



47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia Brasileira de Vanguarda



27 a 30 de julho de 2010
Salvador - BA

Frequência do polimorfismo do gene *CSN3* em animais da raça Girolando^{1,2}

Daisyléa de Souza Paiva³, Larissa Helena da Rocha Meira⁴, Tatiane Ribeiro de Siqueira⁵, Raquel Marinho Alvino⁴, Isabela Fonseca⁶, Alexandre Rodrigues Caetano⁷, Samuel Rezende Paiva⁷, Wagner Arbex⁸, Marta Fonseca Martins Guimarães⁸, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva⁸

¹Parte do trabalho financiado pela FAPEMIG.

²Projeto Financiado pela Embrapa.

³Graduanda do Curso de Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora Estagiária Embrapa. e-mail: daisyuff@gmail.com

⁴Graduanda do curso de Biomedicina Universidade Presidente Antônio Carlos/Juiz de Fora, MG. e-mail: laribiomedica@gmail.com, raquelmabiomed@yahoo.com.br

⁵Graduanda do Curso de Biologia - Centro de Ensino Superior /Juiz de Fora, MG. e-mail: tatirsiqueira@yahoo.com.br

⁶Bolsista de Apoio Técnico à Pesquisa - BAT II - FAPEMIG. e-mail: isabela_fonseca@yahoo.com.br

⁷Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. e-mail: acaetano@cenargen.embrapa.br, samuel@cenargen.embrapa.br

⁸Embrapa Gado de Leite. e-mail: arbex@cnpgl.embrapa.br, mmartins@cnpgl.embrapa.br, marcos@cnpgl.embrapa.br

Resumo: A *kappa*-caseína (κ -CN) é uma proteína constituinte do leite bovino e representa aproximadamente 12% das proteínas do leite secretadas pelas células da glândula mamária. O gene da κ -CN (*CSN3*) tem sido amplamente estudado devido à sua influência sobre as propriedades do leite e vários polimorfismos têm sido identificados. O alelo B foi associado com resistência térmica, diminuição no tempo de coagulação e micelas de tamanhos diferentes, preferíveis para fabricação de queijo. Neste trabalho foram genotipados 424 animais da raça Girolando. O DNA das vacas e touros foi extraído e amplificado pela técnica PCR. Para estabelecimento do genótipo, o produto foi digerido pela enzima de restrição *Hinf* I. A frequência dos genótipos AA, AB e BB foi de 69,34%, 27,59% e 3,07%, respectivamente, e a frequência dos alelos A foi de 83% e a do alelo B foi de 17%. A população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,01$).

Palavras-chave: características de produção de leite, *Kappa*-caseína, melhoramento animal, proteínas do leite

Incidence of *CSN3* gene polymorphism in animals Girolando

Abstract: κ -casein (κ -CN) is a constituent of bovine milk and represents approximately 12% of milk proteins secreted by mammary gland cells. The κ -CN gene (*CSN3*) has been widely studied because their influence on the properties of milk production and several polymorphisms have been identified. The B allele was associated with heat resistance, decrease in clotting time and different sizes of micelles, preferred for the manufacture of cheese. It was genotyped 424 Girolando animals. The cows and bulls DNA was extracted and amplified by PCR technique. To establish the genotype, the PCR product was digested by the restriction enzyme *Hinf* I. The frequency of genotypes AA, AB and BB was, respectively 69.34%, 27.59% and 3.07% and the frequency of allele A was 83% and the allele B was 17%. Thus, the population is in Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 0.01$).

Keywords: animal breeding, *kappa*-casein, milk production traits, milk proteins

Introdução

Caseínas são proteínas do leite secretadas pelas células da glândula mamária. Elas constituem cerca de 78 a 82% das proteínas do leite bovino e estão subdivididas em quatro grupos principais: α S1-caseína, α S2-caseína, β -caseína, e κ -caseína. Essas proteínas e suas variantes genéticas têm sido amplamente estudadas e descritas como sendo um importante fator associado com o desempenho da lactação, composição do leite e eficiência na produção de queijo e outros derivados lácteos (Azevedo et al., 2008).

A proteína κ -caseína representa aproximadamente 12% da caseína total. O gene da *kappa*-caseína (*CSN3*) está localizado na posição 6q31 do cromossomo 6 de bovinos (BTA6), correspondendo a aproximadamente 13 kb, sendo que a proteína possui 169 aminoácidos (Barroso et al., 1998). Essa



47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia Brasileira de Vanguarda



27 a 30 de julho de 2010
Salvador - BA

proteína desempenha um papel importante nas interações físico-químicas do leite, fornecendo estabilidade coloidal à micela da caseína. Na micela, a maior parte da κ -caseína está localizada na periferia, e, a sua porção C-terminal hidrofílica projeta-se no solvente. Este gene tem sido amplamente estudado devido à sua influência sobre as propriedades do leite (Rachagani & Gupta, 2008).

Até o momento, nove variantes de κ -caseína têm sido descritas: A, B, C, E, F, G, H, I, e A1, sendo A e B as mais frequentes. Elas diferem entre os aminoácidos 136 e 148. Na posição 136 de treonina para isoleucina, enquanto na posição 148, o ácido aspártico é substituído por alanina, para A e B, respectivamente. Estas duas mutações estão localizadas próximas a vários sítios de glicosilação e afetam a estrutura da proteína e os seus padrões de glicosilação e de distribuição dentro da micela (Azevedo et al., 2008).

Estudos de associação demonstraram que o alelo B está associado à resistência térmica, diminuição no tempo de coagulação e tamanhos das micelas, características preferíveis para fabricação de queijo. A produção de massa de queijo de vacas com genótipo BB é 10% maior em relação às vacas AA. O alelo B promove não só um aumento na produção como na melhoria da qualidade, e também se correlaciona com outros parâmetros importantes, como teor de proteína e produção de leite. O efeito do alelo B no teor de proteína do leite tem sido relatado em vários estudos envolvendo bovinos da raça Holandesa (Malik et al., 2000; Azevedo et al., 2008).

A seleção de animais para o alelo B do gene κ -CN está sendo implantada em programas de melhoramento animal em muitos países e em diversas raças. Devido às associações entre os genótipos dos animais e características economicamente importantes em gado leiteiro, o polimorfismo das proteínas do leite tem recebido um interesse considerável no melhoramento animal. Sendo assim, os genes de proteínas do leite são úteis como marcadores genéticos para os critérios de seleção na reprodução de gado leiteiro.

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi estimar as frequências alélicas e genotípicas do gene κ -CN e verificar se o mesmo está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em animais da raça Girolando participantes do Teste de Progênie da raça.

Material e Métodos

Amostras de DNA genômico foram extraídas do sêmen ou sangue de 87 touros e 337 vacas da raça Girolando pertencentes ao Teste de Progênie da raça coordenado pela Embrapa Gado de Leite e a Associação Brasileira dos Criadores de Girolando. O DNA foi extraído dessas amostras utilizando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação foi feita por espectrofotometria (Nanodrop® Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

Foram utilizados *primers* já descritos na literatura (Barroso et al., 1998) para amplificar a região do gene κ -CN onde está presente o polimorfismo que distingue os alelos A e B. As condições da reação da PCR foram otimizadas, de acordo com a literatura. Após a digestão dos produtos da PCR utilizando-se a enzima de restrição *Hinf* I, o genótipo foi estabelecido. Todas essas reações foram conduzidas no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para a visualização e determinação do genótipo, o produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídeo. O produto de PCR é uma banda de 453 pb, sendo que, o genótipo AA é caracterizado por 3 bandas: 326, 100 e 27 pb, o genótipo AB apresenta 3 bandas de 426, 326 e 100 pb e, finalmente, o genótipo BB possui duas bandas de 426 e 27 pb.

Para proceder à análise das frequências gênicas e genotípicas e calcular o teste de probabilidade de EHW, foi utilizado o programa *GENEPOP web version 3.4* (Raymond & Rousset, 1995). A probabilidade de EHW associado às frequências genotípicas observadas foi testada pelo teste χ^2 e nível de significância de 1%.

Resultados e Discussão

As frequências gênicas, genotípicas e o EHW para o gene κ -CN na população estudada estão descritas na Tabela 1. A frequência do alelo A foi 0,83, enquanto que a frequência do alelo B foi de 0,17. Esses resultados estão em concordância com outros estudos (Malik et al., 2000, Tsiaras et al., 2005,



47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia Brasileira de Vanguarda



27 a 30 de julho de 2010
Salvador - BA

Azevedo et al., 2008 e Rachagani & Gupta, 2008), uma vez que todos eles relatam uma grande incidência do alelo A seguido de baixa frequência do alelo B. Apesar de baixa, a frequência do alelo B era esperada, já que na raça Holandesa, uma das formadoras da raça Girolando, é por volta de 0,13 (Tsiaras et al., 2005; Azevedo et al., 2008). As frequências gênicas diferiram muito entre si, já que foram de 69,34% para o genótipo AA, 27,59% para AB e apenas 3,07% para BB. Apesar disso, apresentam-se muito próximas do esperado, estando de acordo com o EHW ($p < 0,01$). Ao correlacionar os genótipos AA e AB com características de produção de leite, Tsiaras et al. (2005) relataram que o genótipo AA foi o mais frequente na população estudada por eles, apesar de o genótipo AB estar relacionado a leite com maior produção de gordura e maior produção e conteúdo de proteínas do que o genótipo AB. A maior frequência do alelo A pode ser explicada pelo fato de que nas raças Holandês e Gir essa frequência também é alta.

Tabela 1- Frequências genotípicas, gênicas e probabilidades de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Genótipo	Número de animais		Frequência		EHW*
	Observado	Esperado	Gênica	Genotípica	
AA	294	293	0,69	0,83 (A)	0,12
AB	117	119	0,28		
BB	13	12	0,31	0,17 (B)	

* = $P < (0,01)$

Conclusões

Foi verificado que a população estudada encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, portanto, não está havendo seleção para a característica estudada

Literatura citada

- AZEVEDO, A.L.S.; NASCIMENTO, C.S.; STEINBERG, R.S. et al. Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.7, n.3, p.623-630, 2008.
- BARROSO, A.; DUNNER, S.; CAÑÓN, J. Technical Note: Detection of Bovine Kappa-Casein Variants A, B, C, and E by Means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). **Journal of Animal Science**, v.76, p.1535-1538, 1998.
- MALIK, S.; KUMAR, S.; RANI, R. κ -Casein and β -casein alleles in crossbred and Zebu cattle from India using polymerase chain reaction and sequence-specific oligonucleotide probes. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 295-300, 2000.
- RACHAGANI, S.; GUPTA, I.D. Bovine kappa-casein gene polymorphism and its association with milk production traits. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.4, p.893-897, 2008..
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal Heredity**, v.86, p.248-249, 1995.
- TSIARAS, A.M.; BARGOULI, G.G.; BANOS, G. et al. Effect of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin Loci on Milk Production Traits and Reproductive Performance of Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 1; p. 327-334, 2005.