



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO
ANIMAL - PPGPA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VACAS LEITEIRAS
POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES E SUAS
IMPLICAÇÕES NA COMPOSIÇÃO E QUALIDADE DO
LEITE**

MIGUEL ANGELLO DA SILVA FERNANDES CAMPOS

MACAÍBA/RN - BRASIL
SETEMBRO 2011

MIGUEL ANGELLO DA SILVA FERNANDES CAMPOS

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VACAS LEITEIRAS
POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES E SUAS
IMPLICAÇÕES NA COMPOSIÇÃO E QUALIDADE DO
LEITE**

Dissertação de mestrado do programa de Pós-graduação em Produção Animal, intitulado Caracterização Genética de Vacas Leiteiras Por Meio de Marcadores Moleculares e Suas Implicações na Composição e Qualidade do Leite.

Área de concentração: Produção Animal

Comitê de orientação:

Orientadora: Prof^a. Dr^a Magda Maria Guilhermino
(Dsc – UECIA/UFRN)

Co-Orientadora: Dr^a Maria Aparecida Cassiano Lara
(Instituto de Zootecnia - APTA / SAA)

MACAÍBA – RN - BRASIL

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Biociências

Campos, Miguel Angello da Silva Fernandes

Caracterização genética de vacas leiteiras por meio de marcadores moleculares e suas implicações na composição e qualidade do leite / Miguel Angello da Silva Fernandes Campos. – Macaíba, RN, 2011.

64 f. : Il.

Orientadora: Profa. Dra. Magda Maria Guilhermino .
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Cassiano Lara.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa Integrado de Pós-Graduação em Produção Animal – PPGPA.

1. β -Lactoglobulina – Dissertação 2. Leptina PCR-RFLP, PIT-1 – Dissertação. 3. Vacas – Dissertação. I. Guilhermino, Magda Maria. II. Lara, Maria Aparecida Cassiano. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 613.287.5

MIGUEL ANGELLO DA SILVA FERNANDES CAMPOS

Caracterização Genética De Vacas Leiteiras Por Meio De Marcadores Moleculares E Suas Implicações Na Composição e Qualidade Do Leite

Aprovada em 21/09/2011, pela Banca Examinadora.

Orientadora: _____
Prof.^a. Dr.^a Magda Maria Guilhermino
(Dsc – UECIA/UFRN)

Co-Orientadora: _____
Dr.^a Maria Aparecida Cassiano Lara
(Instituto de Zootecnia; APTA / SAA)

Comissão Examinadora:

Prof Dr.^a. Débora Andrea Evangelista Façanha
(Dsc - UFERSA)

Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel
(Dsc – UECIA /UFRN)

Dr.^a Gunta Gutmanis
(Instituto de Zootecnia; APTA / SAA)

**Macaíba-RN
2011**

BIOGRAFIA DO AUTOR

MIGUEL ANGELLO DA SILVA FERNANDES CAMPOS, nasceu em Natal, capital do Rio Grande do Norte, no dia 09 de novembro de 1982, filho de Haroldo Fernandes Campos e Francisca das Chagas da Silva Campos. Concluiu o ensino fundamental no Colégio Nossa Senhora das Neves, iniciou o curso Técnico Agrícola e ensino médio em 1998 pela Escola Agrícola de Jundiáí no Município de Macaíba – RN, concluindo o curso no ano de 2000. Ingressou no curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal da Paraíba no ano de 2003, concluindo em 2009. Ingressou na pós-graduação em produção animal, área de concentração Produção Animal pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte no ano de 2009, concluindo em setembro de 2011.

"A dívida é o princípio da sabedoria"

(Aristóteles)

ADS MEUS PAIS,

Haroldo Fernandes Campos e Francisca das Chagas da Silva Campos, pelo incentivo diário, suas palavras de conforto e atenção.

DEDICO

AGRADECIMENTO

A um ser superior muito sábio que nos concebe a vida e sabedoria, “Deus”.

Aos meus pais Haroldo Fernandes Campos e Francisca das Chagas da Silva Campos, por sua dedicação e carinho com seus filhos.

Aos meus irmãos Saul Jorge da Silva Fernandes Campos e Gigliola Angella da Silva Fernandes Campos, pelo apoio nas horas mais difíceis.

À minha cunhada Gabriela Kelly Pacheco pelas palavras de apoio sempre.

A meu tio Francisco das Chagas da Silva, por sempre estar pronto a ajudar e aconselhar.

À minha segunda mãe Maria de Lourdes do Nascimento, sempre com um conselho a zelar e suas receitas caseiras sempre ao nosso gosto.

À minha namorada Paula Priscilla Liberato da Escóssia, por me ajudar nesta caminhada e na concretização de mais uma etapa da minha vida.

Aos mestres da vida Maria da Piedade Medeiros, Ana Sancha Malveira Batista e Lidney Henriques da Silva, por seus conselhos e ensinamentos para seguir o caminho da docência.

Ao comitê de orientação, Magda Maria Guilhermino, Débora Andrea Evangelista Façanha e Maria Aparecida Cassiano Lara, pela condução deste trabalho de pesquisa e auxílio ao amadurecimento intelectual.

Aos professores do programa de pós-graduação que contribuíram direta ou indiretamente nesta caminhada em especial ao professor Francisco das Chagas Fonseca (Mestre TITICO), Luciano Patto Novas pelas nossas longas e produtivas conversas.

Ao Instituto de Zootecnia (IZ) de Nova Odessa - SP, por possibilitar a utilização do Laboratório de Genética e em especial a Dr^a Maria Aparecida Cassiano Lara em me receber como estagiário, à Dr^a Gunta Gutmanis e à Biomédica Andréa Júdice Pivetta, pela sua paciência em me ajudar com tantas amostras, à Técnica Administrativa Sílvia por todos os pães de queijo, muito obrigado.

Ao Instituto Ítalo Latino Americano (IILA-IT), que propiciaram bolsas de estudo auxiliando na capacitação profissional de países em desenvolvimento e a Università Degli Studi di Firenze (UNIFI-IT), por receber-nos para o estágio técnico científico na pessoa dos professores Andrea Martini e Riccardo Bozzi, pela dedicação ao nosso estágio na Itália e aos seus doutorandos Alessandro, Claudia, Francesco, Lapo e Davide muito obrigado (*grazie mille per tutti ciao*).

Aos amigos da vida, Osvaldo Cavalcante Viana (Batatinha), João Carlos (Bebinho), Wyllyam Carlos (Compadre), Luiz de Souza Filho (Lulinha), Anderson de Sousa Avelino (Batoré), Tarcísio Amaro do Nascimento (Tiririca) e Edson Geraldo de Oliveira (Arupema).

Aos amigos da primeira turma deste programa de pós-graduação, Paulo Henrique, Manoel Neto, Virgínia, Aline, Eduardo, Kelly, por superarmos juntos todas as adversidade de um programa novo.

Aos coordenadores do Programa de Reestruturação Universitária, o REUNI, que através deste obtivemos uma bolsa de estudos Auxílio à Docência na Disciplina de Introdução a Zootecnia na pessoa do Professor Nésio Antônio Moreira Teixeira de Barros.

Enfim a todas as pessoas que auxiliaram nesta caminhada que aqui não estão citadas, mas tem o seu mérito individual, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
CAPÍTULO I - REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
1. INTRODUÇÃO	15
2. LEPTINA	19
3. β -LACTOGLOBULINA	20
4. FATOR DE TRANSCRIÇÃO PITUITÁRIA PIT1	21
5. FUNDAMENTOS DA GENÉTICA DE POPULAÇÃO	21
6. CRITÉRIOS DA PRODUÇÃO LEITEIRA NACIONAL	22
7. COMPOSIÇÃO DO LEITE	23
8. QUALIDADE DO LEITE	24
9. REFERÊNCIAS	26
RESUMO	33
ABSTRACT	34
CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO E EFEITO DO GENÓTIPO DA LEPTINA, β -LACTOGLOBULINA E PIT1 SOBRE A COMPOSIÇÃO E QUALIDADE DO LEITE DE VACAS MISTIÇAS HOLANDÊS X GUZERÁ.....	35
1. INTRODUÇÃO	35
2. OBJETIVOS	40
2.1. GERAL	40
2.2. ESPECÍFICOS	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. ANIMAIS	41
3.2. SISTEMA DE PRODUÇÃO	41
3.3. AMOSTRAGEM	41
3.4. EXTRAÇÃO DO DNA	42
3.5. INTEGRIDADES DO DNA	43
3.6. ANÁLISE DE PCR-RFLP.....	43
3.7. IDENTIFICAÇÃO DO GENÓTIPO DA LEPTINA	44
3.8. IDENTIFICAÇÃO DO GENE DA β -LACTOGLOBULINA.....	45
3.9. IDENTIFICAÇÃO DO GENE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO PITUITÁRIO ESPECÍFICO (PIT1).....	45

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA GENÉTICA DE POPULAÇÃO	46
4.1. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS	46
4.2. EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG.	46
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA COMPOSIÇÃO E QUALIDADE DO LEITE ...	47
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	59
8. REFERÊNCIAS	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo de PCR para amplificação do gene da Leptina, β -lactoglobulina e PIT1.	44
Tabela 2 - Programa da PCR (35 ciclos) para fragmento gênico da Leptina, β -lactoglobulina e PIT1.....	44
Tabela 3 - Frequências alélicas e genotípicas do gene da Leptina para os grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x Guzerá	49
Tabela – 4 Frequências alélicas e genotípicas do gene da β -lactoglobulina para os grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x Guzerá	51
Tabela – 5 Frequências alélicas e genotípicas do gene da PIT1 para os grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x Guzerá	53
Tabela 6 – Resultado da análise de variância dos grupos genéticos sobre a composição e qualidade do leite.....	54
Tabela 7 – Resultado da análise de variância dos genótipos da Leptina de acordo com os grupos genéticos.	54
Tabela 8 – Resultado da análise de variância dos genótipos da leptina sobre a composição e qualidade de leite.....	55
Tabela 9 – Resultado da análise de variância dos grupos genéticos da β -lactoglobulina sobre a composição e qualidade do leite.	56
Tabela 10 – Resultado da análise de variância dos genótipos da β -lactoglobulina sobre a composição e qualidade do leite.....	57
Tabela 11 – Resultado da análise de variância dos grupos genéticos da PIT1 sobre a composição e qualidade do leite.....	58
Tabela 12 – Resultado da análise de variância dos genótipos da PIT1 sobre a composição e qualidade do leite.....	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Padrão de bandas de produto de amplificação do exon 2 do gene da leptina digerido com a enzima de restrição *Kpn2I*. Amostra 7 e 10: genótipo CC; amostras 4, 6, 9, 12 e 13: genótipo TT e amostras 1, 2, 3, 5, 8, 11: genótipo CT. 48
- Figura 2** Padrão de bandas do produto de amplificação do gene β -lactoglobulina digerido com a enzima de restrição *HaeIII*. Amostra 13: genótipo AA; amostras 2, 3, 5, 7 e 12: genótipo AB; amostras 1, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 14 e 15: genótipo BB. 50
- Figura 3** Padrão do bandas do produto de amplificação do gene da PIT1 digerido com a enzima de restrição *HinfI*. Amostras 1, 3, 5, 7, 8, 11, 12 e 13: genótipo +/+; amostras 2, 9 e 15: genótipo -/- e amostras 4, 6, 10 e 14: genótipo +/- . 52

LISTA DE ABREVIATURAS

CBT – Contagem Bacteriana Total
CCS – Contagem de Células Somáticas
CPP – Contagem Padrão em Placas
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetracético
GH – Hormônio do Crescimento
GNRH - Hormônio Liberador da Gonadotrofina
IZ – Instituto de Zootecnia
Kb – Quilo bases (mil pares de bases)
kDa – Quilo Daltons (mil Daltons)
LH – Hormônio Luteinizante
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MAS – Seleção Assistida por Marcadores
pb - Pares de Bases
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
PIT – Fator de Transcrição Pituitária
PRL – Prolactina
QTL - Locos de Caracteres Quantitativos
RAPD – Polimorfismo de DNA Amplificado Randomicamente
RFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
RPM – Rotações por Minuto
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SSR – Repetições de Sequências Simples
TBE – Tampão de Tris-Borato-EDTA
UFC – Unidade Formadora de Colônias
VNTR - Número Variável de Repetições em Tandem
 μ l – microlitros

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

Os bovinos pertencem ao gênero *Bos* (JANECEK et al.,1996), à subfamília *Bovinea* e família *Bovidae* apresentam características de importância econômica. Estes são subdivididos em duas subespécies distintas, os taurinos (*Bos taurus taurus*) e zebuínos (*Bos taurus indicos*), como o Holandês e o Guzerá, respectivamente,, muito utilizados em cruzamentos que originam diversos grupos genéticos. Esses animais mestiços possuem grande importância, pois conseguem unir as características principais das duas subespécies como, por exemplo, a rusticidade oriunda dos zebuínos e a produtividade dos taurinos. O cruzamento das raças Holandês e Guzerá ganha destaque na pecuária leiteira nacional através dos animais mestiços Holandês x Guzerá denominados Guzolandos, considerados hoje uma raça, sendo este cruzamento o objeto de nosso estudo.

Segundo Morais et al. (2008), vacas mestiças Holandês x Guzerá se adaptam muito bem às condições de altas temperatura e radiação, baixa pluviosidade e escassez de alimentos, características típicas do bioma caatinga.

Os bons níveis de produção e produtividade são os efeitos esperados para rebanhos com ganhos genéticos e adaptação comprovada ao meio ambiente, e essas características de interesse econômico estão condicionadas a determinados fenótipos que se expressam de acordo com as variações de ambiente o que dificulta a identificação dos melhores genótipos. Assim, os progressos genéticos em populações dependem de metodologias desenvolvidas com o objetivo de compreender como essas características são influenciadas pela ação dos genes envolvidos e pelos fatores não genéticos determinando o caráter métrico dessas variáveis (FALCONER e MACKAY, 1996).

Segundo Ford (1965), polimorfismos protéicos são a presença simultânea de duas ou mais formas, de modo tal que a menos frequente não pode ser mantida unicamente por mutação. Estes geralmente apresentam alelos dominantes de herança mendeliana, permitindo inferir a composição genotípica dos indivíduos a partir de seus

fenótipos e assim estimar o número de alelos em uma população e as frequências com as quais eles ocorrem.

Marcadores moleculares são pequenas regiões do DNA que apresentam polimorfismo entre indivíduos de uma mesma espécie e que podem ser relacionadas à variação fenotípica de características quantitativas de interesse econômico. Um gene pode estar em associação direta a um marcador molecular facilitando a sua identificação (HAYWARD et al., 1994). O desenvolvimento de marcadores moleculares aumenta a eficiência de seleção, já que tais marcadores podem fornecer maior quantidade de informação sobre os valores genéticos dos animais.

Até os meados dos anos 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram caracteres morfológicos, em geral, fenótipos de fácil identificação visual aos quais poderiam estar associados genes de interesse. Estes marcadores, entretanto, são limitados principalmente pelo baixo nível de polimorfismo. Com o desenvolvimento dos marcadores de proteínas e isoenzimas ampliou-se o número de marcadores genéticos. As novas tecnologias possibilitaram a localização de pontos referência nos cromossomos, denominados de marcadores moleculares (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Nos anos 80, o uso de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) de DNA e, posteriormente, com a descoberta da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), novas classes de marcadores moleculares foram desenvolvidas, tais como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*), microssatélites e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Dentre os marcadores que podem ser utilizados no mapeamento de ligação com características de produção, destacam-se os microssatélites, também denominados SSR (*Simple Sequence Repeats*), por apresentarem maior quantidade de informação genética por loco em relação aos demais marcadores, alelos codominantes e ampla distribuição por todo o genoma de organismos eucariotos (WEBER e MAY 1989).

Outra classe de marcadores genéticos, que atualmente tem recebido muita atenção, é o SNP, sigla derivada do termo em inglês *Single Nucleotide Polymorphism*. Os SNPs são caracterizados por mutações pontuais decorrentes de substituições, deleções e adições de nucleotídeos, possuem natureza bi alélica, são também muito abundantes no genoma, podendo ser encontrados em regiões expressas ou não expressas.

Desde a década de 90, a estratégia de detecção de polimorfismos genéticos associados a genes sabidamente importantes para a característica que se pretende estudar tem sido empregada com êxito. Para produção de leite, destacam-se os polimorfismos dos genes *k*-caseína e β -lactoglobulina. Segundo Bovenhuis et al. (1992), o alelo B de *k*-caseína está associado com maior concentração de proteína no leite, e o alelo B de β -lactoglobulina, com maior concentração de gordura no leite. A seleção de bovinos com genótipos BB para ambos os genes resulta em maior rendimento e em leite de maior valor econômico para a produção de queijo e laticíneos. Da mesma maneira, outros polimorfismos vêm sendo muito investigados, por exemplo, alguns SNPs nos genes leptina (MADEJA et al., 2004), calpaína (PAGE et al., 2002; CASAS et al., 2005), calpastatina (BARENDSE, 2003), fator de transcrição pituitário (RENAVILLE et al., 1997a, b), por apresentarem efeitos significativos na produção de leite, conversão alimentar, ganho de peso, maciez de carne, deposição de gordura subcutânea, entre outros.

A incorporação da informação dos marcadores moleculares na seleção de genótipos superiores é conhecida como seleção assistida por marcadores moleculares, sendo considerada uma das grandes contribuições para aumentar a eficiência da seleção nos programas de melhoramento animal. Neste contexto a seleção assistida pela análise de DNA permite verificar precocemente o potencial genético do animal, assegurando que as características de interesse daquele animal, possam ser transferidas aos seus descendentes. A possibilidade de saber se o animal é homocigoto ou heterocigoto para o gene em questão constitui importante aplicação dos marcadores moleculares na produção animal (REGITANO e COUTINHO, 2001).

A relação entre um marcador e uma característica de interesse pode ser de forma indireta, por exemplo, como na maioria dos casos em que marcadores microssatélites são relacionados a um QTL ou de forma direta como no caso dos polimorfismos em genes que codificam proteínas responsáveis por características fenotípicas de interesse, quer seja pela função da própria proteína, quer seja por sua atuação como intermediária em vias metabólicas relacionadas ao fenótipo ou ainda na forma de fator de transcrição, contribuindo para a melhor compreensão dos mecanismos regulatórios de expressão (CURI, 2004).

A necessidade crescente de melhoria da produção de leite, da adaptação dos animais às condições tropicais e da qualidade dos produtos lácteos, vem direcionando as pesquisas para atender tais demandas.

A produção animal é considerada como resultado da utilização dos recursos genéticos (raças, tipos, etc.), dos recursos ambientais e socioeconômicos disponíveis, das práticas de manejo e das possíveis interações entre esses componentes.

As diferenças genéticas existentes entre raças bovinas têm sido aproveitadas de forma a incrementar a produção animal. Isso tem sido obtido, por exemplo, pela utilização de sistemas de cruzamentos, que permitem uma flexibilidade aos sistemas de produção e a exploração dos efeitos de complementaridade e heterose.

Acompanhando o desenvolvimento tecnológico a bovinocultura leiteira passa por vários processos de mudanças estruturais como a utilização das tecnologias disponíveis como controle dos rebanhos e padronização da coleta dos dados zootécnicos, elementos indispensáveis para correta avaliação das características de importância econômica, aumentando a eficiência do valor genético dos animais e melhoramento dos programas de seleção disponíveis para o setor leiteiro, sendo necessária a união de produtores e técnicos em um objetivo comum, a obtenção de animais melhor adaptados à produção leiteira aonde os mesmos se encontrem inseridos, tendo produtos de qualidade, sustentável e ecologicamente correto quebrando paradigmas, sociais, infraestrutura física das propriedades, fatores geográficos e fatores políticos para que se obtenha o sucesso econômico da atividade (CAMPOS e ASSIS, 2005).

Aliado ao processo de melhoramento as técnicas de genética molecular, juntamente aos métodos tradicionais do melhoramento genético, possibilitam o estudo da expressão do potencial genético animal. Relacionando favoravelmente alelos de características quantitativas identificadas no cromossomo, e sua detecção, sobre o modo de ação gênica individual e suas interações, auxiliando na compreensão da variação quantitativa e sua utilização prática na produção animal contribuindo com o progresso genético da população por meio da seleção assistida por marcadores (MAS).

Corroborando, Bowden (1981) notou que a produção e a qualidade do leite de vaca são influenciadas por fatores ambientais, nutricionais, genéticos, raça, fatores fisiológicos, bem como o período de lactação. Neste contexto podemos concluir que o controle para a produção adequada dos animais se torna bastante complexo transformando o animal em uma máquina de que deve estar muito bem adaptada e nutrida para expressar sua real capacidade de produção leiteira.

Exemplo de adaptação são os animais zebus e azebuados (mestiços) que apresentam potencial produtivo e adaptativo para as condições do semiárido, podendo

ser explorados para a produção leiteira pela formação de grupos genéticos com diversos graus de sangue que conferem adaptação ao ambiente explorado e produção leiteira (RIBEIRO et al., 2009).

2. LEPTINA

A leptina é uma proteína de 16 kDa constituída por 146 aminoácidos e é sintetizada principalmente pelo tecido adiposo e após a clivagem de 21 peptídeos sinalizadores é liberado na corrente sanguínea . Com os recursos da biotecnologia, foi possível caracterizar este fator e seu gene foi clonado de ratos e de humanos (ZHANG et al., 1994).

A leptina regula o consumo alimentar, o eixo neuroendócrino e os processos imunológicos (HOUSEKNECHT e PORTO CARRERO, 1998; BARB, 1999; DINIZ, 2010). Em bovinos, o gene da leptina é composto de três exons e dois introns, o que corresponde a 18,9 kb do genoma. O primeiro e o segundo íntrons têm aproximadamente 14 e 1,7 kb, respectivamente. Em bovinos o gene da leptina apresenta esta organização exon – íntron muito preservada. Segundo Taniguchi et al. (2002), a região 5' não traduzida de aproximadamente 3 kb não foi completamente sequenciada e apresenta sítios para as proteínas intensificadoras.

Este gene é considerado forte candidato para associação com características quantitativas de interesse econômico, tais como: deposição de gordura na carcaça, precocidade sexual, porcentagem de gordura no leite, produção de leite, entre outras. Quanto ao local de expressão, sabe-se que o tecido adiposo é o principal local de síntese e secreção da leptina em bovinos, porém o gene da leptina também se expressa em outros tecidos como nos placentários e fetais, na glândula mamária, no estômago, músculos, tecido adiposo marrom, entre outros (CHILLIARD et. al., 2001).

Efeitos dos polimorfismos do gene da leptina em características relacionadas à produção de leite, balanço energético, peso vivo e fertilidade foram observados em gado leiteiro (LIEFERS et. al., 2002). Há fortes evidências da participação desse gene no início da puberdade, ocasionando restrição no crescimento e atraso na puberdade através da inibição do hormônio luteinizante (LH), devido à sensibilidade ao estradiol e ausência do indicador do hormônio liberador da gonadotrofina (GNRH). (WILLIANS et. al., 2002). Com base nos estudos realizados sobre a ação hormonal da leptina e eventos do metabolismo energético animal, as diferenças genéticas entre algumas raças

bovinas quanto aos padrões de consumo voluntário, produção de leite, ganho de peso e desempenho reprodutivo tornaram-se melhor compreendidos.

3. β -LACTOGLOBULINA

A β -lactoglobulina pertence à família das lipocalinas, possui forma de cálice, tem caráter hidrofóbico e tem grande utilidade para a indústria alimentícia (SGARBIERI, 2005). É uma proteína globular que representa 50% da proteína total do soro e 12% da proteína total do leite (FOX e MCSWEENWEY, 1998). Produzida na glândula mamária é formada por 162 resíduos de aminoácidos (HAMBLING et al., 1992; SGARBIERI, 2005; UFFO et al., 2006), apresentando peso molecular de aproximadamente 18,4 kDa (OLIVEIRA, 1999; UFFO et al., 2006; KONTOPIDIS et al., 2004).

É uma proteína que sofre com altas temperaturas, ocasionando perda de solubilidade até a exposição de regiões de associação a outras moléculas. Em temperaturas em torno de 50°C, as modificações são reversíveis, porém, acima de 65-70°C são irreversíveis (SGARBIERI, 2005). A β -lactoglobulina está correlacionada com o conteúdo de gordura e com a quantidade de proteína do leite. A β -lactoglobulina bovina corresponde de 7 a 12% do total dessas proteínas (EHRMANN et al., 1997). O alelo A está relacionado ao aumento na produção de leite, aumento do teor de proteína e redução da concentração de caseínas no leite. O alelo B está associado ao aumento da quantidade de caseínas, retenção de maior quantidade de gordura no coágulo durante o processo de produção do queijo, aumento da estabilidade térmica do leite e maior conteúdo de matéria seca nos queijos, sendo, por isso responsável por aumento no rendimento de produção de queijos industriais, como mussarela, prato e cheddar (MACHADO, 2009). Considerando diferentes raças e tipos de queijo, indivíduos BB têm rendimento em queijo de 1 a 10% maior do que indivíduos AA. Indivíduos AB para este gene possuem um rendimento intermediário na produção de queijo. Ng-Kwai-Hang et al., (1984) encontraram valores significativos para a produção de gordura e proteína de acordo com os diferentes genótipos. Animais AA para β -lactoglobulina produzem leite com 0,04% a menos de gordura e 0,05% a mais de proteína em relação a animais BB. Dependendo do uso que será dado ao leite, em caráter quantitativo, o melhor genótipo é o AA. Sendo o interesse para caráter qualitativo (sólidos no leite) os genótipos AB e BB são os mais interessantes (MACHADO, 2009).

Entretanto as diferentes formas de características desta proteína e gordura diferem entre os rebanhos o que demonstra a variabilidade genética e a necessidade de maiores estudos deste polimorfismo na expressão desta proteína e gordura, que permanecem de forma obscura.

4. FATOR DE TRANSCRIÇÃO PITUITÁRIA PIT1

O PIT1 é um fator de transcrição pituitária específico (BODBER, 1988; INGRAHAM et al., 1988). Foi inicialmente proposto por Nelson et al. (1986) como um fator de tecido específico relacionado com a antogenia da pituitária anterior. Posteriormente, estudos revelaram que a ligação da proteína restrita às linhagens celulares dos genes GH (hormônio de crescimento) e PRL (prolactina), promoveu o início da transcrição de DNA dos mesmos genes.

O gene da transcrição pituitária PIT1, pertence à família homeodomínio POU, é uma proteína com 291 aminoácidos com um domínio de transativação NH₂ terminal e um domínio POU de ligação de DNA (LI et al., 1990). É considerado o gene que codifica a proteína envolvida no desenvolvimento e crescimento dos animais, GH e PRL, além de sua ação na ativação do próprio gene da PIT1 (PARMENTIER et al., 1999). Este gene é outro candidato para marcador de produção de leite devido ao seu papel na regulação e expressão dos genes **bGH** e prolactina (MATTOS, 2004).

Efeitos de genótipos para PIT1 em características de produção de leite foram verificados em touros das raças Holstein-Friesian. Renaville et al. (1997 b) evidenciaram que o padrão da PIT1 explicou 7% da produção de leite, 13% da porcentagem de gordura, 1% da produção de gordura e 9% da proteína.

Em estudo semelhante, Mattos (2000) observou em mestiços *Bos taurus x Bos indicus* com aptidão leiteira, que o alelo da *HinfI* (-) em animais heterozigotos está associado a maior produção de leite, gordura, proteína e porcentagem de gordura no leite.

5. FUNDAMENTOS DA GENÉTICA DE POPULAÇÃO

Genética de população é uma parte da ciência que visa a investigação da dinâmica dos genes nas populações naturais, buscando elucidar os mecanismos que alteram a sua composição gênica (mutações, seleção natural e fluxo gênico de

populações migrantes) ou apenas a frequência genotípica pelo aumento da homozigose (efeito dos casamentos consanguíneos ou da subdivisão da população em grandes isolados).

Dentro de uma população, com oportunidade de acasalamento ao acaso, as frequências alélicas e genotípicas tendem a manter-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Determinados processos podem promover a alteração deste equilíbrio. A taxa de mudança nas frequências depende da taxa de migração (número de animais introduzidos) e da diferença entre as frequências entre os nativos e os migrantes (FALCONER, 1987).

O conhecimento da evolução genética de uma população é importante não só para os ajustes eventualmente necessários, mas também para avaliar o resultado do programa de seleção adotado, unindo a combinação dos melhores alelos de duas ou mais raças e a seleção dos melhores alelos dentro de uma raça ou linhagem (HALEY, 1995). A estimativa da tendência genética em uma população permite visualizar a eficiência dos procedimentos de seleção e assegurar que a pressão de seleção seja direcionada para as características de importância econômica, além de auxiliar na definição dos objetivos de seleção (WEBER et al., 2009).

Assim, a seleção assistida por marcadores atualmente representa uma das mais importantes ferramentas para o melhoramento genético de raças de animais de produção. Em vacas leiteiras criadas no semiárido brasileiro os estudos visando à identificação dos polimorfismos de genes associados às características qualitativas e quantitativas são extremamente escassos, mas podem representar um grande potencial como instrumentos da seleção animal.

6. CRITÉRIOS DA PRODUÇÃO LEITEIRA NACIONAL

No Brasil podemos observar um grande potencial para a pecuária leiteira nacional com maior incidência em pequenas e médias propriedades voltadas a agricultura de subsistência, aonde muitas vezes os critérios de higiene não são observados nem seguidos obtendo desta forma um produto de qualidade duvidosa, podendo causar sérios transtornos de qualidade ao produto e enfermidades a população.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sabendo da importância do segmento da bovinocultura leiteira do país e os riscos que a má

qualidade deste produto pode ocasionar à saúde da população, regulamentou tipos de leite A, B e C do leite pasteurizado, leite resfriado bem como as técnicas de coleta de leite *in natura* ou refrigerado e transporte a granel. A Instrução Normativa 51 (MAPA, 2002) apresenta os padrões, regras e números a serem cumpridos, e informa os técnicos e produtores quais os parâmetros a serem seguidos, na obtenção e comercialização de seus produtos *in natura* ou industrializados.

7. COMPOSIÇÃO DO LEITE

A composição do leite é um dos critérios mais antigos e frequente utilizado para pagamento diferenciado do leite. Entretanto o leite é um dos produtos primários que apresenta maior complexidade no que diz respeito ao sistema de pagamento. Essa complexidade se expressa pela falta de uniformidade e consenso no que diz respeito às formas de pagamento do produto ao produtor, com grande variação na forma e método de acerto financeiro nas diferentes regiões de um mesmo país. Sendo feitas conforme a integridade e qualidade do leite baseado em critérios dentre eles os fatores de composição teor de gordura, proteína, sólidos totais, sólidos e lactose parâmetros indicadores de qualidade da matéria-prima podendo ser influenciado até mesmo pelo volume e sazonalidade de produção.

O leite é um dos alimentos mais completos, devido a seus valores nutricionais, e energéticos a sua composição físico-química. De acordo com Harding (1995), o leite de vaca contém cerca de 87% de água, 3,9% de gordura, 3,2% de proteínas, 4,6% de lactose e 0,9% de minerais e vitaminas. As suas características físico-químicas são importantes para a determinação do valor nutritivo, o que auxilia a indústria produzir produtos lácteos com maior vida útil na prateleira. A manutenção das características sensoriais e nutritivas são requisitos cada vez mais importantes para produtores, indústrias e principalmente para o consumidor, variando segundo a individualidade, raça, alimentação, estágio de lactação, idade, temperatura ambiental, estação do ano, fatores fisiológicos (gestação, ciclo estral, etc), patológicos (mastite), persistência de lactação, tamanho da vaca, quartos mamários, porção da ordenha e intervalo entre ordenhas (COSTA et al., 1992; WEISS et al., 2002; WALDNER et al., 2011). O leite bovino possui teor de gordura semelhante ao leite humano e este também apresenta uma boa assimilação por parte do organismo, representando um importante componente nutricional (ROSENTHAL, 1991), devendo ser consumido por crianças e idosos como complemento diário na dieta.

8. QUALIDADE DO LEITE

Qualidade, palavra oriunda do latim *qualitate*, é um termo muito abrangente, mas com grande importância na avaliação do leite bovino. Para se obter leite com qualidade devem ser seguidos alguns critérios na sua classificação. Segundo Santos e Fonseca (2007), um leite com boa qualidade deve apresentar baixa contagem bacteriana, ausência de microrganismos patogênicos ao homem e ausência de resíduos de medicamentos.

Um dos métodos pelo qual o leite é avaliado é a contagem de células somáticas (CSS), que verifica no leite a presença de células de defesa ou descamação epitelial natural. Estas células de defesa são os leucócitos, células que migram pela corrente sanguínea ao úbere quando este sofre alguma agressão de forma infecciosa, como defesa natural do organismo. Estes casos provocam grandes prejuízos aos produtores devido aos gastos com medicamentos e perdas parciais da produção pois o leite oriundo destes animais (contaminado por bactérias patogênicas e resíduos de medicamento) é descartado. Deve-se respeitar o período residual dos medicamentos com os quais os animais estiverem sendo tratados, recomendado pelos laboratórios. Consequentemente, as perdas podem chegar a 50% da produção leiteira (KEOWN, 2000), além de danos à glândula mamária muitas vezes irreversíveis devido à necrose do tecido alveolar, onde fica armazenado o leite até a ordenha. Os leucócitos fagocitam e digerem os microrganismos invasores promotores da enfermidade promovendo a defesa natural do organismo e auxiliando o tratamento medicamentoso, reestabelecendo a condição sanitária adequada e retornando sua produção leiteira.

Do total de células somáticas, 75 a 98% correspondem a células de defesa e 2 a 25%, de células epiteliais, provenientes da descamação natural que ocorre no tecido de revestimento e secretor interno da glândula mamária (RIBAS, 1994).

Entretanto, alta CCS nem sempre está associada com infecções, uma vez que vários fatores podem influenciar no seu valor. Dentre os fatores que influenciam a CCS, pode se citar a idade da vaca, estações do ano, estresse, estágios de lactação, entre outros. Os estágios de lactação estão associados a variações na CCS em vacas livres de infecção na glândula mamária (SCHUTZ *et al.*, 1990; LEAVENS *et al.*, 1997), e esta influência pode ocorrer tanto no início quanto no final da lactação. No início da lactação, observa-se um acréscimo no valor da CCS devido à presença de

imunoglobulinas e conseqüentemente de células de defesa. No final da lactação, também se verifica um acréscimo na contagem de células somáticas, devido a uma maior descamação natural do epitélio da glândula mamária (HARMON e RENEAU, 1993; MONARDES, 1994). O conhecimento dos fatores que influenciam nas infecções da glândula mamária é importante para o correto diagnóstico da mastite (RIBAS, 1999).

Outra forma de avaliação da qualidade do leite é a contagem bacteriana total (CBT), parâmetro que estima o número de unidade formadora de colônias por mililitro de leite (UFC/mL). A contagem padrão em placas (CPP) é considerada o método oficial que permite a visualização de colônias bacterianas formadas em placas de Petri (MAPA, 2003). Com este método obtém-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) que mensura a contaminação que ocorreu durante a ordenha, o armazenamento e no transporte do leite, indicando quantidade de bactérias. Quanto menor a contagem, maior rigor higiênico existiu nas etapas de obtenção do leite.

Através da análise do leite determina-se a quantidade do percentual de gordura, lactose, proteína, sólidos totais e extrato seco desengordurado, componentes do valor nutritivo do leite. Salientando-se que a produção de leite depende principalmente do aporte adequado de proteína e energia na dieta da vaca em lactação, podendo a quantidade ser alterada por diversos fatores como, por exemplo: vacas mal alimentadas, vacas com mamite, falta de higiene na ordenha e refrigeração mal feita são fatores que provocam alteração na quantidade desses componentes. A alteração promove perdas irreparáveis na indústria de alimentos. O bom manejo evita tais danos e fornece um produto de qualidade com seus parâmetros conservados, com maior rendimento na fabricação dos derivados de leite e maior tempo de prateleira dos produtos, garantindo um alimento de qualidade ao consumidor final.

9. Referências

BARB, C.R. The Brain – Pituitary adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function. **Journal of Animal Science**, v, 77, p. 1249-1257, 1999.

BARENDSE, W.J. **DNA: markers for meat tenderness**. US Patent Application 20040115678, 8 Febr. 2002, 5 Nov. 2003.

BODNER, M. et al.; **The pituitary – specific transcription factor GHF – 1 is a homeobox – containing protein, 1988.**

BOVENHUIS, H; AREDONK, J.A.M.; KORVER, S. Association between milk protein polymorphism and milk production traits. **Journal Dairy Science**, v. 75, p. 2549, 1992.

BOWDEN, D.M. Feed utilization for calf production in the first lactation by 2 years-old F1 crossbred beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 51, p. 304-315, 1981.

BUCHANAN, F. C. et al. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA. **Genet. Sel. Evol.**, v. 34, p. 105-116, 2002.

CAMPOS, J.M.S.; ASSIS, A.J.; Alimentação de novilhas leiteiras. In: III simpósio mineiro de nutrição de gado de leite, 3., Belo Horizonte, 2005. **Anais ...** Belo Horizonte, 2005. . 155-176.

CASAS, E. et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal Animal Science**, v. 83, p. 13-19, 2005.

COSTA, F.M.A. et al. Variação do teor de gordura no leite bovino cru. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 5, p.763-769, 1992.

CURI, R.A. **Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaça e características de produção de bovinos**

de corte no modelo biológico superprecoce. Tese de Doutorado. (Instituto de Biociências) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

CHILLIARD, Y. et al. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p. 271-295, 2001.

DINIZ, M. J., **Efeito da Leptina e da nutrição sobre o perfil de expressão de genes hipotalâmicos de novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*) na puberdade**, Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Pirassununga, 2010.

EENENNAAM, A.V.; MEDRANO, J.F. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1730-1742, 1991.

EHRMANN, S.; BARTENSCHLAGER, H; GELDERMANN, H. Polymorphism in the 5' flanking region of the bovine-lactoglobulin-encoding gene and its association with β -lactoglobulin in the milk. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 114, p. 49-53, 1997.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 1987. 279p.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. Edinburgh : Longman Group Limited, 1996. 464p.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed., Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220p.

FORD, E. B. Polymorphism. **Biol. Rev.**, v. 20, p. 73-88, 1965.

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

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

HAMBLING, S.G.; MCALPINE, A.S.; SAWYER, L. Beta-lactoglobulina. In: FOX, P. F.. ALAONDON: **Advanced Dairy Chemistry**, v. 1, p. 141-189, 1992.

HARDING, F. **Compositional quality: milk quality**. Glasgow: Blackie Academic Professional, 1995. 165p.

HARMON, R.J.; RENEAU, J.K. **Fatores que afetam a contagem de células somáticas no leite**. Curitiba: Altech do Brasil, 1993.

HAYWARD, M.D.; MCADAM, N.J.; JONES, J.G. et al. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. **Euphytica**, v. 77, p. 269-275, 1994.

HAEGEMAN, A et al. New mutation in exon 2 of bovine leptin gene. **Anim. Genet.** v. 31, p. 79, 2000.

HOUSEKNECHT, K. L., PORTOCARRERO, C. P. Leptin and its receptors: regulators of whole – body energy homeostasis. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, p. 457-475, 1998.

INGRAHAM, H.A. et al.; A tissue – specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype, 1988.

JANECEK, L.L.; HONEYCUTT, R. L.; ADKINS, R.M. et al. Mitochondrial gene sequences and the molecular systematic of the artiodactyls subfamily bovinæ. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 6, n.1, p.107–119, 1996.

KEOWN, J.F. How to interpret the DHIA-230 Somatic Cell Count Report. Acessado em 09 de Maio de 2000. Disponível em <http://www.ianr.unl.edu/pubs/Dairy/g860.htm>.

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

LEAVENS, H. et al. Influence of parity and lactation stage on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. **J. Dairy Sci.**, Savaoy, v. 80, p. 3219-3226, 1997.

LI, S. et al. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU – domain gene Pit -1, 1990.

LIEFERS, S.C.; te PAS, M.F.W.; VEERKAMP, R.F.; VAN DER LENDE, T. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1633-1638, 2002.

MACHADO, M.A.; SILVA, R.S.; CARVALHO, M.R.; **Uso de marcadores moleculares em programas de melhoramento genético animal**. (Embrapa gado de leite. Documentos, 132) ISSN 1516-7453, 2009.

MADEJA, Z. et al. Effect of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3925–3927, 2004.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002**. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, 2002.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62 de 26 de setembro de 2003**. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário oficial da união, Brasília, Seção 1 , p. 14. 18 de setembro de 2003.

MATTOS, K.K. **Polimorfismo de DNA nos genes BGN e PIT1 em populações zebuínas e mestiças com aptidão leiteira e suas associações com características produtivas**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos/ Departamento de Genética e Evolução, 2000. 92 p. tese de doutorado.

MATTOS, K.K. Associação dos Variantes dos genes bGH e Pit-1 com Características de Produção leiteira em touros Gir Leiteiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira *Versão para impressão* ISSN 0100-204X **Pesq. Agropec. Bras.** v. 39, n. 2, 2004.

MONARDES, H. Somatic cell counting and Genetic Improvement of Resistance to Mastitis. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31, 1994, Maringá. **Anais....Maringá: UEM, 1994.** p. 1-19.

MORAIS, D.A.E.F.; MAIA, A.S.C.; SILVA, R.G.; VASCONCELOS, A.M.; LIMA, P.O.; GUILHERMINO, M.M. Variação anual do hormônio tireoidiano e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. **R. Bras.Zootec.** v. 37, n. 3, p. 538-545, 2008.

NELSON, C. et al. Discrete cis-active genomic sequences dictate the pituitary cell type – specific expression of rat prolactin and growth hormone genes. 1986.

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

OLIVEIRA, K.M.G. **Estudos de difração de raios-x a alta resolução da betalactoglobulina bovina.** 1999. 80f. Dissertação (Mestrado em Física). Instituto de Física “Gleb Wataghin”/UNICAMP, Campinas, 1999.

PAGE, B.T. et al. Evaluation of a single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 3077-3085, 2002.

PARMENTIER, I. et al.; Candidate gene markers associated with somatotrophic axis and milk selection. **Domest. Anim. Endocrinol**, v. 17, p. 139–148, 1999.

RAMSAY, T.G.; YAN, X.; MORRISON, C. The obesity gene in swine: sequence and expression of porcine leptin. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 484-90, 1998.

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

RENAVILLE, R. et al. Pit-1 gene *Hinf*I RFLP and growth traits in double-muscle Belgian Blue cattle. **Journal of Animal Science**, v. 75, p.146, 1997 a. Supplement 1.

RENAVILLE, R et al. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 3431-3438, 1997 b.

RIBAS, N.P. Análise do leite. **Revista de gado holandês**, São Paulo, v. 22, n. 18, p. 26-31, 1994.

RIBAS, N.P. Importância da contagem de células somáticas (CCS) para a saúde da glândula mamária e qualidade do leite. In: WORKSHOP SOBRE PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE, 1, 1999, Maringá. **Anais... Maringá – PR: UEM, 1999. P. 13-19.**

RIBEIRO, A.B.; TINOCO, A.F.F.; LIMA, G.F.C.; GUILHERMINO, M.M.; RANGEL, A.H.N.; Produção e composição do leite de vacas Gir e Guzerá nas diferentes ordens de parto. **Revista Caatinga** (Mossoró, Brasil), v. 22, n. 3, p. 46-51, 2009.

ROSENTHAL, I. **Milk and dairy products**. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1991. 217p.

SCHUTZ, M.M. et. al., Variation of milk, fat protein, and somatic cells for dairy cattle, **J. Dairy Sci.**, Sovoy, v. 73, p. 484-493, 1990.

SGARBIERI, V. C. Propriedades estruturais e físico químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 4356, 2005.

TANIGUCHI, Y.; ITOH, T.; YAMADA, T. et al. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. **IUBMB Life**, v. 53, p. 131-135, 2002.

UFFO, O.; MARTÍN-BURRIEL, I.; MARTINEZ, S. et al. Caracterización genética de seis proteínas lácteas em trez razas bovinas cubanas. **Animal Genetic Resources Information**, n. 39, p.15-24, 2006.

WALDNER, D.N. et al. **Managing milk composition: normal sources of variation**. Acesso em 10 março 2011. Online. Disponível na Internet <http://www.osuextra.com>.

WEBER, J.L.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 388-296, 1989.

WEBER, T.; RORATO, P.R.N.; LOPES, J.S.; COMIN, J.G.; DORNELLES, M.A.; ARAÚJO, R.O. Parâmetros genéticos e tendências genéticas e fenotípicas para características produtivas e de conformação na fase pré-desmama em uma população da raça Aberdeen Angus. **R. Bras. Zootec.**, v. 38, n. 5, p. 832-842, 2009.

WEISS, D. et al. Variable milking intervals and milk composition. **Milchwissenschaft**, v. 57, n. 5, p. 246-249, 2002.

WILLIAMS, G.L.; AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R. et al. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 339-49, 2002.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425-32, 1994.

Resumo

O objetivo do presente estudo é identificar os polimorfismos de DNA nos genes leptina, β -lactoglobulina e fator de transcrição pituitário específico, em três grupos genéticos de vacas leiteiras Holandês x Guzerá e verificar a relação entre seus genótipos com a composição e qualidade do leite de vacas leiteiras. As amostras foram coletadas em agosto de 2009, sendo 113 amostras de sangue de vacas mestiças em lactação e 58 amostras de leite. Para a análise do polimorfismo de DNA foram coletadas amostras de sangue, analisadas posteriormente no Laboratório de Genética do Instituto de Zootecnia do Estado de São Paulo. As amostras individuais de leite foram coletadas segundo os padrões estabelecidos pelo laboratório do Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) para as análises de composição e qualidade do leite. A caracterização dos genótipos foi realizada através da técnica de PCR-RFLP, em que foram utilizados primers específicos para cada gene estudado e enzimas de restrição *Kpn2I*, *HaeIII* e *HinfI*, promotoras de cortes nos genes leptina, β -lactoglobulina e PIT1, respectivamente. A frequência genotípica estimada da leptina foi CC 0,112, TT 0,225 e CT 0,661, da β -lactoglobulina foi AA 0,136, BB 0,323 e AB 0,539 e PIT1 ++ 0,655, -- 0,311 e +- 0,032. Os resultados mostram que a população se encontra em desequilíbrio de Hardy-Weinberg para a leptina, β -lactoglobulina e PIT1 devido ao excesso de heterozigotos presentes na população, entretanto, como estes genes estão associados à produção de leite, considera-se que os animais têm potencial genético para a produção leiteira nas condições do semiárido brasileiro. Através da caracterização do rebanho estudado não foram encontradas implicações referentes ao polimorfismo da leptina, β -lactoglobulina e PIT1 na composição e qualidade do leite de vacas nos grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x Guzerá.

Palavras Chave: β -Lactoglobulina, Leptina, PCR-RFLP, PIT1, Semiárido, Vacas Mestiças.

Abstract

The objective of this study was to identify DNA polymorphisms at the genes leptin, β -lactoglobulin and pituitary-specific transcription factor in three genetic groups of Holstein x Guzerat dairy cows and investigate the relationship between their genotypes and the composition and quality of milk of dairy cows. Samples were collected in August 2009, being 113 blood samples from lactating crossbred cows and 58 milk samples. For analysis of DNA polymorphisms blood samples were collected, analyzed later in the Genetic Laboratory affiliated to the Zootechny Institute of São Paulo and individual milk samples were collected according to standards established by the laboratory of Management Program of Northeast Dairy Herds (PROGEN), at Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE) for analysis of milk composition and quality. The characterization of genotypes was performed by PCR-RFLP, for which were designed specific primers for each studied gene and restriction enzymes *Kpn2I*, *HaeIII* and *HinfI* that cut the DNA of the following genes: leptin, β -lactoglobulin and a PIT, respectively. The leptin estimate genotypic frequency were CC 0.112, TT 0.225 and CT 0.661, for β -lactoglobulin were AA 0.136, AB 0.323 and BB 0.539, and for PIT were ++ 0.655, -- 0.311 and +- 0.032. The results show that the population is in Hardy-Weinberg disequilibrium for leptin, β -lactoglobulin and a PIT due to excess of heterozygotes in the population, however, as these genes are associated with the milk production it is considered that the animals have genetic potential for milk production in the Brazilian semi-arid conditions. Through the characterization of the studied herd there were not found implications of the polymorphism of leptin, β -lactoglobulin and PIT in the composition and quality of milk from cows in the different genetic groups 1/2, 3/4 and 7/8 Holstein x Guzerat.

Key words: β -lactoglobulin, crossbred cows, leptin, PCR-RFLP, PIT1, semi-arid.

Capítulo II – CARACTERIZAÇÃO E EFEITO DO GENÓTIPO DA LEPTINA, β -LACTOGLOBULINA E PIT1 SOBRE A COMPOSIÇÃO E QUALIDADE DO LEITE DE VACAS MISTIÇAS HOLANDÊS X GUZERÁ

1. INTRODUÇÃO

Os bovinos pertencem ao gênero *Bos*, (JANECEK et al.,1996), à subfamília *Bovinea* e família *Bovidae* e apresentam características de importância econômica. Estes são subdivididos em duas subespécies distintas, os taurinos (*Bos taurus taurus*) e zebuínos (*Bos taurus indicos*), como o Holandês e o Guzerá, respectivamente, muito utilizados em cruzamentos que originam diversos grupos genéticos. Esses animais mestiços possuem grande importância, pois conseguem unir as características principais das duas subespécies como, por exemplo, a rusticidade oriunda dos zebuínos e a produtividade dos taurinos. O cruzamento das raças Holandês e Guzerá ganha destaque na pecuária leiteira nacional através dos animais mestiços Holandês x Guzerá denominados Guzolando, considerados hoje uma raça, sendo este cruzamento o objeto de nosso estudo.

Segundo Morais et al. (2008), vacas mestiças Holandês x Guzerá se adaptam muito bem às condições de altas temperatura e radiação, baixa pluviosidade e escassez de alimentos, características típicas do bioma caatinga.

Os bons níveis de produção e produtividade são os efeitos esperados para rebanhos com ganhos genéticos e adaptação comprovada ao meio ambiente, e essas características de interesse econômico estão condicionadas a determinados fenótipos que se expressam de acordo com as variações de ambiente o que dificulta a identificação dos melhores genótipos. Assim, os progressos genéticos em populações dependem de metodologias desenvolvidas com o objetivo de compreender como essas características são influenciadas pela ação dos genes envolvidos e pelos fatores não genéticos determinando o caráter métrico dessas variáveis (FALCONER e MACKAY, 1996).

Os polimorfismos proteicos que, segundo Ford (1965), são a presença simultânea de duas ou mais formas, de modo tal que a menos frequente não pode ser mantida unicamente por mutação. Estes geralmente apresentam alelos dominantes de herança mendeliana, permitindo inferir a composição genotípica dos indivíduos a partir

de seus fenótipos e assim estimar o número de alelos em uma população e as frequências com as quais eles ocorrem.

Marcadores moleculares são pequenas regiões do DNA que apresentam polimorfismo entre indivíduos de uma mesma espécie e que podem ser relacionadas à variação fenotípica de características quantitativas de interesse econômico. Um gene pode estar em associação direta a um marcador molecular facilitando a sua identificação (HAYWARD et al., 1994). O desenvolvimento de marcadores moleculares aumenta a eficiência de seleção, já que tais marcadores podem fornecer maior quantidade de informação sobre os valores genéticos dos animais.

Até os meados dos anos 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram caracteres morfológicos, em geral, fenótipos de fácil identificação visual aos quais poderiam estar associados genes de interesse. Estes marcadores, entretanto, são limitados principalmente pelo baixo nível de polimorfismo. Com o desenvolvimento dos marcadores de proteínas e isoenzimas ampliou-se o número de marcadores genéticos. As novas tecnologias possibilitaram a localização de pontos referência nos cromossomos, denominados de marcadores moleculares (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Nos anos 80, o uso de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) de DNA e, posteriormente, com a descoberta da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), novas classes de marcadores moleculares foram desenvolvidas, tais como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*), microssatélites e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Dentre os marcadores que podem ser utilizados no mapeamento de ligação com características de produção, destacam-se os microssatélites, também denominados SSR (*Simple Sequence Repeats*) por apresentarem maior quantidade de informação genética por loco em relação aos demais marcadores, alelos codominantes e ampla distribuição por todo o genoma de organismos eucariotos (WEBER e MAY, 1989).

Outra classe de marcadores genéticos, que atualmente tem recebido muita atenção, é o SNP, sigla derivada do termo em inglês *Single Nucleotide Polymorphism*. Os SNPs são caracterizados por mutações pontuais decorrentes de substituições, deleções e adições de nucleotídeos, possuem natureza bi alélica, são também muito abundantes no genoma, podendo ser encontrados em regiões expressas ou não expressas.

Desde a década de 90, a estratégia de detecção de polimorfismos genéticos associados a genes sabidamente importantes para a característica que se pretende estudar tem sido empregada com êxito. Para produção de leite, destacam-se os polimorfismos dos genes *k*-caseína e β -lactoglobulina. Segundo Bovenhuis et al. (1992), o alelo B de *k*-caseína está associado com maior concentração de proteína no leite, e o alelo B de β -lactoglobulina, com maior concentração de gordura no leite. A seleção de bovinos com genótipos BB para ambos os genes resulta em maior rendimento e em leite de maior valor econômico para a produção de queijo e laticínios. Da mesma maneira, outros polimorfismos vêm sendo muito investigados, por exemplo, alguns SNPs nos genes leptina (MADEJA et al., 2004), calpaína (PAGE et al., 2002; CASAS et al., 2005), calpastatina (BARENDSE, 2003), fator de transcrição pituitário (RENAVILLE et al., 1997), por apresentarem efeitos significativos na produção de leite, conversão alimentar, ganho de peso, maciez de carne, deposição de gordura subcutânea, entre outros.

A incorporação da informação dos marcadores moleculares na seleção de genótipos superiores é conhecida como seleção assistida por marcadores moleculares, sendo considerada uma das grandes contribuições para aumentar a eficiência da seleção nos programas de melhoramento animal. Neste contexto a seleção assistida pela análise de DNA permite verificar precocemente o potencial genético do animal, assegurando que as características de interesse daquele animal, possam ser transferidas aos seus descendentes. A possibilidade de saber se o animal é homocigoto ou heterocigoto para o gene em questão constitui importante aplicação dos marcadores moleculares na produção animal (REGITANO e COUTINHO, 2001).

A relação entre um marcador e uma característica de interesse pode ser de forma indireta, por exemplo, como na maioria dos casos em que marcadores microssatélites são relacionados a um QTL) ou de forma direta como no caso dos polimorfismos em genes que codificam proteínas responsáveis por características fenotípicas de interesse, quer seja pela função da própria proteína, quer seja por sua atuação como intermediária em vias metabólicas relacionadas ao fenótipo ou ainda na forma de fator de transcrição, contribuindo para a melhor compreensão dos mecanismos regulatórios de expressão (CURI, 2004).

A necessidade crescente de melhoria da produção de leite, da adaptação dos animais às condições tropicais e da qualidade dos produtos lácteos, vem direcionando as pesquisas para atender tais demandas.

A produção animal é considerada como resultado da utilização dos recursos genéticos (raças, tipos, etc.), dos recursos ambientais e socioeconômicos disponíveis, das práticas de manejo e das possíveis interações entre esses componentes.

As diferenças genéticas existentes entre raças bovinas têm sido aproveitadas de forma a incrementar a produção animal. Isso tem sido obtido, por exemplo, pela utilização de sistemas de cruzamentos, que permitem uma flexibilidade aos sistemas de produção e a exploração dos efeitos de complementaridade e heterose.

Acompanhando o desenvolvimento tecnológico a bovinocultura leiteira passa por vários processos de mudanças estruturais como a utilização das tecnologias disponíveis como controle dos rebanhos e padronização da coleta dos dados zootécnicos, elementos indispensáveis para correta avaliação das características de importância econômica, aumentando a eficiência do valor genético dos animais e melhoramento dos programas de seleção disponíveis para o setor leiteiro, sendo necessária a união de produtores e técnicos em um objetivo comum, a obtenção de animais melhor adaptados à produção leiteira aonde os mesmos se encontrem inseridos, tendo produtos de qualidade, sustentável e ecologicamente correto quebrando paradigmas, sociais, infraestrutura física das propriedades, fatores geográficos e fatores políticos para que se obtenha o sucesso econômico da atividade (CAMPOS e ASSIS, 2005).

Aliado ao processo de melhoramento as técnicas de genética molecular, juntamente aos métodos tradicionais do melhoramento genético, possibilitam o estudo da expressão do potencial genético animal. Relacionando favoravelmente alelos de características quantitativas identificadas no cromossomo, e sua detecção, sobre o modo de ação gênica individual e suas interações, auxiliando na compreensão da variação quantitativa e sua utilização prática na produção animal contribuindo com o progresso genético da população por meio da seleção assistida por marcadores (MAS).

Corroborando, Bowden (1981) notou que a produção e a qualidade do leite de vaca são influenciadas por fatores ambientais, nutricionais, genéticos, raça, fatores fisiológicos, bem como o período de lactação. Neste contexto podemos concluir que o controle para a produção adequada dos animais se torna bastante complexo transformando o animal em uma máquina de que deve estar muito bem adaptada e nutrida para expressar sua real capacidade de produção leiteira.

Exemplo de adaptação são os animais zebus e azebuados (mestiços), que apresentam potencial produtivo e adaptativo para as condições do semiárido, podendo

ser explorados para a produção leiteira pela formação de grupos genéticos com diversos graus de sangue que conferem adaptação ao ambiente explorado e produção leiteira (RIBEIRO et al., 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Identificar os polimorfismos de DNA (Leptina, β -lactoglobulina e fator de transcrição pituitário específico - PIT1) em três grupos genéticos de vacas leiteiras Holandês x Guzerá e verificar a relação de seus genótipos com a composição e qualidade do leite de vacas leiteiras.

2.2. ESPECÍFICOS

Investigar a variabilidade genética da leptina, β -lactoglobulina e PIT1 pela técnica de PCR-RFLP em vacas leiteiras 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x Guzerá;

Estimar as frequências genótípicas e alélicas dos genes da leptina, β -lactoglobulina e PIT1 para os três grupos genéticos; 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x Guzerá;

Verificar os efeitos de genótipos e alelos na composição do leite;

Verificar os efeitos de genótipos e alelos na contagem de células somáticas e contagem bacteriana total.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Neste estudo foram coletadas amostras de sangue e leite de 113 e 58 animais respectivamente de propriedade da empresa Agropecuária Canhotinho, localizada no município de Quixeramobim, sertão central do estado do Ceará.

Essas amostras foram coletadas, em agosto de 2009, sendo que das 113 amostras de sangue de vacas mestiças em lactação, 20 animais pertencem ao grupo genético 1/2 Holandês x Guzerá, 83 animais ao 3/4 Holandês x Guzerá e 10 animais ao 7/8 Holandês x Guzerá e 58 amostras de leite sendo, 11 animais pertencem ao grupo genético 1/2 Holandês x Guzerá, 43 animais ao 3/4 Holandês x Guzerá e 04 animais ao 7/8 Holandês x Guzerá, sendo todas multíparas. A classificação dos animais nos grupos genéticos foi realizada com base em fichas genealógicas, fornecidas pela fazenda, que continham as seguintes informações: identificação do animal (nome e código da fazenda), grupo genético, data do nascimento, sexo e ordem de partições.

3.2. SISTEMAS DE PRODUÇÃO

O sistema de produção adotado pela fazenda é o sistema semi-intensivo. Durante o período da seca, em torno de 8 meses por ano, os animais são confinados em um curral coberto por sombra natural e artificial e provido de bebedouros, e comedouros onde recebem a suplementação volumosa. No período das chuvas, em torno de 4 meses, os animais ficam em piquetes de pasto natural. A suplementação concentrada é oferecida durante o ano inteiro, de acordo com a produção de leite individual, nas ordenhas que acontecem às 4:00 e às 16:00 horas, sendo do tipo ordenha mecânica, linha alta espinha de peixe. O controle leiteiro é realizado quinzenalmente.

3.3. AMOSTRAGEM

As amostras de sangue foram colhidas através de punção venosa mamária ou jugular, empregando-se tubos a vácuo contendo ácido etileno diamino tetracético (EDTA), como anticoagulante. Após a obtenção do sangue total, as amostras foram submetidas ao protocolo de estocagem de eritrócitos (LARA, 1997), cujos

procedimentos é apresentado a seguir: o sangue total foi centrifugado por 5 minutos a 3.000 rpm, para a separação do plasma e células (leucócitos e eritrócitos). O plasma foi aspirado com o auxílio de micropipeta e transferido para tubos eppendorf, devidamente identificados. As células foram lavadas, por pelo menos três vezes, em solução salina contendo 0,9% de NaCl e, em seguida, diluídas 1:1 em solução tampão citrato/fosfato, pH 7,4, contendo glicerol a 40%. As amostras plasmáticas, assim como o concentrado de leucócitos e celulares foram armazenadas em freezer a -20°C para posterior análise no Laboratório de Genética do Instituto de Zootecnia (IZ), Nova Odessa, SP.

Quanto ao leite, foram obtidas 58 amostras individuais de leite de vacas mestiças em lactação, 11 animais pertencem ao grupo genético 1/2 Holandês x Guzerá, 43 animais ao 3/4 Holandês x Guzerá e 04 animais ao 7/8 Holandês x Guzerá, sendo todas multíparas. Para análise da composição do leite foram avaliadas a contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), gordura, lactose, proteína e sólidos totais e de qualidade.

A coleta foi efetuada após a realização do pré-dipping diretamente nos recipientes apropriados, estéreis, contendo conservantes que variaram de acordo com o tipo de análise a que a amostra se destinava. O conservante Bronopol® em comprimido (bactericida) foi utilizado para as análises de composição e contagem de células somáticas, e o Azidiol® em comprimido (bacteriostático) para contagem bacteriana total.

As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmicas, com gelo reciclável e enviadas ao Laboratório do Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

3.4. EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA foi realizada empregando-se o método salino adaptado de Montgomery e Sise (1990), cujo protocolo de extração encontra-se no Anexo 2, podendo ser simplificado do seguinte modo: as amostras foram descongeladas e, em seguida, centrifugadas, para separar o manto de leucócitos, o qual foi transferido para tubos plásticos. Posteriormente, adicionou-se solução hipotônica que, através da diferença de concentração de sais entre o meio e as células, provocou a lise celular, pela entrada de água nas células. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm

por 10 minutos, o sobrenadante descartado, sendo esse processo repetido por três vezes. O sedimento foi então ressuspensionado em 500µl de solução, contendo 10 mM TRis-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 8,0), 0,5% SDS e 10 ng de proteinase K por microlitro. A suspensão foi incubada a 55⁰C por cerca de 15 horas. Após esse período, o material foi centrifugado durante 15 minutos a 12.000 rpm, em presença de NaCl 5M, para a precipitação de proteína e, o sobrenadante contendo o DNA, recuperado.

O DNA foi precipitado em etanol absoluto, lavado com etanol 70% e, depois de seco suspenso em 200µl de água ultra pura.

3.5. INTEGRIDADE DO DNA

Após a extração do DNA foram feitas análises para verificar a integridade do mesmo pelos aspectos qualitativos (observação em gel de agarose 1%) e quantitativos (leitura de espectrofotômetro). Para a quantificação em espectrofotômetro, uma alíquota de DNA foi diluída 1:100 em água ultra pura (10µl DNA em 990µl água). Com base na quantidade de DNA, as amostras foram diluídas em água para uma concentração de 40 ng/µl.

Para as análises qualitativas por eletroforese em gel de agarose 1% em Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5%, uma alíquota de 3µl de DNA foi corada com Blue Green, que permite a visualização do DNA em transiluminador para luz branca.

3.6. ANÁLISE DE PCR-RFLP

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (Eppendorf), em tubos de 200µl. Cada reação em cadeia da polimerase (PCR) foi constituída conforme a Tabela 1 e submetida ao programa de amplificação conforme a Tabela 2. A confirmação da amplificação deu-se após eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X.

Os produtos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição cujos sítios de restrição encontram-se em cada marcador. Os fragmentos resultantes foram separados em gel 10% em poliacrilamida (49:1), por eletroforese em tampão TBE 0,5X empregando-se 300 V e 40 mA, e depois corados com nitrato de prata.

Tabela 1 - Protocolo de PCR para amplificação do gene da Leptina, β -lactoglobulina e PIT1

Reagentes	Volume (μ l)
H ₂ O Ultra pura	16,9
Tampão PCR 1X (KCL 500mM, Tris-Cl pH 8,3 100 mM)	2,5
MgCl ₂ (50 μ M)	0,75
Primers (2,5 μ M)	1,5
dNTP (20 mM)	0,25
Taq polimerase (5U/ μ L)	0,1
DNA	3,0

Tabela 2 - Programa da PCR (35 ciclos) para fragmento gênico da Leptina, β -lactoglobulina e PIT1

Ciclos da PCR	Tempo	Temperatura °C
1 Desnaturação inicial	5 min	95
2 Desnaturação	45 seg	94
3 Anelamento	45 seg	52
4 Extensão	45 seg	72
(2 ao 4 se repete por 35 ciclos)	-	-
5 Extensão final	3 min	72

3.7. IDENTIFICAÇÃO DO GENÓTIPO DA LEPTINA

Para a análise do SNP305 do gene leptina (Acesso AY138588) foram utilizadas técnicas padronizadas por Lara et al. (2008) e *primers* contendo *purposeful mismatch*, segundo Buchanan et al. (2002) cujas sequências foram:

Forward: 5' ATGCGCTGTGGACCCCTGTATC3'

Reverse: 5' TGGTGTCATCCTGGACCTTCC 3'

Alíquotas de 5 µl do produto amplificado foram digeridas com 3 unidades de enzima *Kpn2I* (T[^]CCGGA), a 55°C por 6 horas. O polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) foi analisado em gel de poliacrilamida (49:1) a 10% em sistema vertical de eletroforese e corado com nitrato de prata.

3.8. IDENTIFICAÇÃO DO GENE DA β-LACTOGLOBULINA

Para o gene da β-lactoglobulina foi desenhado um par de primers, que permitiu amplificar um produto de 262pb, sendo as sequências descritas a seguir:

Forward 5'-GTCCTTGTGCTGGACACCGACTACA-3'

Reverse 5'-CAGGACACCGGCTCCTGGTATATGA-3'

A reação e o programa de amplificação que foram padronizados para a amplificação do referido fragmento, correspondentes ao gene da β-lactoglobulina estão descritos nas tabelas 1 e 2 respectivamente.

Alíquotas de 5 µl do produto amplificado foram digeridas com 2U da enzima *HaeIII*, a 37°C por 6 horas, sendo separados em gel de poliacrilamida a 10% em sistema vertical de eletroforese, corado com nitrato de prata.

3.9. IDENTIFICAÇÃO DO GENE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO PITUITÁRIO ESPECÍFICO (PIT1)

O gene PIT1 foi mapeado no cromossomo 1 bovino por MOODY et al. (1995) e desde então vem sendo bastante estudado. Para o presente estudo foram desenhados conjunto de primers, cujas sequências foram:

Forward: 5' GTGGTGAGGGTTTGGTTTTG 3'

Reverse: 5' TGGCTGGAGAAGAGAAAGGA 3'

A reação e o programa que foram padronizados para a amplificação do fragmento de 168pb correspondente à região do intron 5 ao exon 6 do gene PIT1 estão descritos nas tabelas 1 e 2 respectivamente.

Alíquotas de 5 µl do produto amplificado foram digeridas com 0,4 unidades da enzima *HinfI*, a 37°C por 6 horas, sendo separados em gel de poliacrilamida a 10% em sistema vertical de eletroforese, corado com nitrato de prata.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA GENÉTICA DE POPULAÇÃO

Para os resultados de polimorfismo foram utilizada a análise de dispersão de frequência dos alelos, que foram calculadas por meio de contagem direta, a partir do genótipo identificado na análise da PCR-RFLP. Foi utilizado o programa computacional GENEPOP Versão 1.2 (RAYMOND e ROUSSTE, 1995).

4.1 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS

As frequências genotípicas (x_{ii}) e alélicas (x_i) da amostra populacional para o fragmento gênico da Leptina, β -lactoglobulina e PIT1 foram estabelecidas pelas equações a seguir:

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

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

Onde n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados no gene i , respectivamente; n corresponde ao número total de indivíduos de acordo com Otaviano (2006).

4.2. EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

Para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizou-se a equação abaixo.

$$(A + B)^2 = A^2 + 2AB + B^2$$

Onde A^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo A; $2AB$ = frequência esperada para heterozigotos AB; B^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo B.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA COMPOSIÇÃO E QUALIDADE DO LEITE

O estudo dos efeitos dos genótipos leptina, β – lactoglobulina e PIT1 sobre a composição e qualidade do leite de vacas foi realizado através de análise de variância cujo modelo adotado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + GG_i + X_j + GG_i * X_j + \varepsilon_{ijk},$$

onde:

Y_{ijk} = Valores observados para composição (teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado) e qualidade (contagem de células somáticas (CCS) e unidades formadoras de colônias (UFC) as quais foram transformados para logaritmo decimal) referente ao grupo genético i (1/2, 3/4 e 7/8) e ao nível j de Leptina, β – lactoglobulina e PIT1 na repetição k;

μ = Média geral;

GG_i = Efeito do grupo genético i (1/2, 3/4 e 7/8);

X_j = Efeito dos polimorfismos genéticos referente ao nível j de Leptina (CC, CT e TT), β – lactoglobulina (AA, AB e BB) e PIT1 (++, +- e --);

$GG_i * X_j$ = Efeito da interação do grupo genético i e nível x de polimorfismo genético;

ε_{ijk} = Erro aleatório.

As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O polimorfismo no gene da leptina, caracterizado pela substituição do alelo C por T na posição 305 do exon 2, que resulta na substituição de arginina por cisteína (BUCHANAN et al., 2002) na proteína codificada, foi investigado com o emprego de *purposeful mismatch* no *primer* reverso. O padrão de restrição obtido após digestão com *Kpn2I* pode ser visualizado na Figura 1. O alelo C apresentou um sítio de restrição para *Kpn2I*, resultando em dois fragmentos com 75 e 19pb, os heterozigotos CT apresentam os fragmentos com 94, 75 e 19 pb enquanto o alelo T, apenas o fragmento com 94, pb por não apresentar sítio de restrição para *Kpn2I*.

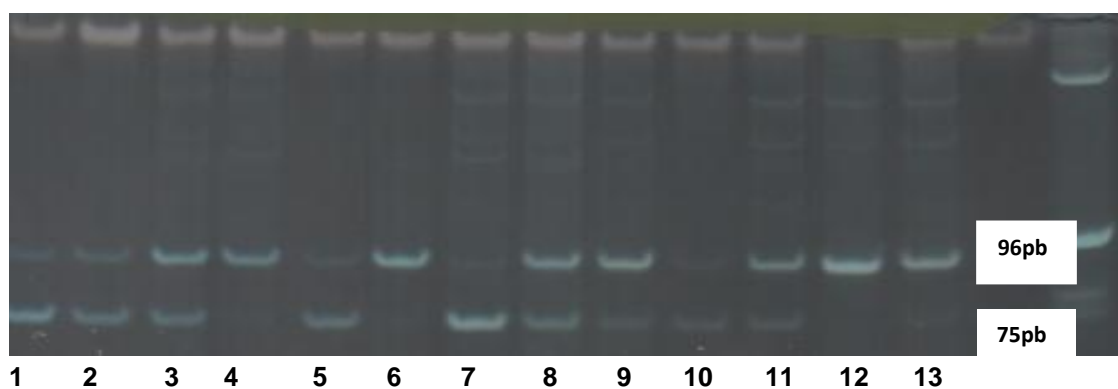


Figura 1 – Padrão de bandas do produto de amplificação do exon 2 do gene da leptina digerido com a enzima de restrição *Kpn2I*. Amostra 7 e 10: genótipo CC; amostras 4, 6, 9, 12 e 13: genótipo TT e amostras 1, 2, 3, 5, 8, 11: genótipo CT.

As frequências alélicas de C e T foram descritas, juntamente com, as frequências genotípicas para CC, CT e TT de acordo com os grupos genéticos meio sangue, três quartos e sete oitavos respectivamente na Tabela 3. Um fato relevante é a ausência de frequência no genótipo CC para o grupo genético 7/8 Holandês x Guzerá. Não se verificou diferença significativa para os resultados encontrados, demonstrando o desequilíbrio neste *locus* gênico da população pela lei de Hardy-Weinberg. Este fato pode ser justificado pela existência de fatores evolutivos que atuam sobre a população (BEIGUELMAN, 2008).

Buchanan et al. (2002) reportaram frequência do alelo T de 0,58 em bovinos Angus, 0,34 no Charolês, 0,55 no Hereford e 0,32 no Simental. Segundo Konfortov et al. (1999), provavelmente, o alelo T está presente em raças taurinas, em frequência

próximas a 0,41, não ocorrendo em raças indianas, onde o alelo C parece estar fixado. Contudo, Lara et al. (2008), estudando quatro raças européias especializadas para corte, uma nativa brasileira e três raças zebuínas, verificaram que o alelo T ocorreu em frequências superiores em raças taurinas em relação às zebuínas, variando de 0,0937 (Guzerá) a 0,5610 (Aberdeen Angus). Com base nestes dados apontados, os resultados obtidos no presente estudo sugerem a predominância de genes taurinos na população mestiça investigada (Guzerá x Holandês), uma vez que a frequência de T foi similar às estimadas em raças européias.

Tabela 3 – Frequências alélicas e genotípicas do gene da Leptina para os grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x Guzerá.

Grupo Genético	LEPTINA				
	Frequências Alélicas		Frequências Genotípicas		
	C	T	CC	CT	TT
1/2 Holandês x Guzerá	0,5667	0,4333	0,1500	0,0500	0,8000
3/4 Holandês x Guzerá	0,4478	0,5222	0,0843	0,7470	0,1687
7/8 Holandês x Guzerá	0,2143	0,7857	0	0,4000	0,6000
População Total	0,4435	0,5565	0,1129	0,6613	0,2258

Alguns estudos vêm associando alguns polimorfismos do gene leptina com características de produção de leite. Liefers et al. (2002), estudando novilhas encontraram efeito de substituição dos aminoácidos Alanina por Valina (HAEGEMAN et al. (2000) em características de balanço energético, produção de leite, peso vivo e fertilidade. Cita-se ainda o estudo de Madeja et al. (2004), que encontrou efeitos significativos ($P < 0,01$) do genótipo TT (polimorfismo *HphI*) no valor genético de algumas características como produção de leite, percentagem de gordura e proteína.

Para o gene da β -lactoglobulina a digestão do fragmento obtido pela técnica PCR-RFLP apresentou um polimorfismo de restrição para a enzima *HaeIII*. O padrão de bandas referente à três genótipos encontrados, com tamanhos distintos, que são: AA 153 e 109 pb, AB 153, 109, 79 e 74 pb e BB 109, 79 e 74pb, foram digeridos pela enzima de restrição demonstrando a sua eficiência de restrição, apresentados na Figura 2.

A frequência genotípica e alélica do gene da β -lactoglobulina bem como os grupos genéticos estudados estão descritos na Tabela 4. Os resultados encontrados

corroboram com a literatura consultada, observando a presença de três genótipos (AA, AB e BB). Que segundo Rodrigues (2006), através do seu trabalho ao associar o polimorfismo do gene da β -lactoglobulina com produção de leite de animais da raça Girolando F1, encontrou a predominância do genótipo AB (57,14%), em relação ao genótipo BB (35,71%) e AA (7,14%), encontrando frequência alélica de 64 e 36% para A e B, respectivamente. Todavia os resultados encontrados por Freitas (2010) apresentam discordância com os demais encontrados na literatura por não ter sido identificado genótipos (AA e BB) em rebanho Holando-Gir no estado de Pernambuco, apenas encontrando heterozigotos (AB), podendo ser justificado pela força de seleção empregada no rebanho estudado, pois não se encontram os genótipos homozigotos, AA e BB, que se esperavam encontrar segundo Giannoni e Giannoni (1983).

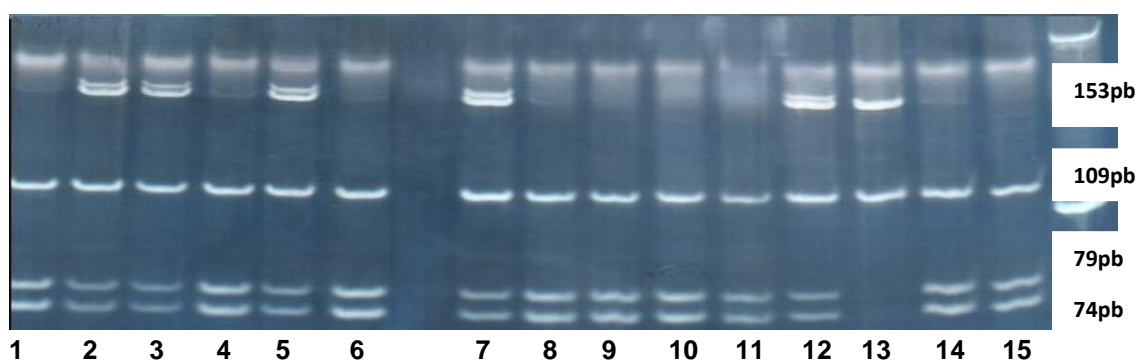


Figura 2 – Padrão de bandas do produto de amplificação do gene β -lactoglobulina digerido com a enzima de restrição *HaeIII*. Amostra 13: genótipo AA; amostras 2, 3, 5, 7 e 12: genótipo AB; amostras 1, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 14 e 15: genótipo BB.

Eenennaam e Medrano (1991) estudaram o mesmo polimorfismo genético, também em taurinos, e detectaram o maior percentual de animais heterozigotos, além de frequências alélicas de 43 e 57% para os alelos A e B, respectivamente.

As frequências observadas no trabalho de Sabour et al. (1993) ao estudarem o polimorfismo da β -lactoglobulina mostram maior frequência do genótipo AB em animais da raça Holandesa (42%), Ayrshire (49%) e Jersey (45%), em relação aos genótipos AA e BB.

Otaviano (2006) estudou o polimorfismo genético da beta, kappa e alfa1 caseína da espécie bubalina e de várias raças bovinas (Girolando, Gir, Guzerá, Jersey,

Holandesa e Pardo-suíço) no Brasil. Ele também observou 100% de heterozigose (A1A2) para as raças Gir, Pardo-suíço e Guzerá para o gene da beta-caseína. O mesmo autor, em relação à Girolando, detectou a presença dos genótipos A1A2 (33%) e A2A2 (67%), não encontrando o genótipo homozigoto A1A1 para o mesmo marcador genético.

O advento dos marcadores moleculares permitiu um acesso abrangente às pesquisas o que traz uma ressalva a gama de resultados controversos em relação às frequências encontradas nos alelos da β -lactoglobulina e a influência destes marcadores no comportamento das características de seleção voltadas a produção de animais com características de interesse econômico.

Tais características podem variar conforme a raça, localização geográfica bem como as técnicas utilizadas de inseminação artificial, que propicia germoplasma desejado possa ser conservado, transportado e distribuído ao redor do mundo (KEMENES, 1996). No entanto, a manutenção do equilíbrio em uma população é normalmente depende mais do balanço entre migração, seleção e mutação, do que da ausência destes fatores (KEMENES, 1996).

Conforme os resultados obtidos, considerando as frequências genótípicas e alélicas indicadas na amostra da população estudada Holandês-Guzerá em todos os seus grupos genéticos, não se encontra em equilíbrio pela lei de Hardy-Weinberg demonstrando que o programa de seleção adotado há tendência para a formação de animais voltados para a produção leiteira.

Tabela 4 – Frequências alélicas e genótípicas do gene da β -lactoglobulina para os grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 Holândes x Guzerá

Grupo Genético	β -Lactoglobulina				
	Frequências Alélicas		Frequências Genótípicas		
	A	B	AA	AB	BB
1/2 Holandês x Guzerá	0,3947	0,6053	0,1052	0,5790	0,3158
3/4 Holandês x Guzerá	0,3910	0,6090	0,1282	0,5256	0,3462
7/8 Holandês x Guzerá	0,5000	0,5000	0,3333	0,3334	0,3333
População Total	0,4065	0,5935	0,1366	0,5397	0,3237

A identificação dos alelos (+) e (-) no *locus* PIT1 foi realizada utilizando um fragmento de 168pb amplificados pela técnica PCR-RFLP, com a digestão de fragmento gênico com a enzima de restrição *Hinfl*.

As amostras produziram um padrão de bandas geradas por três genótipos, de tamanhos distintos em cada genótipo, $+/+$ 96 e 76pb, $+/-$ 168, 96 e 76pb e $-/-$ 168pb, após a digestão pela endonuclease *HinfI* utilizada. Os dados referentes estão presentes na Figura 3 contendo os padrões das amostras, sendo separada em gel de poliacrilamida a 10% em sistema vertical de eletroforese, corado com nitrato de prata para posterior leitura dos alelos presentes no gel.

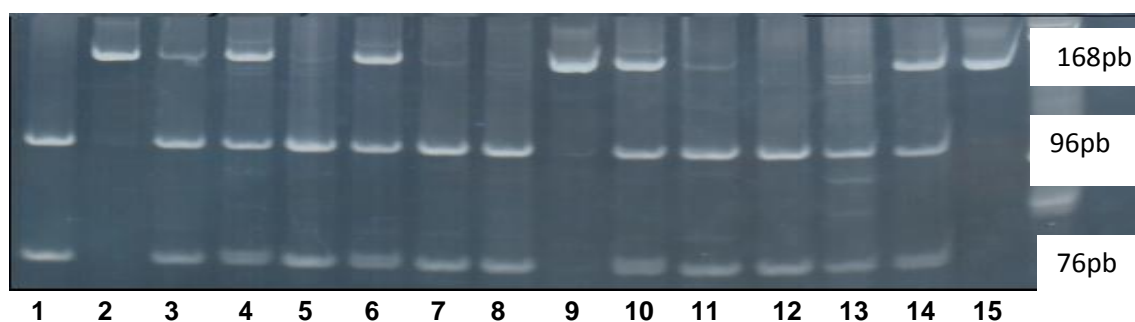


Figura 3 – Padrão de bandas do produto de amplificação do gene da PIT1 digerido com a enzima de restrição *HinfI*. Amostras 1, 3, 5, 7, 8, 11, 12 e 13: genótipo $+/+$; amostras 2, 9 e 15: genótipo $-/-$ e amostras 4, 6, 10 e 14: genótipo $+/-$.

As frequências alélicas e genótípicas no *locus* PIT1 foram estimadas para cada grupo genético e seus valores estão demonstrados na Tabela 5. As diferenças observadas entre os três grupos genéticos foram analisadas pelo programa operacional GENEPOP (1998). Os valores obtidos demonstram a não significância dos resultados encontrados neste estudo as características em questão.

Diferenças na distribuição de frequências alélicas podem indicar diferenças genéticas na população inicial constituinte do rebanho. Os animais de ambos os grupos genéticos vêm sofrendo seleção absorvente durante vários anos, sendo os animais dos grupos 3/4 e 7/8 Holandês x Guzerá de genética superior e animais 1/2 Holandês x Guzerá. O grupo de animais que deu início o processo seletivo poderia prejudicá-lo, podendo este fator ter contribuído para o resultado do nosso estudo aonde não se teve significância, como preconizado por outros autores como Mattos (2000) que encontrou frequências para alelos (-) de 0,05 e 0,19 em touros da raça Gir e em mestiços, respectivamente.

Os valores de probabilidade para o teste de equilíbrio dentro de cada grupo genético foram estimados pelas leituras de frequências dos genótipos demonstrando-se

em desequilíbrio de Hardy–Weinberg nos três grupos estudados, podendo ser decorrente da seleção feita na propriedade onde os touros utilizados no programa têm *locus* com características genéticas seletivas, ligada a PIT1.

Entretanto, observa-se que a população apresenta baixo índice do homozigot(--), e heterozigoto (+-), o que pode ser explicado pelo pequeno número considerado nas análises, principalmente no que se refere ao (GG3). Se fazendo necessário novos testes nessa população, levando em conta a quantidade de animais, proporcionando maior confiabilidade nos resultados encontrados no polimorfismo sobre a produção dos animais.

Uma das formas de correção deste processo seletivo é a utilização de touros heterozigotos com genótipos comprovados, possibilitando suas associações entre os genótipos PIT1 e as características de produção. Por outro lado, a mutação que caracteriza o polimorfismo da PIT1 é neutra, não alterando o aminoácido na sequência da cadeia polipeptídica da proteína, caracterizando, uma mutação silenciosa.

Segundo Carrijo (2004), através dos resultados encontrados em seu trabalho sugere-se que as altas taxas do alelo *HinfI* (+) estão associadas a um *locus* com alguma vantagem adaptativa, a uma distância suficiente para não gerar recombinação entre eles. Considera-se o alelo *HinfI* (+) como selvagem, em que a mutação tenha surgido como um evento raro.

Renaville et al. (1997) evidenciaram efeito superior do alelo *HinfI* (-) para a produção de leite e de proteína. Resultados semelhantes foram encontrados por Parmentier et al. (1999) mostrando associação entre os alelo *HinfI* (-) e a produção de leite e proteína em animais da raça Holandesa. Mattos (2000) demonstrou a superioridade do genótipo (- -) do gene PIT1, em que o genótipo esteve associado com maior produção de leite, gordura, proteína e quanto à percentagem de gordura no leite em animais mestiços com aptidão leiteira.

Tabela 5 – Frequências alélicas e genotípicas do gene da PIT1 para os grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x Guzerá

Grupo Genético	PIT1				
	Frequências Alélicas		Frequências Genotípicas		
	(+)	(-)	(++)	(+-)	(--)
1/2 Holandês x Guzerá	0,9500	0,0500	0,9000	0,1000	0
3/4 Holandês x Guzerá	0,7941	0,2059	0,6471	0,2941	0,0588
7/8 Holandês x Guzerá	0,7857	0,2143	0,5714	0,4286	0,0000
População Total	0,8118	0,1882	0,6559	0,3118	0,0323

A Tabela 6 mostra os resultados das análises de variância dos grupos genéticos sobre a composição e qualidade do leite para dos grupos genéticos. Não houve diferença estatística entre a composição e qualidade do leite e os grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x Guzerá.

Tabela 6 - Resultado da análise de variância dos grupos genéticos sobre a composição e qualidade do leite

Variável de qualidade e composição	Médias dos grupos genéticos		
	1/2 Holandês x Guzerá	3/4 Holandês x Guzerá	7/8 Holandês x Guzerá
Gordura	1,921 a*	1,153 a	1,378 a
Proteína	3,291 a	3,400 a	3,047 a
Extrato Seco Desengordurado	8,230 a	8,353 a	8,453 a
Contagem de células somáticas	NE*	2,764 a	NE*
Unidade Formadora de Colônias	1,697 a	1,484 a	1,605 a

*Em uma mesma linha, médias seguidas de letras iguais não diferem, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

A Tabela 7 apresenta os resultados da análise dos genótipos da Leptina de acordo com os grupos genéticos. Observou-se maior frequência do genótipo CC para os animais do grupo 1/2 holandês x guzerá e dos genótipos CT e TT para o grupo 3/4 Holandês x Guzerá. Em relação ao genótipo TT, este não foi encontrado nos animais do grupo genético 1/2 e 7/8 Holandês x Guzerá.

Tabela 7 - Resultado da análise de variância dos genótipos da Leptina de acordo com os grupos genéticos.

Genótipos da Leptina	Médias dos grupos genéticos		
	1/2 Holandês x Guzerá	3/4 Holandês x Guzerá	7/8 Holandês x Guzerá
CC	14,210 A a	9,480 B a	-
CT	10,328 A b	9,927 A a	10,430 A a
TT	-	9,523 A a	9,045 A a

*Em uma mesma linha, médias seguidas de letras iguais não diferem, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

A Tabela 8 mostra os resultados das análises de variância, dos genótipos da leptina sobre a composição e qualidade de leite. Não houve diferença estatística entre os genótipos de leptina e composição do leite em relação aos teores de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado. Esse resultado corrobora com o de Campos (2005) que também não encontrou esse efeito na composição do leite sugerindo que a leptina é parte ativa da regulação da lactação (REIST et al., 2003; FEUERMANN, 2004) estando associada ao balanço energético negativo, variando a condição corporal do animal e composição do leite produzido.

Também não houve diferença estatística em relação à qualidade do leite para contagem de células somáticas e unidades formadoras de colônia.

Tabela 8 - Resultado da análise de variância dos genótipos da leptina sobre a composição e qualidade do leite

Variável de qualidade e composição	Médias dos genótipos da Leptina		
	CC	CT	TT
Gordura	1,255 a*	1,587 a	1,142 a
Proteína	2,985 a	3,180 a	3,037 a
Extrato Seco Desengordurado	8,340 a	8,449 a	8,19 a
Contagem de células somáticas	NE*	2,670 a	NE*
Unidade Formadora de Colônias	1,689 a	1,534 a	1,889 a

*Em uma mesma linha, médias seguidas de letras iguais não diferem, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

NE* quantidade de dados não estimado pela estatística.

Os resultados da análise de variância dos genótipos da β -lactoglobulina de acordo com os grupos genéticos não foram estimados pela estatística.

A Tabela 9 mostra os resultados da análise de variância dos grupos genéticos da β -lactoglobulina sobre a composição e qualidade do leite. Não houve diferença significativa entre a composição e qualidade do leite em relação aos genótipos.

Tabela 9 - Resultado da análise de variância dos grupos genéticos da β -lactoglobulina sobre a composição e qualidade do leite

Variáveis de qualidade e composição	Médias dos grupos genéticos		
	1/2 Holandês x Guzerá	3/4 Holandês x Guzerá	7/8 Holandês x Guzerá
Gordura	1,921 a	1,322 a	0,940 a
Proteína	3,291 a	3,055 a	3,190 a
Lactose	3,995 a	4,343 a	4,430 a
Extrato Seco Desengordurado	8,230 a	8,310 a	8,51 a
Contagem de Células Somáticas	2,666 a	2,616 a	2,143 a
Unidade Formadora de Colônias	1696 a	1,680 a	1,462 a

*Em uma mesma linha, médias seguidas de letras iguais não diferem, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

A Tabela 10 mostra resultados da análise de variância dos genótipos da β -lactoglobulina sobre a composição e qualidade do leite. Os resultados mostram que não houve diferença estatística das variáveis de gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado, contagem de células somáticas e unidade formadora de colônias para os genótipos AA, AB e BB da β -lactoglobulina.

Tabela 10 - Resultado da análise de variância dos genótipos da β – lactoglobulina sobre a composição e qualidade do leite

Variáveis de qualidade e composição	Médias dos genótipos		
	AA	AB	BB
Gordura	1,825 a	1,308 a	1,556 a
Proteína	3,190 a	3,041 a	3,191 a
Lactose	4,010 a	4,360 a	4,191 a
Extrato Seco Desengordurado	8,050 a	8,316 a	8,313 a
Contagem Células Somáticas	2,573 a	2,661 a	2,540 a
Unidade Formadora de Colônias	1,053 a	1,712 a	1,727 a

*Em uma mesma linha, médias seguidas de letras iguais não diferem, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

A Tabela 11 mostra o resultado da análise de variância dos grupos genético PIT1 para as variáveis de composição e qualidade do leite. Não houve diferença estatística para as variáveis de gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado, contagem de células somáticas e unidade formadora de colônias para os grupos genéticos do gene +/+, +/- e -/- da PIT1.

O resultado da análise de variância dos genótipos da PIT1 de acordo com os grupos genéticos não foram estimados pela estatística.

A Tabela 12 mostra o resultado da análise de variância dos genótipos da PIT1 sobre a composição e qualidade do leite. Não houve diferença estatística para as variáveis de gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado, contagem de células somáticas e unidade formadora de colônias para os grupos genéticos do gene +/+, +/- e -/- da PIT1, entretanto, devemos chamar a atenção a ausência do genótipo -/- para a PIT1.

Tabela 11 - Resultado da análise de variância dos grupos genéticos da PIT 1 sobre a composição e qualidade do leite

Variáveis de qualidade e composição	Médias dos grupos genéticos		
	1/2 Guzerá x Holandês	3/4 Guzerá x Holandês	7/8 Guzerá x Holandês
Gordura	2,026 a	1,327 a	0,790 a
Proteína	3,273 a	3,043 a	3,215 a
Lactose	3,925 a	4,370 a	4,185 a
Extrato Seco Desengordurado	8,143 a	8,330 a	8,255 a
Contagem de Células Somáticas	2,605 a	2,558 a	1,310 a
Unidade Formadora de Colônias	1,673 a	1,618 a	1,153 a

*Em uma mesma linha, médias seguidas de letras iguais não diferem, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

Tabela 12 - Resultado da análise de variância dos genótipos da PIT1 sobre a composição e qualidade do leite

Variáveis de qualidade e composição	Médias dos genótipos		
	+/+	+/-	-/-
Gordura	1,562 a	0,953	-
Proteína	3,133 a	2,967 a	-
Lactose	4,288 a	4,258 a	-
Extrato Seco Desengordurado	8,348 a	8,112 a	-
Contagem Células Somáticas	2,580 a	2,206 a	-
Unidade Formadora de Colônias	1,685 a	1,329 a	-

*Em uma mesma linha, médias seguidas de letras iguais não diferem, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

7. Conclusões

Não foi encontrada diferença significativa do polimorfismo da leptina, β -lactoglobulina e PIT1 em relação à composição e qualidade do leite de vacas, em seus diversos grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x Guzerá.

8. Referências

- BARENDSE, W.J. **DNA: markers for meat tenderness**. US Patent Application 20040115678, 8 Febr. 2002, 5 Nov. 2003.
- BEIGUELMAN, B. **Genética de populações humanas**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 239p.
- BOVENHUIS, H; AREDONK, J.A.M.; KORVER, S. Association between milk protein polymorphism and milk production traits. **Journal Dairy Science**, v. 75, p. 2549, 1992.
- BOWDEN, D.M. Feed utilization for calf production in the first lactation by 2 years-old f1 crossbred beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 51, p. 304-315, 1981.
- BUCHANAN, F. C. et al. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA. **Genet. Sel. Evol.**, v. 34, p. 105-116, 2002.
- CAMPOS, J.M.S.; ASSIS, A.J. Alimentação de novilhas leiteiras. In: III Simpósio Mineiro de Nutrição de Gado de Leite, 3., Belo Horizonte, 2005. **Anais ...** Belo Horizonte, 2005. p. 155-176.
- CARRIJO, S.M. **Associação do polimorfismo *HinfI* do gene da PIT1 com características de produção de carne em bovinos da raça Canchim**. Tese de doutorado. (Ciências Biológicas), área de concentração: Genética e evolução. Universidade Federal de São Carlos, 2004.
- CASAS, E. et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal Animal Science**, v. 83, p. 13-19, 2005.
- CURI, R.A. **Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaça e características de produção de bovinos de corte no modelo biológico superprecoce**. Tese de Doutorado. (Instituto de Biociências) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

EENENNAAM, A.V.; MEDRANO, J.F. Milk protein polymorphisms in califórnia dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1730-1742, 1991.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. Edinburgh : Longman Group Limited, 1996. 464p.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed., Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220p.

FEUERMANN, Y., MABJEESH, S.J. e SHAMAY, A. Leptin affects prolactin action on milk protein and fat synthesis in the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**.v. 87, p. 2941-2946, 2004.

FORD, E. B. Polymorphism. **Biol. Rev.**, v. 20, p. 73-88, 1965.

FREITAS, S.F.A. **Estudo do polimorfismo genético da beta-lactoglobulina em bovinos holando-gir no estado de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia, Recife, 2010.

GIANNONI, M.A.; GIANNONI, M.L. G. **Genética e melhoramento de rebanhos nos trópicos**. São Paulo: Nobel, 1983. 463p.

HAEGEMAN, A et al. New mutation in exon 2 of bovine leptin gene. **Anim. Genet.** v. 31, p. 79. 2000.

HAYWARD, M.D.; MCADAM, N.J.; JONES, J.G. et al. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. **Euphytica**, v. 77, p. 269-275, 1994.

JANECEK, L.L.; HONEYCUTT, R. L.; ADKINS, R.M. et al. Mitochondrial gene sequences and the molecular systematic of the artiodactyls subfamily bovinæ. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 6, n.1, p.107–119, 1996.

KEMENES, P.A. **Qualidade das frequências dos alelos A e B dos genes de kappa-caseína e beta-lactoglobulina em algumas raças bovinas**. Piracicaba, 1996. 85p. (Dissertação. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo).

KONFORTOV, B.A., LICENCE, V.E., MILLER, J. R., Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. **Mamm. Genome**, v.10, p. 1142-1145, 1999.

LARA, M.A.C.; GUARAGNA, G.P.; HEICHERT, R.H. et al. Investigação da variabilidade genética do rebanho Mantiqueira através de polimorfismos protéicos. I Caracterização genética e estudos comparativos.. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 54, n. 1, p. 1-12, 1997.

LARA, M.A.C.; FIORINI, L.C.; RESENDE, F.D. et al.. Polimorfismo no exon 2 do gene leptina pela técnica de PCR/RFLP em bovinos. CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54, Salvador, 2008. **Anais ...Salvador: SBG**, 2008.

LIEFERS, S.C.; te PAS, M.F.W.; VEERKAMP, R.F.; VAN DER LENDE, T. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1633-1638, 2002.

MADEJA, Z. et al. Effect of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3925–3927, 2004.

MATTOS, K.K. **Polimorfismo de DNA nos genes BGN e PIT1 em populações zebuínas e mestiças com aptidão leiteira e suas associações com características produtivas**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos/ Departamento de Genética e Evolução, 2000.92 p. tese de doutorado.

MONTGOMERY, G.W.; SISE, J.A. Extraction of DNA from sheep White blood cells. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 33, p. 437-441, 1990.

MOODY, D. E. et al. Restriction fragment length polymorphism in amplifications products of the bovine PIT1 GENE AND ASSIGNMENT of PIT1 to bovine chromosome 1. **Anim. Sci.**, v. 74, p. 1784-1793,1995.

MORAIS, D.A.E.F.; MAIA, A.S.C.; SILVA, R.G.; VASCONCELOS, A.M.; LIMA, P.O.; GUILHERMINO, M.M. Variação anual do hormônio tireoidiano e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. **R. Bras.Zootec.** v. 37, n. 3, p. 538-545, 2008.

OTAVIANO, A.R. **Polimorfismo dos genes das caseínas e sua utilização na detecção de misturas de leite bovino e bubalino.** 2006. 97f. Tese (doutorado em produção Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal / UNESP, São Paulo. 2006.

PAGE, B.T. et al. Evaluation of a single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 3077-3085, 2002.

PARMENTIER, I. et al.; Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 17, p. 139 – 148, 1999.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (versão 1.2): A population genetics software for exact tests and ecumeinism. **J. Hered.**, v. 86, p. 248-249,1995.

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

REIST, M. et al. Postpartum reproductive function: association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cows. **Theriogenology.** v. 59, n. 1, p. 1707-1723, 2003.

RENAVILLE, R. et al. Pit-1 gene *HinfI* RFLP and growth traits in double-muscled Belgian Blue cattle. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 146, 1997. Supplement 1.

RIBEIRO, A.B.; TINOCO, A.F.F.; LIMA, G.F.C.; Guilhermino, M.M.; RANGEL, A.H.N.; Produção e composição do leite de vacas Gir e Guzerá nas diferentes ordens de parto. **Revista Caatinga** (Mossoró, Brasil), v. 22, n. 3, p. 46-51, 2009.

RODRIGUES, S. G. **Estudo das frequências dos alelos A e B dos genes da kappa-caseína e β -lactoglobulina e suas associações com produção de leite em bovinos F1 Girolando**. 2006. 27f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

SABOUR, M. P.; LIN, C.Y.; KEOUGH, A. Effects of selection practiced on the frequencies of k-casein and β -Lactoglobulin genotypes in Canadian artificial insemination Bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 274-280, 1993.

WEBER, J.L.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 388-296, 1989.