos tem sido encontrado para  $\beta$ -Lg bovina, ovina e caprina. O maior número de variações foram encontrados em bovinos (12), seguidos pelos ovinos (3) e apenas 2 variações foram relatadas em caprinos (MOIOLI et al., 1998; FORMAGGIONI et al., 1999).

A comparação das sequências de aminoácidos da  $\beta$ -Lg de bovinos, ovinos e caprinos mostra que as proteínas são altamente homólogas, apresentando sequência com mais de 95% de similaridade. A sequência primária da  $\beta$ -Lg caprina foi caracterizada por Preaux et al. (1979).

Em cabras os primeiros relatos de polimorfismos na proteína  $\beta$ -Lg foram feitos por pesquisadores russos (STUPNISKII AND IL'CHENKO, 1967; MACHA, 1970). Porém, ainda são desconhecidos os fatores genéticos que influenciam nas diferenças da estrutura da proteína.

Com o início do estudo de marcadores moleculares, e a melhoria nas análises de sequências gênicas foi possível o estudo da estrutura gênica da  $\beta$ -Lg. Folch (1996) sequenciou o gene *BLG* (que codifica a proteína  $\beta$ -Lg) e não encontrou nenhuma variação que justificava o polimorfismo na proteína. Porém outras variações foram encontradas e algumas foram associadas à produção e composição de leite de cabra por todo o mundo ( FOLCH et al., 1996; PENA et al., 2000; YAHIAOUIU et al., 2000; VERES et al., 2004; BALLESTER et al., 2005; KUMAR et al., 2006; SZTANKOOVA et al., 2007; EL-HANAFY et al., 2010; BALTRÉNAITÉ et al., 2013).

### 2.3.2 Funções fisiológicas

A  $\beta$ -Lg é classificada como uma proteína pertencente à família das Lipocáínas, que se caracterizam por serem moléculas de pequeno peso molecular e apresentarem grande afinidade por diferentes moléculas hidrofóbicas. Também possuem a capacidade de se ligar aos receptores específicos das superfícies celulares e formar macromoléculas complexas. Elas

participam ativamente em diferentes vias, entre elas o transporte de retinol, o transporte de ferromônio, na síntese enzimática de prostaglandinas, participação na regulação da resposta imune entre outras (GODOVAC- ZIMMERMANN et al., 1988; FLOWER, 1996).

A  $\beta$ -Lg tem sua função fisiológica direcionada ao transporte de moléculas hidrofóbicas, sendo ela capaz de ligar às moléculas hidrofóbicas e anfifílicas (PEREZ & CALVO, 1995). A afinidade da  $\beta$ -Lg com o retinol (vitamina A) aponta para o transporte dessa molécula para ser absorvida no intestino (CHO et al., 1994).

Também é proposto um papel de ativação de lipases, atuando assim no início da digestão de gorduras do leite, e na aquisição de imunidade pelo colostro (PEREZ et al., 1992; ALSTON-MILLS AND THOMPSON, 1993). Mesmo com todos os estudos realizados o papel fisiológico da  $\beta$ -Lg não está totalmente explicado e definido (FARRELL JR. et al., 2004).

Kontopidis et al. (2002) acreditam que o papel biológico principal da  $\beta$ -Lg está relacionado com a fisiologia materna, porém esse papel pode ter mudado para uma função mais nutricional em algumas espécies. É de salientar que embora  $\beta$ -Lg é a proteína mais abundante na fração de proteína de soro de leite em ruminantes, ela não é encontrada no leite de todos os mamíferos, como o de humanos e de roedores (HAMBLING et al., 1992).

### 2.3.3 Interações

A expressão do gene polimórfico *BLG* está relacionada às alterações das características físico-químicas da micela de caseína, e conseqüentemente, às propriedades tecnológicas do leite, já que tal proteína está positivamente associada à estabilização da micela (ROBITAILLE et al., 1995).

Bobe et al. (1999a) concluíram que as concentrações das proteínas no leite de vacas são afetadas significativamente pelos diferentes genótipos para a  $\beta$ -Lg e  $\kappa$ -Caseína ( $\kappa$ -Cn). O alelo B para a  $\kappa$ -CN proporciona aumento na proporção de  $\kappa$ -CN e diminuição de  $\alpha$ s1-CN e  $\beta$ -Lg ( $P < 0,01$ ). Enquanto o alelo A para a  $\beta$ -Lg proporciona maior concentração de  $\beta$ -Lg e diminuição  $\alpha$ s1-CN e  $\beta$ -CN na concentração total de proteínas do leite ( $P < 0,01$ ). Não foi encontrado efeito significativo sobre a concentração total de proteínas no leite.

Existe a hipótese de que os polimorfismos existentes na região promotora dos genes *BLG* e do gene que codifica a  $\kappa$ -Cn (*CSN3*) podem estar influenciando a transcrição dessas proteínas em diferentes concentrações, resultando em diferentes produções dessas proteínas no leite (BOBE et al., 1999a).

Robitaille (2002) concluiu que há associação entre o polimorfismo para *BLG* e as características do leite de vacas. O genótipo *BLG* AA foi associado significativamente a maior concentração de  $\beta$ -Lg e maior proporção entre  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La) ( $P < 0,001$ ). Também foi observada a diminuição da concentração de  $\alpha$ -La ( $P < 0,01$ ) e de albumina sérica bovina ( $P < 0,05$ ). Os genótipos para *BLG*, não tiveram efeitos significativos na concentração das caseínas, porém foi observada uma tendência a maior concentração de caseínas no genótipo *BLG* BB.

De acordo com Hill et al. (1996) a diferença na estrutura primária da proteína resultante do polimorfismo no gene, também pode influenciar as características físico-químicas do leite bovino, pelas diferenças de hidrofília ou hidrofobidade dos aminoácidos trocados. Porém, quando comparado o efeito do genótipo para *BLG* com as características físico-químicas do leite em bovinos, Botaro et al. (2007) concluíram que não existe influência entre as duas variáveis.

Outras evidências apontam a influência do genótipo na composição lipídica do leite de vacas. Onde genótipos *BLG* BB apresentaram maior concentração de ácido láurico (C12:0)

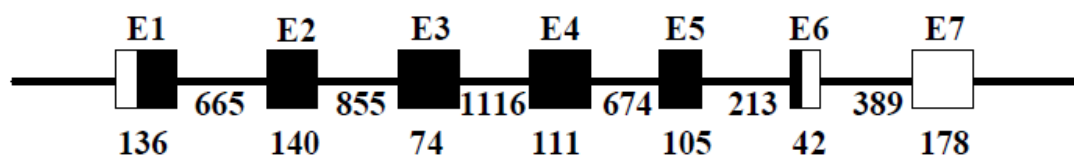
( $P < 0,05$ ). As concentrações de ácido esteárico (C18: 0) e ácido oleico (C18: 1), foram superiores nos animais *BLG* AB ( $P < 0,05$ ) (MELINA et al., 2009). Esses dados demonstram a diversidade de influência entre os polimorfismos no *BLG* e os outros componentes presentes no leite, como gorduras e outras proteínas.

Em caprinos, os estudos com associações entre o gene *BLG* com outros componentes no leite ainda não é bem conhecido.

### 2.3.4 Gene

O DNA complementar (cDNA) para  $\beta$ -Lg foi sequenciado em ruminantes : bovinos (ALEXANDER et al., 1989) , ovinos (GAYE et al., 1986) e caprinos (FOLCH et al., 1993). Foi relatado uma sequência de 486 pb que codifica para 162 aminoácidos, altamente conservada nas três espécies .

A unidade de transcrição se estende por 4,7 Kb dispostas em sete éxons pequenos (42-178 pb) e seis íntrons que variam de 213 pb a 1116 pb. O primeiro éxon contém uma região UTR, não traduzida, e a sequência que codifica para o peptídeo sinal e os primeiros catorze aminoácidos. A região não traduzida 3' UTR está incluída no éxons 6 e 7 (figura 1). O gene *BLG* está localizada numa região rica em GC do genoma, apresentando um teor de GC de 60,4% (FOLCH et al., 1996). Foram descritos pseudogenes nas espécies bovina (PASSEY & MACKINLAY, 1995) e caprina (FOLCH et al., 1996). A principal alteração no pseudogene caprino, para o não processamento, é uma inserção de 29 pb no éxon dois gerando um códon de parada a jusante do mesmo éxon. No leite de gato e de equídeos existem outras formas relacionadas da proteína  $\beta$ -Lg ( $\beta$ -Lg I,  $\beta$ -Lg II,  $\beta$ -Lg III), provavelmente produzidas por genes diferentes (GODOVAC-ZIMMERMAN et al, 1990;PENA et al, 1999).



**Figura 1.** Estrutura de organização do gene codificante da  $\beta$ -LG caprina. Éxons são demonstrados pelas caixas em branco (regiões 5' e 3' não codificantes), na linha (sequência não transcrita e regiões sinalizantes), caixas em preto (sequência codificante da proteína) (FOLCH et al., 1996)

### 2.3.5 Regulação gênica

A expressão do gene *BLG* é restrita a glândula mamária (MERCIER E VILOTTE et al., 1993), onde é regulado por uma complexa interação entre hormônios célula-célula e célula-matriz extracelular (STREULI, 1993). A regulação ocorre em duas fases, primeira durante a gravidez e parto e a segunda fase durante a lactação após o parto (BRUCE & WHITELOW, 1995).

Durante a segunda fase, a prolactina tem sido determinante para a expressão de  $\beta$ -Lg (BURDON et al., 1994b). O promotor do gene *BLG* é sensível a sinais induzidos pela prolactina, fenômeno demonstrado pela indução de prolactina cloranfenicol-acetiltransferase (CAT), na atividade em células do ovário de hamster chinês cotransfectadas com um plasmídeo para a expressão do receptor de prolactina, e um gene híbrido compreendendo 4Kb

da  $\beta$ -Lg, com a região 5' promotora, junto ao gene CAT (LESUEUR et al., 1990). A prolactina ativa a transcrição da *BLG* por intermédio de um membro da família de fatores de transcrição STAT (*signal transduction- activated transcription*) (BURDON et al., 1994a), o STAT5 (ROSEN et al. 1999).

### 2.3.6 Polimorfismo proteico

O primeiro polimorfismo detectado para a  $\beta$ -Lg foi no leite bovino (ASCHAFFENBURG & DREWRY, 1955). São conhecidas uma dúzia de polimorfismos (GODOVAC-ZIMMERMAN et al., 1996), e foram associadas a diversos efeitos na produção de leite.

Em ovelhas, a  $\beta$ -Lg é polimórfica em diferentes populações, sendo encontradas as variantes A, B e C. O alelo A e B são predominantes (KING et al, 1969; CHIOFALI & MICARI, 1987). As duas variantes diferem por uma única substituição de aminoácidos (Tir-His) na posição 20 da proteína (GAYE et al., 1986).

Em caprinos, a proteína  $\beta$ -Lg têm sido considerada polimórfica (MACHA et al., 1970), porém variações genéticas que justificassem essa variação na proteína não foram relatadas (MOIOLI et al. 1998 e 2007). Porém Kumar et al. (2006) analisaram o leite de diferentes raças de caprinos indianos e encontraram os polimorfismos proteico para a  $\beta$ -Lg (A e B), e associaram que animais com  $\beta$ -Lg AA produziram mais leite que animais  $\beta$ -Lg AB ( $P < 0,01$ ). Porém a questão do polimorfismo genético que explique essa variação na proteína não está claro.

Folch et al. (1994), sequenciaram todo o gene *BLG* em caprinos e encontraram dois polimorfismos de base única (SNP) no gene localizados na região UTR 3', não codificante, (T/C na posição +4122) e (G/C na posição +4605), porém não encontraram nenhuma variação no gene que resultasse em modificação da proteína. É conhecido uma série de polimorfismo nas regiões UTRs, na região promotora e regiões de éxons traduzidas, porém nenhuma que resulte em modificações na cadeia de aminoácidos (PENA et al., 2000; YAHIAOUI et al., 2000; BALESTER et al., 2004; GRAZIANO et al., 2003).

Outros polimorfismos genéticos foram detectados em caprinos. Pena et al. (2000), caracterizaram dois polimorfismos na região do éxon 7, que corresponde a uma região UTR, um sendo uma transição de G por A e um polimorfismo que corresponde a uma sequência de 1° pb que se repete em tandem duas ou três vezes (VNTR) na posição +4641 ( $I_2 - I_3$ ). Devido à presença desse polimorfismo em região UTR, foi sugerida a possibilidade de sua influencia na estabilidade da molécula de RNA mensageiro.

Yahiaoui et al. (2000), detectaram transição SNP (C/T) na região promotora do gene *BLG* em caprinos de diferentes raças, porém é necessário a avaliação da influência desse polimorfismo na produção de leite.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Biológico e Coleta de Dados:

Foram utilizados 150 animais (*Capra hircus*) em idade reprodutiva, pertencentes às raças Saanen e Alpina e oriundos de cruzamentos com diferentes graus de sangue entre estas raças, alojadas no setor de caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa - MG.

Para a identificação dos genótipos destes animais para o gene *BLG* foram coletados 10mL de sangue em tubos vacutainer estéreis com EDTA 8% (ácido etilenodiamino tetraacético). Após a coleta os tubos contendo sangue foram armazenados em isopor com gelo, foi feita uma centrifugação durante 10 minutos a 2.500g, para separação de leucócitos e posteriormente transferidos para freezer a -20°C.

#### 3.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de 300 µL de sangue total utilizando o protocolo “*Salting Out*” descrito por MILLER et al. (1988), acrescentando-se uma limpeza com clorofórmio após a precipitação com NaCl. Posteriormente o DNA foi ressuscitado em cerca de 50 µL de água ultrapura e quantificado em gel poliacrilamida a 5% com o auxílio de padrão Lambda DNA (Invitrogen - Carlsbad, CA, USA).

#### 3.3 Escolha de *Primers*

Os *primers* utilizados para a amplificação das regiões de interesse foram provenientes de publicações anteriores (Tabela 1), sendo checado o real alinhamento e amplificação do fragmento. As regiões analisadas compreendiam: A região promotora 5' e o éxon 1 (BLG-Pro), onde existe o polimorfismo identificado como -60(C/T); e a segunda região compreende o éxon 7 e a região não codificante 3' (BLG-7), onde existe o polimorfismo identificado como +4601 (S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub>).

Foi utilizado o programa Clustalw 2.0 para a realização do alinhamento dos *primers*, junto a sequência do gene *BLG* em caprinos disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (Numero de Acesso: Z33881.1). O fragmento e a região dos polimorfismos também foram checado, antes da ordem de confecção do *primer* pela empresa.



**Tabela 1.** Sequencia, tamanho e temperatura de anelamento dos *primers* correspondentes aos seus respectivos éxons para PCR convencional

<i>Primer</i> - 5' para 3'	Tamanho do amplicon	Temperatura de anelamento	Localização no gene	Autor
<b>BLG Pro</b>				
(F)- GTCACCTTCCCGTCCTGGGG	710 pb	61 °C	5' UTR - Éxon 1	YAHIAOIU et al., 2000
(R)- GGCCTTTCATGGTCTGGGTGACG			-699	
<b>BLG-7</b>				
(F)- CGGGAGCCTTGGCCCTCTGG	426 pb	62 °C	Éxon 7 - 3' UTR	PENA et al. 2000
(R)-CCTTTGTCGAGTTTGGGTGT			4524	

### 3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese

Para a amplificação dos fragmentos de interesse foi utilizado a enzima *Taq* DNA Polimerase (Platinum®, Life Technologies Corporation, CA, EU), MgCl<sub>2</sub>, tampão 1x, par de *Primers*, dNTPs. As reações foram conduzidas em termociclador (Biotraza, LongGene®, Model MG96+), consistindo de um passo inicial a 94°C por cinco minutos para que ocorresse a desnaturação do DNA genômico, seguido por 30 ciclos que se repetiam da seguinte maneira: 94°C por 1 minuto para a abertura da fita molde de DNA, 61°C ou 62°C, dependendo do *primer* (Tabela 1), por 50 segundos, para que seja efetuada a ligação dos *primers*, e 72°C por 5 minutos para a extensão do fragmento. A finalização da PCR se deu por um passo a temperatura de 72°C durante 5 minutos.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%, durante 60 minutos, e posteriormente revelado em nitrato de prata (Ag<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>) para verificação do fragmento amplificado. Uma vez identificado os fragmentos de tamanho esperado, foi feita a identificação dos genótipos por meio do uso de enzimas de restrição.

### 3.5 PCR-RFLP

Para a realização do protocolo PCR-RFLP, foram utilizadas endonucleases de restrição com sítios de reconhecimentos específicos para os locais onde se encontram os SNPs de interesse.

Para a região promotora do gene, foi utilizada a enzima *Sma*I (Ludwig Biotecnologia LTDA, RS, BR) que reconhece a transição C/T na posição -60 do gene *BLG* (Tabela 2). O protocolo foi feito de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando 6 unidades da enzima para a digestão de 1µg de DNA. O produto da digestão foi avaliado em gel de poliacrilamida a 5%, após a eletroforese por 80 minutos.

Para o fragmento amplificado pelo *primer* BLG-7 foi utilizado a enzima *Sac*II (Life Technologies Corporation, CA, EU), que reconhece a transição G/A no éxon 7(Tabela 2). O protocolo foi realizado utilizando seis unidades da enzima para a digestão de 1µg de DNA. O

produto da digestão foi avaliado em gel de poliacrilamida a 8% por 2 horas e 30 minutos. A Identificação do Polimorfismo +4641 (I<sub>2</sub>/I<sub>3</sub>), foi realizada por meio de eletroforese do fragmento amplificado (BLG-7) em cuba vertical, do tipo torre à 8%, sob uma corrente constante de 150 volts durante 12h.

**Tabela 2.** Enzimas de restrição utilizadas, fragmento submetidos à digestão e sítio específico de corte da enzima

Nome da Enzima	Fragmento de corte	Sítio de reconhecimento
<i>SmaI</i>	BLG-PRO	CCGCGG
<i>SacII</i>	BLG-7	CCCGGG

### 3.6 Dados de Produção de Leite

Os controles leiteiros foram realizados periodicamente 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 da Universidade Federal de Viçosa (UFV), para quantificação da composição do leite. O controle leiteiro e a análise do leite são procedimentos habituais do setor de caprinocultura da UFV.

### 3.7 Estimativa dos Valores Genéticos

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), observando-se que 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.

As informações de produção e composição do leite foram utilizadas para estimar os valores genéticos dos animais para a produção e percentagem de gordura, proteína, lactose e extrato seco total, além da contagem de células somáticas. Foi utilizado o pacote estatístico SAS® (2002) para a organização e preparação dos dados. Para estimar o valor genético dos animais foram descartadas lactações com duração inferiores a 92,5 dias (10%), superiores a 466 dias (5%) e com produções inferiores a 110 Kg (15%).

Os valores genéticos foram calculados por meio de um modelo animal contendo os efeitos aleatórios de animal e de ambiente permanente, e os efeitos fixos de ano-estação de parto, grupamento genético (GG1 a GG12), ordem (1 a 6) e tipo de parto (simples ou duplo), os quais foram utilizados para cada uma das características avaliadas em caso de efeito significativo observado em uma análise de variância prévia. Para a predição dos valores genéticos 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). Os números de lactações e de animais utilizados nesta análise, assim como os efeitos fixos considerados para cada característica avaliada, estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Observações utilizadas para o cálculo dos valores genéticos dos animais para cada característica avaliada.

Características	Número de Lactações	Número de Cabras	Efeitos Fixos
Produção de leite até 305 dias	2542	1199	anoest, op
Contagem de células somáticas	2183	1161	anoest, gs, op
Produção de proteína total	2542	1199	anoest, gs, op, tp
% de Proteína	2342	1229	anoest, gs, op
Produção de gordura	1961	1700	anoest, gs, op
% de gordura	2355	1229	anoest, gs, tp,
Extrato seco total	1947	1070	anoest, gs, tp, op
% extrato seco	2342	1229	anoest, gs
Produção de lactose	1947	1070	anoest, gs, tp, op
% de lactose	2342	1229	anoest, gs, op

Efeitos fixos avaliados : (anoest) ano e estação de parto; (op) ordem de parto; (gs) grupamento genético; (tp) tipo de parto.

A produção de leite até os 305 dias de lactação foi obtida pela seguinte fórmula:

$$PL305 = \sum_{i=1}^{n-1} \left[ \left( \frac{pldc_i + pldc_{i+1}}{2} \right) * I_{i,i+1} \right]$$

Onde: PL305 é a produção de leite acumulada até 305 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.

A contagem de células somáticas (CCS) foi transformada para escore de célula somática (ECS) por meio de:  $ECS = \log_2 (CCS / 100.000) + 3$ , em que CCS é o número de células por microlitro, essa transformação possibilita contornar o problema da CCS não seguir distribuição normal e não apresentar relação linear com a produção de leite (SHUTZ et al., 1995).

A associação dos genótipos obtidos, de acordo com os polimorfismos encontrados no gene *BLG*, com as características em estudo foi realizada por meio do seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + e_{ij} \text{ em que:}$$

$Y_{ij}$  é o valor genético do animal  $i$  de genótipo  $j$

$\mu$  é a média geral

$\alpha_j$  é o efeito do genótipo  $j$  (CC, CT ou TT para a região BLG-Pro,  $S_1S_1$ ,  $S_1S_2$  ou  $S_2S_2$  para a região BLG-7e  $I_2I_2$  ou  $I_2I_3$  para a mesma região)

$e_{ij}$  é o efeito aleatório do resíduo.

Para avaliar o efeito dos genótipos sobre as médias dos valores genéticos dos animais para as características avaliadas foi aplicado o teste de Tukey a 5% de significância.

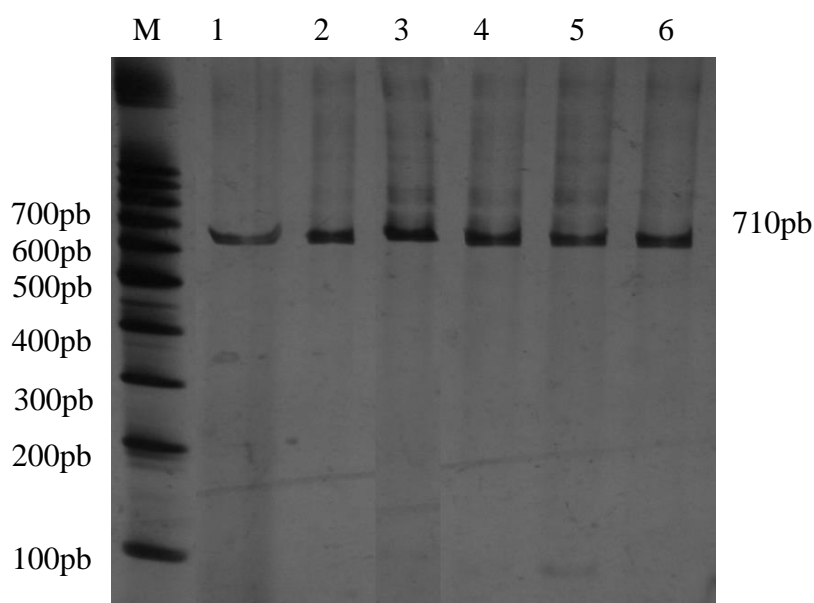
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Amplificação dos Fragmentos

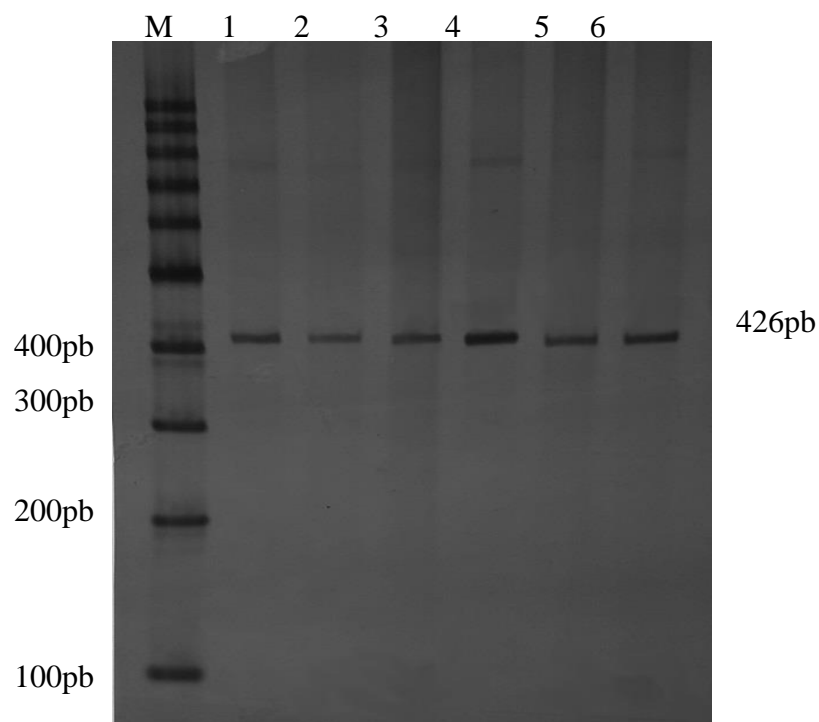
Com a utilização dos *primers* sintetizados foi possível amplificar os dois fragmentos diferentes a partir de amostras de DNA genômico, fragmentos estes, correspondentes as regiões promotora 5' + Éxon 1 (*BLG-Pro*) e a região do éxon 7 + região 3' (*BLG-7*).

O produto do PCR foi visualizado em gel de poliacrilamida a 5% confirmando a amplificação, e a verificação do tamanho do fragmento correspondente aos *primers*. O que confirmou o adequado anelamento dos *primers* com as regiões de interesse.

O fragmento amplificado com o *primer BLG-Pro* apresentou o tamanho esperado de 710 pb (Figura 2), e o fragmento proveniente da amplificação com o *primer BLG-7* apresentou o tamanho esperado de 426 pb (Figura 3).



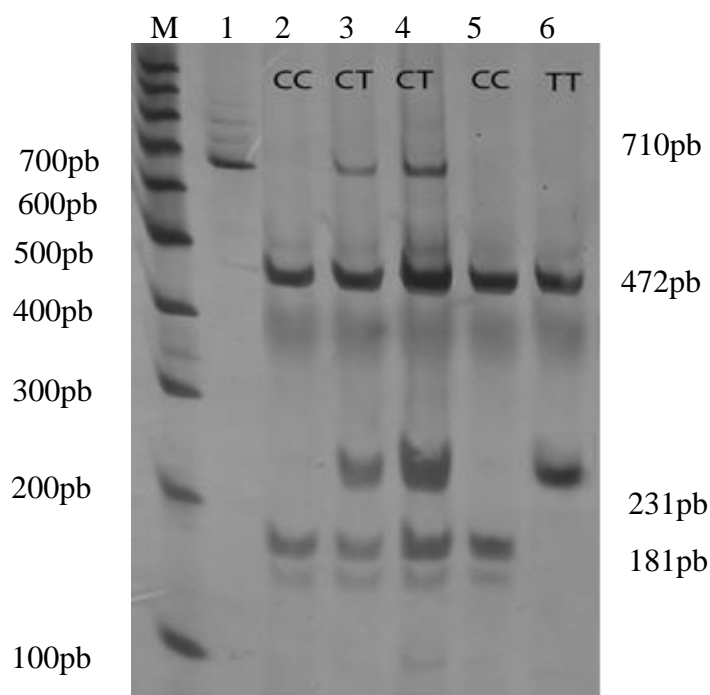
**Figura 2.** Produto de PCR submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, produtos da PCR. Pares de base (pb) Marcador de peso molecular (100 pb, Ludwig Biotec LTDA) (M). Canaletas de **1 a 6**= fragmentos de 710 pb amplificados pelo par de *primers* correspondentes à região promotora 5' + éxon 1 (*BLG-Pro*)



**Figura 3.** Produto de PCR submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, produtos da PCR. Pares de base (**pb**). Marcador de peso molecular (100 pb, Ludwig Biotec LTDA) (**M**). Canaletas de **1 a 6** = fragmentos de 426 pb amplificados pelo par de *primers* correspondentes à região do éxon 7 + região 3' (*BLG-7*)

#### 4.2 Região *BLG-Pro*

Com os fragmentos de PCR verificados pela eletroforese foi realizada a técnica de PCR-RFLP e submetidos à nova eletroforese para a visualização dos diferentes genótipos. No fragmento estudado existem dois sítios de reconhecimento sem modificações e um sítio onde ocorre o polimorfismo -60 (C/T) resultando em três possíveis cortes. Para o alelo C ocorreram três cortes, resultando em quatro fragmentos de 472, 181, 50 e 7pb, respectivamente, e para o alelo T ocorre apenas 2 cortes, que resultam em 3 fragmentos de 472, 231 e 7 pb, respectivamente, de acordo com a metodologia de Yahiaoui et al. (2000). O fragmento 472 serviu para o controle da digestão e os fragmentos 231 e 181 foram utilizados como marcadores para cada genótipo (Figura 4).



**Figura 4.** Análise dos produtos do PCR-RFLP de fragmentos *BLG-Pro* por gel de poliacrilamida (PAGE) 5% corado com nitrato de prata. Pares de base (**pb**). Marcador de peso molecular 100 pb (Ludwig Biotec LTDA) (**M**). Canaleta **1** fragmento sem o corte da enzima. Canaletas de **2 a 6**= diferentes cortes da enzima *SmaI* com genótipos CC e CT e TT de acordo com o padrão de corte da enzima na região promotora e éxon 1(*BLG-Pro*)

Foram encontrados todos os genótipos referentes ao polimorfismo -60 (C/T), as frequências encontradas para o genótipo CC foi de 58%, para o genótipo heterozigoto foi de 38% e o homozigoto TT foi de 4% (Tabela 4). Esses dados estão de acordo com os trabalhos realizados com a mesma região do gene *BLG* (YAHIAOUI et al., 2000; GRAZAINO et al. 2003; BALESTER et al., 2005; SZTANKOOVA et al., 2007).

**Tabela 4.** Frequências alélicas e gênicas para o polimorfismo -60(C/T) da região Promotora do gene *BLG* em caprinos do rebanho da UFV-MG

Alélica	
C	0,77
T	0,23
Genotípica	
CC	0,58
CT	0,38
TT	0,04

Ao analisar a mesma região do gene *BLG* em caprinos Yahiaoui et al. (2000), encontrou frequência para o alelo C do mesmo polimorfismo variando de 73 a 100% em cinco diferentes raças de caprinos (Murciano-Granadina, Canaria, Payoya, Malaguena, Saanen). Para a raça Saanen a frequência do alelo C foi de 73%, porém com apenas 20 animais.

Em diferentes raças e rebanhos na Itália Grazaino et al. (2003), analisaram o polimorfismo em questão, e encontraram a variação do alelo C entre 80 e 100% (n=198). Ballester et al. (2005) também encontraram a frequência do alelo C variando de 66 até 100% em onze raças de caprinos na Europa e da África (n=200). Sztankoova et al. (2007), sobre o mesmo polimorfismo, encontraram a frequência do alelo C variando de 71 a 90% em diferentes populações de caprinos na República Checa (n=114). Bem como Veres et al. (2004), encontraram frequências para o alelo C para o polimorfismo entre 73 e 100% em diferentes raças e rebanhos de cabras húngaras (n=269). Em todos esses estudos a frequência do alelo C na raça Saanen nas diferentes populações se manteve entre 66% e 73%.

Após a genotipagem da região *BLG*-Pro, foram avaliados os efeitos dos genótipos (CC, CT e TT) sobre as características produtivas (Tabela 5).

**Tabela 5.** Resumo das análises de variância para os valores genéticos das características estudadas em função dos genótipos da região *BLG*-Pro

Características	Efeito dos genótipos CC, CT e TT		
	QMgenótipo	QMresidual	<i>p</i> -valor
Produção de leite até 305 dias	2,402040	15,292725	0,8548
Contagem de células somáticas	0,0000756	0,0014120	0,9479
Produção de proteína total	0,0991425	0,9178448	0,8977
% de Proteína	0,0444657	0,0138764	0,0435*
Produção de gordura	0,3114151	11,404130	0,7614
% de gordura	0,0372199	0,0297988	0,2899
Extrato seco total	0,8299510	13,987807	0,9424
% extrato seco	0,0866406	0,0994226	0,4205
Produção de lactose	0,0028643	24,005943	0,9988
% de lactose	0,0019161	0,0084861	0,7982

O polimorfismo -60(C/T) apresentou associação significativa com a percentagem de proteína do leite ( $p < 0,05$ ). Resultado que demonstra a associação dos genótipos da região promotora como teor de proteínas no leite de cabras, porém não houve influência nas demais características avaliadas (Tabela 5).

Por meio do teste de comparação de médias o genótipo TT foi superior aos genótipos CT e CC ( $p < 0,05$ ), mesmo o genótipo TT possuir menor frequência que os outros genótipos (Tabela 6).

**Tabela 6.** Comparação dos genótipos quanto o valor genético para a percentagem de proteína no leite, para o polimorfismo -60(C/T) do gene *BLG*

Genótipos	Médias <sup>1</sup>
TT	0,12440 a
CT	0,00281 b
CC	-0,00110 b

Médias seguidas de letras diferentes indicam que houve diferença pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<sup>(1)</sup> Médias dos valores genéticos.

Esse resultado não foi observado por Baltrėnaitė et al. (2013), que associaram, por meio de correlação direta multifatorial, os diferentes genótipos para o polimorfismo -60(C/T) com os dados de produção de leite, em rebanhos de cabras de populações da Europa ocidental. Foi encontrado que cabras com genótipo CC possuíam teores de proteína no leite superiores a cabras de genótipos CT e TT em 0,12% e 0,16% ( $p < 0,05$ ) respectivamente.

A influência na produção de uma proteína em animais pode ser explicada pela presença de polimorfismos em sítios específicos de fatores de transcrição na região promotora do gene, que podem influenciar numa maior expressão do gene (GRIFFITHS, 2008). O polimorfismo -60(C/T) está situado em uma região de reconhecimento da proteína de ativação 2 (*activator protein-2* - AP-2) que esta posicionado em ovinos e caprinos na posição -67/-60 (CCCAGCCC) do gene *BLG*. Em caprinos essa região possui distinções em dois nucleotídeos (CCCGGCCC) sendo o primeiro na posição -64(G/A) que se apresenta apenas em animais da raça Girgentana, e que com a variação A apresenta sítio preferencial de ligação com o fator AP2 (SARDINA et al., 2012) e o segundo polimorfismo é o -60(C/T) analisado nesse estudo.

Estudo similar foi realizado por Kuss et al. (2003), onde foi avaliado a presença de uma transversoão (C/G) no sítio de reconhecimento do fator de transcrição AP-2 (CCCAGGGC) em bovinos. A presença da variável G causa a modificação do sitio de reconhecimento do fator AP-2. Entretanto foi encontrada uma associação positiva entre a variável G em comparação a variável C que formaria o sítio preferencial para o fator AP-2, com a produção e percentagem de proteína  $\beta$ -Lg ( $p < 0,001$ ). Porém houve uma diminuição na produção da  $\alpha$ s1-caseína, da  $\beta$ -caseína e a produção total de proteínas também foram associadas à variação G.

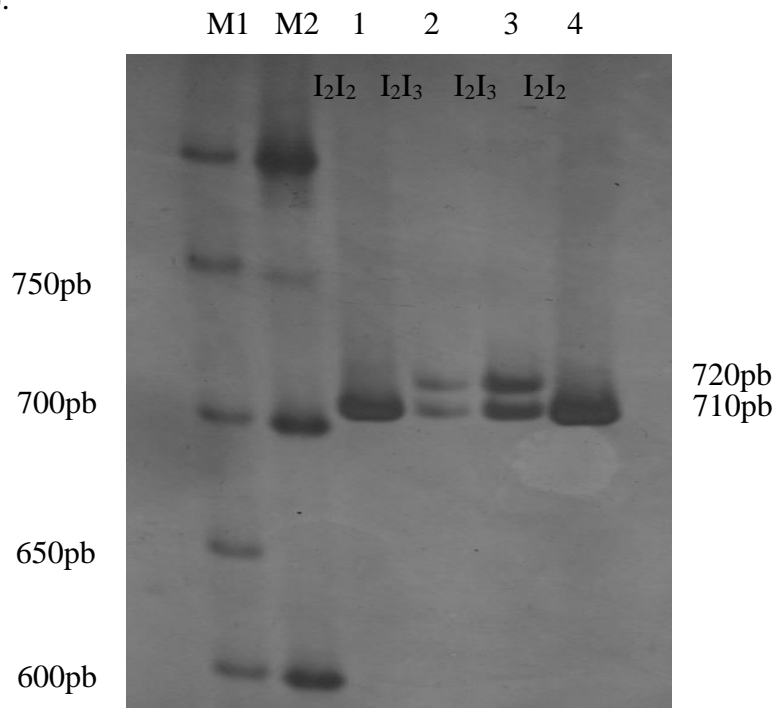
No presente trabalho o alelo T teve efeito favorável na percentagem de proteína, mesmo modificando o sítio de ligação da proteína AP-2, como encontrado em bovinos por Kuss et al. (2003). É sugerido o estudo mais detalhado desse polimorfismo, verificando os níveis de produção de cada proteína no leite para melhor entendimento da relação entre o sítio de reconhecimento da AP2.

#### 4.3 Região *BLG*-7

Foram genotipados 129 animais para a região *BLG*-7, sendo observado o polimorfismo +4641 I<sub>2</sub>/I<sub>3</sub>, descrito por Pena et al. (2000). Esse polimorfismo é caracterizado pela diferença no tamanho dos fragmentos, que é devido a um VNTR de 10 pb (CCAGGCCCT) repetidos duas ou três vezes no éxon 7 do gene *BLG* em caprinos. A variação dessa repetição resulta em fragmentos de diferentes tamanhos após a amplificação por PCR, podendo ser observados em gel sem a necessidade de outras análises (Figura 5).



Essa sequência também é encontrada em ovinos e bovinos com duas inserções e em suínos e equinos a sequência se apresenta apenas uma vez e com variações em dois nucleotídeos. (PENA et al., 2000).



**Figura 5.** Gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata. Pares de base (**pb**) Marcador de peso molecular (50 pb, Ludwig Biotec LTDA) (**M1**). Marcador de peso molecular (100 pb, Ludwig Biotec LTDA) (**M2**). Canaletas de **1 a 4**= fragmentos de aproximadamente 700 pb amplificados pelo par de *primers* correspondentes à região promotora (BLG-Pro). Canaletas **1 e 4** apresentam a variação I<sub>2</sub>I<sub>2</sub> (**710 pb**) enquanto as canaletas **2 e 3** apresentam a variação I<sub>2</sub>I<sub>3</sub> (**720pb**)

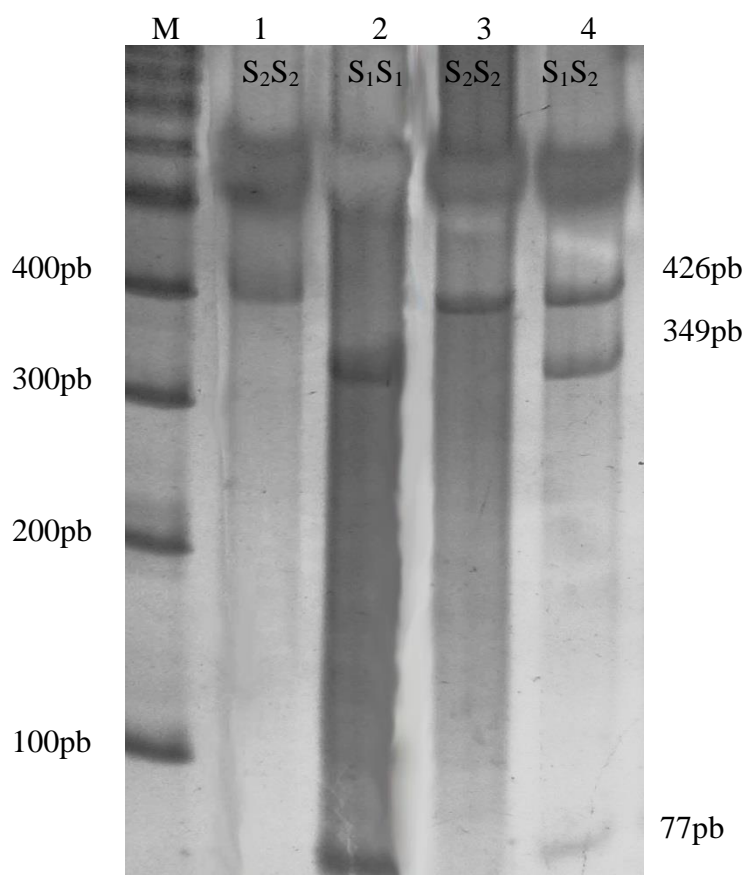
No presente estudo foram encontrados os genótipos homozigotos I<sub>2</sub>I<sub>2</sub> e heterozigoto I<sub>2</sub>I<sub>3</sub>, não sendo encontrado o genótipo I<sub>3</sub>I<sub>3</sub> (Figura 5), semelhante a Pena et al. (2000), em que a frequência do alelo I<sub>3</sub> foi muito pequena, sendo encontrado apenas 5 animais com a variação I<sub>3</sub>, representando 4% dos animais genotipados (Tabela 7).

**Tabela 7.** Frequências alélicas e gênicas para o polimorfismo +4641 (I<sub>2</sub>/I<sub>3</sub>), presente no éxon 7 do gene *BLG* em caprinos do rebanho da UFV-MG

Alélica	
I <sub>2</sub>	0,98
I <sub>3</sub>	0,02
Genotípica	
I <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	0,96
I <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	0,04
I <sub>3</sub> I <sub>3</sub>	-----

Não foi descrito nenhuma modificação na cadeia de aminoácidos da  $\beta$ -Lg devido o éxon 7 ser uma região UTR. Porém, é conhecido que variações na região 3' UTR podem desempenhar um papel importante na estabilidade do transcrito e, conseqüentemente, na sua tradução (BELLASCO & BRAWERMAN, 1993). Como por exemplo, os níveis do transcrito do gene da  $\alpha$ s1-Caseína que são afetado em até um terço, devido a inserção de 457 pb na região 3' UTR (JANSA PÉREZ et al. 1994).

A identificação do polimorfismo +4601 ( $S_1/S_2$ ) foi verificada por meio da utilização da enzima de restrição *SacII*. A enzima possuiu apenas um sítio de corte na região +4601. Quando presente o sítio de reconhecimento, a digestão resulta em dois fragmentos (349 e 77pb), identificando a variação  $S_1$ . Quando não existe o sítio para o corte, o fragmento permanece com o tamanho original de 426 pb, identificando o alelo  $S_2$ . Esses fragmentos foram visualizados em gel de poliacrilamida a 8% (Figura 6).

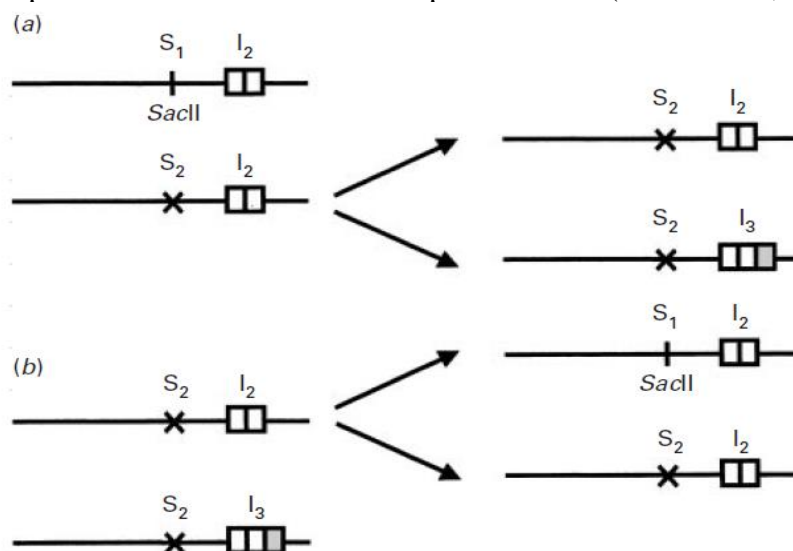


**Figura 6.** Análise dos produtos do PCR-RFLP de fragmentos BLG-7 por gel de poliacrilamida (PAGE) 8% corado com nitrato de prata. Pares de base (pb). Marcador de peso molecular 100 pb (Ludwig Biotec LTDA) (M). Canaleta de 1 a 5= diferentes cortes da enzima *SacII* com genótipos  $S_2S_2$ ,  $S_1S_1$  e  $S_1S_2$  de acordo com o padrão de corte da enzima na região do éxon 7 e promotora 3' (BLG-7)

Não foi observado por Pena et al. (2000), a presença do haplótipo  $S_1I_3$ . Para explicar as variações entre os alelos (Figura 7), o autor desenvolveu duas possíveis origens para os polimorfismos encontrados na região BLG-7 (Figura 8). A primeira seria que originalmente existiam duas variantes causadas pela presença do SNP na posição +4601 ( $S_1/S_2$ ) e ambos contendo duas variações da sequência do VNTR ( $I_2$ ) e uma adição de uma sequência do VNTR, na variação  $S_2$  resultaria num novo alelo  $S_2I_3$  (a). Numa segunda possível origem, as variantes do polimorfismo em VNTR ( $I_2/I_3$ ) seriam precursores e a variação em SNP ( $S_1$  e  $S_2$ ) teria ocorrido apenas nos indivíduos com duas sequências do VNTR, formando as variações  $S_1I_2$  e  $S_2I_2$  (b) (PENA et al., 2000).



**Figura 7.** Esquema de comparação entre os dois alelos do gene da  $\beta$ -lactoglobulina caprina. Posição S, polimorfismo para a digestão da enzima *SaeII*, e posição I com a variação de duas e três repetições representando os alelos  $I_2$  e  $I_3$  respectivamente (PENA et al., 2000)



**Figura 8.** Esquema representando as duas possíveis origens dos três alelos para a região do éxon 7 do gene da  $\beta$ -lactoglobulina (PENA et al., 2000)

Em concordância com Pena et al. (2000), não foi observado a variação  $S_1I_3$ , nem a presença de homocigoto para a variação  $I_3$ . Fato que ressalta a primeira teoria do surgimento dos polimorfismos como a mais aceitável, onde o polimorfismo VNTR é o mais recente entre as duas.

O polimorfismo +4641 (I<sub>2</sub>/I<sub>3</sub>) não apresentou nenhum efeito significativo sobre as características de produção, no entanto a baixa frequência do polimorfismo I<sub>3</sub> pode dificultar a detecção de algum efeito.

Para o polimorfismo +4601 (S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub>) observou-se frequências de 0,75; 0,18 e 0,07 para os genótipos S<sub>1</sub>S<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> e S<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, respectivamente, e 0,84 e 0,16 para os alelos S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>, respectivamente (Tabela 8). Essas frequências estão próximas em proporção às verificadas por Pena et al. (2000).

**Tabela 8.** Frequências alélicas e gênicas para o polimorfismo +4601(S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub>) no éxon 7 do gene *BLG* em caprinos do rebanho da UFV-MG

Alélica	
S <sub>1</sub>	0,84
S <sub>2</sub>	0,16
Genotípica	
S <sub>1</sub> S <sub>1</sub>	0,75
S <sub>1</sub> S <sub>2</sub>	0,18
S <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	0,07

No trabalho de Pena et al. (2000), foram encontradas proporções semelhantes de 0,70 e 0,30 para os alelos S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> em rebanhos franceses e espanhóis. Kumar et al. (2006), verificaram diferentes proporções entre os alelos em rebanhos de caprinos indianos, variando de 1,0 do alelo S<sub>2</sub> em algumas raças até a frequência de 0,53 e 0,47 para os alelos S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>, respectivamente.

Em caprinos na Índia e Egito (Damascus e Barki) El-Hanafy et al. (2010), avaliaram o polimorfismo em encontrando diferença entre as duas frequências. A raça Barki apresentou frequências de 0,50 para cada um dos alelos enquanto que a raça Damascus apresentou frequência de 0,9 e 0,1 para os alelos S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> respectivamente.

O polimorfismo +4601 (S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub>) apresentou associação com a porcentagem de gordura no leite (p<0,05). Para as demais características produtivas não houve influência deste polimorfismo (Tabela 9).

**Tabela 9.** Resumo das análises de variância para os valores genéticos das características estudadas em função dos genótipos da região BLG-7

Características	Efeito dos genótipos S <sub>1</sub> S <sub>1</sub> , S <sub>1</sub> S <sub>2</sub> e S <sub>2</sub> S <sub>2</sub>		
	QM genótipo	QM residual	<i>p</i> -valor
Produção de leite até 305 dias	2,570963	16,664186	0,8572
Contagem de células somáticas	0,00185595	0,00125741	0,2327
Produção de proteína total	0,9677357	0,9223420	0,3534
% de Proteína	0,00174246	0,01288319	0,8736
Produção de gordura	0,4831406	11,117599	0,6486
% de gordura	0,09235964	0,02292580	0,0203*
Extrato seco total	11,873612	14,079700	0,4328
% extrato seco	0,16434856	0,07459907	0,1149
Produção de lactose	27,001373	24,723484	0,3388
% de lactose	0,00206824	0,00827856	0,7793

\*Significativo a 5%.

Foi observado que animais com o genótipo S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> apresentaram média dos valores genéticos superiores, em percentagem de gorduras, que animais de genótipo S<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, porém não houve distinção com animais de genótipo S<sub>1</sub>S<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Comparação dos genótipos quanto ao valor genético para a percentagem de gordura no leite, para o polimorfismo +4601 (S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub>) do gene *BLG*

Genótipos	Média <sup>1</sup>
S <sub>1</sub> S <sub>2</sub>	0,06930 a
S <sub>1</sub> S <sub>1</sub>	-0,01925 a b
S <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	-0,07614 b

Médias seguidas de letras diferentes indicam que houve diferença pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<sup>(1)</sup> Médias dos valores genéticos.

Em um estudo semelhante Kahilo et al. (2014) associaram os polimorfismos +4601(S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub>) em cinco diferentes raças de caprinos do Egito (n=20), sendo observado por esses autores que animais heterozigotos apresentaram maior produção de leite nas raças Alpina e Nubiana ( $p < 0,05$ ). Não houve efeitos significativos sobre a produção total de leite no presente estudo, e essa diferença entre a influencia pode ter ocorrido devido a diferença de metodologia, uma vez que os autores citados fizeram associação dos genótipos diretamente com os dados das características, ou seja não foram utilizados os valores genéticos.

De acordo com Melia et al. (2009), a produção de gordura no leite de vacas pode ser influenciado também por genótipos da  $\beta$ -Lg e da  $\kappa$ -Cn. Animais com genótipos BB para a  $\beta$ -Lg têm maior produção de ácidos graxos Láurico, Mirístico e Palmítico (C<sub>12:0</sub>, C<sub>14:0</sub> e C<sub>16:0</sub>)

120 dias pós-parto ( $p < 0,05$ ) e animais com genótipo AB apresentam superioridade da produção dos mesmos ácidos graxos em 60 dias pós-parto ( $p < 0,05$ ). O fato de maiores concentrações dos ácidos graxos de cadeia média (AGCM) estarem relacionados a presença de diferentes genótipos para a  $\beta$ -Lg pode estar associado positivamente com o aumento da síntese de *novo* nas glândulas mamárias (BOBE et al., 1999b; MELIA et al., 2009).

Outros efeitos foram verificados por Tsiaras et al. (2009), para os diferentes alelos da  $\beta$ -Lg com características de produção em bovinos. De acordo com esses autores a  $\beta$ -Lg teve associação positiva na produção total de leite, onde animais com o genótipo AB produziram mais que animais com genótipo AA ( $p < 0,05$ ). A produção total de gordura também sofreu influência dos genótipos da  $\beta$ -Lg. Vacas AB e BB produziram  $27 \pm 11$  Kg e  $33 \pm 12$  Kg de gordura a mais que animais AA ( $p < 0,05$ ). O genótipo BB apresentou influência positiva na porcentagem de gordura produzindo mais  $0,28 \pm 0,10\%$  ( $p < 0,05$ ) que animais de genótipo AA. De acordo com os autores não foi observado a influência dos genótipos da  $\beta$ -Lg com a produção e porcentagem de proteínas, corroborando com o presente estudo.

A produção dos componentes do leite é realizada na própria glândula mamária. Os nutrientes necessários para essa produção são fornecidos diretamente pelo sangue e são competidos por outros tecidos e órgãos. Os precursores necessários para a produção de proteínas e ácidos graxos do leite são divididos por essas duas complexas vias fisiológicas (Gordura e Proteína). Assim os processos produtivos sofrem influência da nutrição, hormônios, genética e ambiente (BOBE et al., 1999b; GOETSCH et al., 2011).

De acordo com Bobe et al. (1999a), a correlação entre as proteínas e os ácidos graxos no leite demonstram que fatores básicos comuns para as duas vias fisiológicas estão envolvidas na síntese desses nutrientes. Essa relação reflete a dependência de iguais precursores, cofatores, enzimas, hormônios e fatores de transcrição envolvidos na síntese de nutrientes do leite. Para os autores o grupo de ácidos graxos que são produzidos por meio da síntese de *novo* está intimamente relacionado aos diferentes níveis de  $\beta$ -Lg.

Os ácidos saturados de C6:0 até C16:0 são provenientes da síntese de *novo*, esses ácidos graxos são os únicos regulados pela enzima acetil coenzima A (CoA) carboxilase e o complexo ácido graxos sintase presentes na glândula mamária (PALMQUIST et al. 1993). A via fisiológica de produção de ácidos graxos de cadeia média em caprinos é expressamente dependente do complexo ácido graxos sintase, diferente de outros mamíferos não ruminantes. Os ácidos graxos C10:0 e C12:0 são, entre os demais ácidos graxos de cadeia médias, os mais dependentes da atividade desse complexo e da Acetil CoA carboxilase na glândula mamária. Que por sua vez é dependente da presença e da concentração de proteínas transportadora de ácidos graxos, como a albumina e a  $\beta$ -Lg (KNUDSEN & GRUNNET, 1982).

Assim a similaridade entre a  $\beta$ -Lg e a albumina, pela grande afinidade com ácidos graxos, pode explicar a associação do gene *BLG* com a porcentagem de gorduras presentes no leite de cabra. No estudo de Knudsen & Grunnet, (1982) a administração crescente de  $\beta$ -Lg em cabras lactantes aumentou a produção de AGCM, o que corrobora com esse resultado.

O leite caprino possui o dobro da quantidade de AGCM quando comparado ao leite bovino (CHILLIARD et al., 2006). Esses ácidos graxos possuem diferentes metabolismos quando comparados aos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) (GURR, 1995; BACH et al., 1996). Os AGCM podem ser efetivamente liberados a partir da digestão dos triglicerídeos pelas lipases estomacais e das lipases pancreáticas no duodeno, sendo elas diretamente absorvidas pelo epitélio do intestino, sem esterificação, e transportados pela veia porta para o fígado. São rapidamente oxidados constituindo uma rápida fonte de energia. Sendo importantes para quem sofre de desnutrição e da síndrome de má absorção de gordura (RAYNAL-LJUTOVACA et al., 2008). O uso dos AGCM foi iniciado em 1960 para

alimentação de prematuros, em uma proporção específica entre AGCM e AGCL, podendo ser também utilizada na alimentação de idosos (TELLIEZ et al., 2002).

A maior produção de gordura no leite em ruminantes pode ser influenciada pelos diferentes genótipos para o gene *BLG*, resultando em diferentes concentrações da proteína  $\beta$ -Lg. Essa íntima relação entre os dois componentes do leite, gera grande expectativa quanto à melhoria na qualidade da matéria produzida e a melhoria de suas características nutracêuticas.

## 5 CONCLUSÃO

A utilização do polimorfismo -60(C/T) localizado na região promotora do gene *BLG* apresenta associação com a percentagem de proteína no leite de cabras, podendo ser utilizado como marcador genético em rebanhos de caprinos leiteiros, sendo o alelo T o mais favorável ( $p < 0,05$ ).

O polimorfismo +4601 ( $S_1/S_2$ ) presente no éxon 7, região UTR 3' do gene *BLG*, está associado ao teor de gordura no leite de cabras, sendo o genótipo heterozigoto ( $S_1S_2$ ) superior em percentagem ao genótipo  $S_2S_2$ .

O polimorfismo +4641 ( $I_2/I_3$ ) não mostrou associação com as características produtivas avaliadas.



## 6 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ALBENZIO, M.; CAMPANOZZI, A.; D'APOLITO, M.D.; SANTILLO, A.; PETTOELLO MANTOVANI, M.; SEVI, A. Differences in protein fraction from goat and cow milk and their role on cytokine production in children with cow's milk protein allergy. **Small Ruminant Research**. v. 105, p. 202–205, 2012.

ALEXANDEER, L.J.; HAYES, G.; PEARSE, M.J.; BEATTIE, C.W.; STEWART, A.F.; WILLIS, L.M.; MACKINLAY, A.G. Complete Sequence of Bovine B-lactoglobulin cDNA. **Nucleic Acids Research**. v. 17, p. 16739, 1989.

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

ALSTON-MILLS, B.; AND M.P.; THOMPSON, A. possible mechanism of action of  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Dairy Science**. v. 76, p. 196, 1993

ARBER, W.; LINN, S. DNA modification and restriction. **Annual Review of Biochemistry**. v. 38, p. 467–500, 1969.

ASCHAFFENBURG, R.; DREWRY, J. Occurrence of different beta-lactoglobulin in cow's milk. **Nature**. v. 176, n.4474, p. 218-219, 1955.

BACH, A.C.; INGENBLEEK, Y.; FREY, A. The usefulness of dietary medium chain triglycerides in body weight control: fact or fancy? **Journal Lipid Research**. v.37, p. 708–726, 1996.

BALLESTER, M.; SANCHEZ, A.; FOLCH, J.M. Polymorphisms in the goat beta-lactoglobulin gene. **Journal Dairy Research**. v. 72, n.3, p. 379–384, 2005.

BALTRĖNAITĖ, L.; LIUCVAIKIENĖ, K.; MAKŠTUTIENĖ, N.; MORKŪNIENĖ, K.; ŠALOMSKIENĖ, L.; MICEIKIENĖ, I.; STANKEVIČIUS, R.; KERZIENĖ, S. The influence of goat milk protein gene polymorphism to milk traits. **Veterinarija ir Zootechnika**. v. 62, n. 84, p. 8-13, 2013.

BARRIONUEVO, M.; ALFEREZ, M.J.M.; LOPEZ ALIAGA, I.; SANZ SAMPELAYO, M.R. Beneficial effect of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome. **Journal of Dairy Science**. v.85, p. 657–664, 2002.

BELLASCO, J.; BRAWERMAN, G. Control of Messenger RNA Stability. San Diego, CA: **Elsevier Academic Press**, 1993.

BOBE, G.; BEITZ, D. C.; FREEMAN, A. E.; LINDBERG, G. L. Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates. **Journal of Dairy Science**. v. 82. n. 12, p. 2797-2804, 1999 (a).

BOBE, G.; BEITZ, D.C; LINDBERG, G.L. Associations among individual proteins and fatty acids in bovine milk as determined by correlations and factor analyses. **Journal of Dairy Research**. v. 66 p. 523-536, 1999(b).

BOTARO, B .G.; LIMA, Y.V.R.; AQUINO, A.A.; FERNANDES, R.H.R.; GARCIA, J.F.; SANTOS, M.V. Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características e a estabilidade do leite bovino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.42, n.5, p.747-753, 2007.

BOULANGER, A.; GROSCLAUDE, F.; MAHE, M.F. Polymorphism of caprine (Y g-I-caseina ndcx g-2-casein). **Genetic Selection Evolution**. v.16: p157-175, 1984

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene** v. 234.p177-186, 1999.

BRUCE, C.A.; WHITELAW. Regulation of ovine  $\beta$ -lactoglobulin gene expression during the first stage of lactogenesis. **Biochemistry and Biophysical Research Communication**. v. 209, p. 1089-1093,1995.

BUERGIN-WOLFF, A.; SIGNER, E.; FRIESS, H.M.; BERGER, R.; BIRBAUMER, A.; JUST, M. The diagnostic significance of antibodies to various cow's milk PROTEINS. **Europe Journal Pediatric**. v. 133, p. 17–24, 1980.

BURDON, T. G.; J. DEMMER, A. J. CLARK, AND C. J. WATSON. The mammary factor mpbf is a prolactin-induced transcriptional regulator which binds to stat factor recognition sites. **FEBS Letters**.v. 350, p. 177-182, 1994a

BURDON, T.G.; MAITLAND, A.J.; CLARK, R.; WATSON, C. J. Regulation of the sheep beta-lactoglobulin gene by lactogenic hormones is mediated by a transcription factor that binds an interferon-gamma activation siterelated element. **Molecular Endocrinology**. v. 8: p. 1528-1536, 1994b

CAIXETA, E.T. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed.Viçosa: UFV, p. 11-93, 2009.

CEBALLOS, L. S.; MORALES, E. R.; ADARVE, G. T.; CASTRO, J.D.; MARTÍNEZ, L.P.; SAMPELAYO, M.R. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 22, p. 322–329, 2009.

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.8, n.5, p.1751–1770, 2003.

CHIOFALO, L.; MICARI, P. Attuali conosenze sulle variante dele proteine del latte nelle popolazione ovine allevate in sicilla. Osservazioni sperimentali. **Science e Tecnica Lattiero-Casearia**. v. 38, p. 1004-114, 1987.

CHO, Y., C. A.; BATT, A.N.; SAWYER L. Probing the retinol-binding site of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal Biol Chemistry**. v. 269, p. 11102-11107, 1994.

EL-HANAFY, A. A.; EL-SAADANI, M. A.; EISSA, M.; MAHAREM, G. M.; KHALIFA, Z. A. Polymorphism of  $\beta$ -lacto globulin gene in barki and damascus and their cross bred goats in relation to milk yield. **Biotech in Animal Husbandry**. v. 26, n. 1-2, p 1-12, 2010.

FARRELL JR.; H. M. ET AL. Nomenclature of the proteins of cows' milk - sixth revision. **Journal of Dairy Science**. v. 87, p. 1641-1674. 2004

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa, p. 220, 1998.

FLOWER D.R. The lipocalin protein family: structure and function. **Biochemistry Journal**. v. p. 318:1-14, 1996.

FOLCH, J.M.; COLL, A.; HAYES, G.; SANCHEZ, A. Characterization of a caprine b-lactoglobulin pseudogene, identification and chromosomal localization by in situ hybridization in goat, sheep and cow. **Gene**. v. 177 , p. 87- 91, 1996.

FOLCH. J.M., COLL, A. SANCHEZ, A. Complete sequence of caprine beta-lactoglobulin gene. **Journal of Dairy Science**. v. 77, p. 3493-3497, 1993.

FORMAGGIONE, P.; SUMMER, A.; MALACARNE, M.; MARIANI, P. Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in Bos genus. Univerità degli Studi di Parma, **Annali della Facoltà di Medicina Veterinario**, vol. XIX, 1999. Disponível em: <<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/formaggioni/formaggioni.htm>> Acesso em : 27 de novembro de 2012.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P.L.H. Dairy chemistry and biochemistry. Blackie **Academic & Professional**. p. 478, 1998.

FURTADO, M. **Fabricação de queijos de cabra**. São Paulo: Nobel S.A, 6ª ed., 1985.

GAYE, P.; MUE-DELAHAIE, D.; MERCIER, J .C.; SOULIER, S.; VILOTTE, J.L.; FURET, J.P. Ovine Beta lactoglobulin messenger RNA: Nucleic sequence and mRNA levels during functional differentiation of the mammary gland. **Biochimistry**. V. 68, p. 1097-1107, 1986.

GODOVAC-ZIMMERMANN J.; KRAUSE I.; BARANYI M.; FISCHER-FRUHHOLZ S.; JUSZCZAK J.; ERHARDT G.; BUCHBERGER J.; KLOSTERMEYER H. Isolation and rapid sequence characterization of two novel bovine b-lactoglobulin I and J. **Journal of Protein Chemistry**. v. 15, p. 743-750, 1996.

GODOVAC-ZIMMERMANN J.; KRAUSE I.; BUCHBERGER J.; WEISS G.; KLOSTERMEYER H. Genetic variants of bovine b-lactoglobulin. A novel wild-type b-lactoglobulin W and its primary sequence. **Biol Chemistry Hoppe-Seyler**. v. 371, p. 255-260, 1990.

GODOVAC-ZIMMERMANN, J. The structural motif of beta-lactoglobulin and retinolbinding protein: A basic framework for binding and transport of small hydrophobic molecules. **Trends Biochemistry Science**. v. 13, p. 64-66, 1988.

GOETSCH, A.L; ZENG, S.S; GIPSON, T.A. Factors affecting goat milk production and quality. **Small Ruminant Research**. v.101 p. 55– 63, 2011.

GRAZIANO, M.; D'ANDREA, M.; ANGIOLILLO, A.; LAGONIGRO, R.; PILLA, F.A. new polymorphism in goat beta-lactoglobulin promoter region. **Italina Journal Animal Science**. v. 2, p.67–70, 2003.

GREENBERGER, N.J.; SKILLMAN, T.G. Medium chain triglycerides. Physiologic considerations and clinical implications. **New England Journal Medical**. v. 280, p. 1045–1058, 1969.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER S.R; LEWONTIN R. C.; CARROLL S. B. **Introdução a Genética**. 9ª Edição. Tradução: P. A. Motta. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2009.

GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphisms of milk proteins. In: Proceedings of the IDF Seminar on Implications of Genetic Polymorphism of Milk Proteins on Production and Processing of Milk. **Dairy Federation**. v. 3, 1995.

GURR, M.I. Nutritional significance of lipids. In: Fox, P.F. (Ed.), **Advanced Dairy Chemistry**, v. 2 Lipids. p. 349–402. 1995.

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

HAMBLING, S. G.; MCALPINE, A. S.; SAWYER, L. B-lactoglobulin. In: P. F. Fox (ed.) **Advanced dairy chemistry No. 1: Proteins**. Elsevier **Applied Science**. p 141-189,1992.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. D. Lipids in health and disease. **BioMedical Central**, v 6, p. 25, 2007.

HILL, J.P.; BOLAND, M.J.; CREAMER, L.K.; ANEMA, S.G.; OTTER, D.E.; PATERSON, G.R.; LOWE, R.; MOTION, R.L.; THRESHER, W.C. Effect of the bovine beta-lactoglobulin phenotype on the properties of beta-lactoglobulin, milk composition and dairy products. **Macromolecular Interactions in food technology**. v.650, p.281-294. 1996.

HILL, J.P.; THRESHER, W.C.; BOLAND, M.J.; CREAMER, L.K.; ANEMA, S.G.; MANDERSON, G.; OTTER, D.E.; PATERSON, G.R.; LOWE, R.; BURR, R.G.; MOTION, R.L.; WINKELMAN, A.; WICKHAM, B. The polymorphism of the milk protein betalactoglobulin: a review. **Milk composition, production and biotechnology**. p.173-202. 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br), 2005. Acesso em: 21 de novembro de 2012.

JANDAL, J.M. Comparative aspects of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**. v. 22, p. 177-185, 1996.

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

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-73, 1985.

JENNESS, R. Composition and characteristics of goat milk: review 1968–1979. **Journal of Dairy Science**. v. 63, p. 1605–1630, 1980.

KAHILO, KH.; EL-SHAZLY, S.; EL-KHADRAWY A; FATTOUH I. Genetic Polymorphism in  $\beta$ -lactoglobulin Gene of Some Goat Breeds in Egypt and its Influence on Milk Yield. **Life Science Journal**. v.11, n.10, p. 232-238, 2014.

KALSER, M.H. Medium chain triglycerides. **Advanced Internal Medical**, v. 17, p. 301–322, 1971

KING, J.B.W. The distribution of sheep beta-lactoglobulin. **Animal production**. V. 11, p. 53-57, 1969.

KNUDSEN, J.; GRUNNET, I. Transacylation as a chain-termination mechanism in fatty acid synthesis by mammalian fatty acid synthetase. Synthesis of medium-chain-length ( $C_8 - C_{12}$ ) acyl-CoA esters by goat mammary-gland fatty acid synthetase. **Biochemical Journal**. v. 202, p.139-143, 1982.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. The ligand-binding site of bovine  $\beta$ -lactoglobulin: Evidence for a function. **Journal of Molecular Biology**. v. 318, p. 1043-1055, 2002

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited review: betalactoglobulin: binding properties, structure and function. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.785-796, 2004.

KUMAR, A.; ROUT, K. P.; ROY, R. Polymorphism of  $\beta$ -lactoglobulin gene in Indian goats and its effect on milk yield. **Journal Application Genetic**. v. 47, n. 1, 2006.

KUSS, A.W.; GOGOL, J.; GEIDERMAN, H. Associations of a polymorphic AP-2 binding site in the 5'-flanking region of the bovine beta-lactoglobulin gene with milk proteins. **Journal of Dairy Science**. v. 86, n. 6, p. 2213-2218, 2003.

LE JAOUEN, J.C. Milking and the technology of milk and milk products. Goat production. **Academic Press**. p. 345-377, 1981

MACHA, J., Protein polymorphism in goat's milk. **Zivocisna Vyroba**. V. 15, P. 801–805, 1970.

MACK, P.B. A Preliminary Nutrition Study of the Value of Goat's Milk in the Diet of Children. **American Goat Society Publishers**, p.106–132, 1952

- MARTIN, P. Polymorphisme genetique des lactoproteines caprines. **Lait**. v. 73, p. 511–532, 1993
- MELIA, S.; LOSI, G.; CASTAGNETTI, G.B. The influence of milk  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin phenotypes on fatty acid composition of milk from Reggiana cows. **Dairy Science Technologies**. v. 89, p. 115–122, 2009.
- MILLER S. A.; D.D.DYKES D. D.; POLESKY H. F.. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215. 1988.
- MISZTAL, I. **REMLF90 manual**, 2002. Disponible en <<http://nce.ads.uga.edu/~ignacy/numpub/blupf90/docs/remlf90.pdf>>.
- MOIOLI, B.; D'ANDREA, M.; PILLA, F. Candidate genes affecting sheep and goat milk quality. **Small Ruminant Research**. v. 68, p. 179–192, 2007.
- MOIOLI, B.; PILLA, F.; TRIPALDI, C. Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research**. v.27. p. 185–195, 1998.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed reaction. **Methods in enzymology**. v. 155, p. 335-350, 1987.
- PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, A.D.; BARBANO, D.M. Feed and animal factors influencing milk fat composition. **Journal of Dairy Science** v. 76 p. 1753-1771, 1993.
- PASSEY, R.G.; MACKINLAY, A.G. Characterization of a second, apparently inactive copy of the bovine  $\beta$ -lactoglobulin gene. **European Journal of biochemistry**. V. 233, p. 736-743, 1995.
- PENA, N.P.; SANCHEZ, A.; COLL, A.; FOLCH, J.M. Isolation, sequencing, and relative quantitation by fluorescent-ratio PCR of feline  $\beta$ -lactoglobulin I, II and III cDNAs. **Mammalian Genome**. v. 10, p. 560-464, 1999.
- PENA, R.N.; SANCHEZ, A.; FOLCH, J.M. Characterization of genetic polymorphism in the goat beta-lactoglobulin gene. **Journal of Dairy Reserch**. v. 67, p. 217–224, 2000.
- PEREZ, M. D. Effect of beta-lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk. **Biochimistry Biophysic Acta**. v. 1123, p. 151-155, 1992.
- PEREZ, M. D.; CALVO, M. Interaction of beta-lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: A review. **Journal of Dairy Science**. v.78, p.978-988, 1995.
- PRÉAUX G.; BRAUNITZER G.; SCHRANK B.; STANGL A. The aminoacid sequence of goat  $\beta$ -lactoglobulin. **Hoppe-Seyler's Zeitung für Physiologie und Chemie**, v. 360, p. 1595, 1979.

QIN, B. Y.; CREAMER, L. K.; BAKER, E. N.; JAMESON, G. B. 12-bromododecanoic acid binds inside the calyx of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **FEBS Letters**. V. 438, p.272-278, 1998.

RAYNAL-LJUTOVACA, K.; LAGRIFFOULB, G.; PACCARDB, P.; GUILLET, I.; CHILLIARDC, Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. **Small Ruminant Research**. v. 79, p 57–72, 2008.

REMEUF, F. Influence du polymorphisme genetique de lacaseine  $\alpha$ -s-1 caprine surles caracteristiques physico-chimiques et technologiques du lait. **Lait**, v. 73, p. 549–557, 1993.

RIIHIMÄKI-LAMPÉN, L.H.; VAINIO, M.J.; VAHERMO, M.; POHJALA, L.L.; HEIKURA, J.M.; VALKONEN, K.H.; VIRTANEN, V.T.; YLI-KAUHALUOMA, J.T.; VUORELA, P.M. The Binding of Synthetic Retinoids to Lipocalin  $\beta$ -Lactoglobulins. **Journal Medical Chemistry**. v.53, p. 514–518, 2010.

ROBITAILLE, G. Influence of kappa-casein and beta-lactoglobulin genetic variation on the heat stability of milk. **Journal of Dairy Research**. v.62, p.593-600, 1995.

ROBITAILLE, G.; BRITTEN, M.; MORISSET, J.; PETITCLERC, D. Quantitative analysis of beta-lactoglobulin A and B genetic variants in milk of cows beta-lactoglobulin AB throughout lactation. **Journal of Dairy Research**. v. 69, n.4, P.651-654, 2002.

ROSEN, J. M.; WYSZOMIERSKI, S. L.; HADSELL, D. Regulation of milk protein gene expression. **Annual Review Nutrition**. v. 19, pv. 407-436, 1999.

SABBAH, A.; HASSOUN, S.; DROUET, M. L' allergie au lait de vache et sa substitution par le lait de chevre. In: **Proceedings of the Colloque Interets Nutrition ne let Dietetique du Lait de Chevre**, v. 81, p. 111–118, 1997.

SANGER F.; NICKLEN S.; COULSON A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SARDINA, M. T; ROSA, J.M.; DAVOLI, R. Polymorphisms of beta-lactoglobulin promoter region. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 3203–3210, 2012.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide**. Version 9.1 ed. Cary: SAS Institute, USA, 2002.

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

SCHWABE, A.D.; BENNETT, L.R.; BOWMAN, L. Poctanoic acid absorption and oxidation in humans. **Journal Application Physiology**. v. 19, p. 335– 337, 1964.

SCOTT, K. D.; ABLETT, E. M.; LEE, L. S.; HENRY, R. J. AFLP markers distinguishing an early mutant of flame seedless grape. **Euphytica**. v. 113, n. 3, p. 245-249, 2000.

STREULI, C. Extracellular matrix and gene expression in mammary epithelium. **Seminars Cell Biology**. v. 4, p. 203-212. 1993

STUPNISKII, R.M.; IL'CHENKO, M.D.; Electrophoresis of goat's milk proteins. **Fiziol. Biokim. Sel'Khoz Zhivot Respub. Mezhved Temat. Nauch.** v. 5, p.62–65, 1967.

SWAISGOOD, H.E. Characteristics of milk. In: FENNEMA, O.R. **Food chemistry**, p. 841-878, 1996.

SZTANKÓOVÁ Z.; MÁTLOVÁ, V.; MALÁ G. Genetic polymorphism of the  $\beta$ -lactoglobulin gene in the proximal region in the Czech goat population. 58<sup>o</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production. **Anais**...p. 26 – 29, 2007.

TANTIBHEDHYANANGKUL, P.; HASHIM, S.A. Medium-chain triglyceride feeding in premature infants: effects on fat and nitrogen absorption. **Pediatrics**. v. 55, p. 359–370, 1975.

TANTIBHEDHYANANGKUL, P.; HASHIM, S.A. Medium-chain triglyceride feeding in premature infants: effects on calcium and magnesium absorption. **Pediatrics** v. 61, p. 537–545, 1978.

TAYLOR, S.L. Immunologic and allergic properties of cow's milk proteins in humans. **Journal Food Protection**. v. 49, p. 239–250, 1986.

TELLIEZ, F.; BACH, V.; LEKE, A.; CHARDON, K.; LIBERT, J.P. Feeding behavior in neonates whose diet contained medium-chain triacylglycerols: short-term effects on thermoregulation and sleep. **Journal Clinical Nutrition**. v.76 n.5, p. 1091–1095, 2002.

TSIARAS, A. M; BARGOULI, G; BANOS, G; BOSCOS, C. M. Effect of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin Loci on Milk Production Traits and Reproductive Performance of Holstein Cows. **Journal of Dairy Science** v. 88 p. 327–334, 2005.

VERESS, G.Y.; KUSZA. S.Z.; BŐSZE, Z.S.; KUKOVICS, S.; JÁVOR, A. Polymorphism of the  $\alpha$ s1-casein,  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin genes in the Hungarian Milk Goat. **South African Journal of Animal Science**. v. 34, p 20-23, 2004.

WANG, Q.; ALLEN, J.C.; SWAISGOOD, H.E. Binding of lipophilic nutrients to  $\beta$ -lactoglobulin prepared by bioselective adsorption. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p. 257-264, 1999.

YAHYAOU, M.H.; PENA, R.N.; SANCHEZ, A.; FOLCH, J.M. Polymorphism in the goat  $\beta$ -lactoglobulin proximal promoter region. **Journal Animal Science**. v. 78, p. 1100–1111, 2000.