

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

*ESTUDO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E DA SUA
ASSOCIAÇÃO COM CAPACIDADES DE PRODUÇÃO
LEITEIRA EM CAPRINOS DE RAÇA ALGARVIA E OVINOS DE
RAÇA SERRA DA ESTRELA.*

Dissertação com vista à obtenção do grau de Mestre em Química Celular pela

Unidade de Ciências Exactas e Humanas da Universidade do Algarve.

HELENA MARIA GUERREIRO PIRES BARRACOSA

OUTUBRO, 1996

Estudo de polimorfismos
genéticos e da sua
associação com ca-
Barracosa,



TESES
SD



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

***ESTUDO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E DA SUA
ASSOCIAÇÃO COM CAPACIDADES DE PRODUÇÃO
LEITEIRA EM CAPRINOS DE RAÇA ALGARVIA E OVINOS DE
RAÇA SERRA DA ESTRELA.***

**Dissertação com vista à obtenção do grau de Mestre em Química Celular pela
Unidade de Ciências Exactas e Humanas da Universidade do Algarve.**

HELENA MARIA GUERREIRO PIRES BARRACOSA

OUTUBRO, 1996

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
SERVIÇO DE DOCUMENTAÇÃO

17/08/00 31932

591.1
BAR. Est

15537

2

Jerome H. G.P. Banacos

Ao meu filho,

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível mediante o apoio e colaboração de diversas pessoas e entidades, merecedoras por isso do meu profundo reconhecimento. Em especial pela importância relevante na execução deste estudo, devo salientar:

- O Professor Doutor Alfredo Cravador, orientador científico deste trabalho.
- O Laboratório de Biologia Molecular e Fisiologia Animal de Gembloux (Bélgica) em especial o Professor Arsène Burny e o Professor Robert Renaville.
- Os Investigadores e Técnicos do Laboratório de Biologia Molecular e Fisiologia Animal de Gembloux (Bélgica) em especial o Yves, Mohamed, RoseMarie, Frank, MarieFrance e as minhas colegas italianas Élena e Gabriella.
- A Direcção Regional de Agricultura do Algarve e em especial o Dr. Mário Rui Gomes e o Eng. Castelão Rodrigues.
- A Estação Zootécnica Nacional e em especial o Dr. Carmona Belo.
- O Professor Alex Bolléne do Laboratório de Genética Aplicada da Universidade Livre de Bruxelas.
- A minha colega e amiga Ana Cristina, "companheira de luta" da Bélgica que me aturou e que se fez aturar nos bons e maus momentos.
- Os meus colegas da ESE, e muito especialmente à Área de Ciências da Natureza pela forma amiga com que me apoiaram e incentivaram.
- A JNICT e a FNRS.
- Meus pais, por todo o apoio que como sempre me deram.
- O Rui, por tudo... e o nosso João Francisco por muitas horas roubadas de atenção e carinho.

Estudo de polimorfismos genéticos e da sua associação com capacidades de produção leiteira em caprinos de raça Algarvia e ovinos de raça Serra da Estrela.

Resumo

Neste estudo foram identificados e analisados polimorfismos de restrição (RFLPs) e conformacionais (SSCPs) a partir de DNA genómico extraído de 77 caprinos de raça Algarvia e 70 ovinos de raça Serra da Estrela.

A análise por *Southern Blot* utilizando a enzima *Pst*I, revelou dois padrões RFLP designados por GH-*Pst*I ABC e GH-*Pst*I BC no gene codificante para a hormona de crescimento caprina.

A análise em gel de poliacrilamida não desnaturante dos fragmentos PCR ("Polymerase Chain Reaction") desnaturados revelou a existência de polimorfismos conformacionais nos exões 9 e 10-11 do gene caprino codificantes para a caseína α_1 (3 padrões SSCP), no exão 1 da α -Lactoalbumina caprina (2 padrões SSCP) e no exão 7 do gene da β caseína caseína (3 padrões SSCP) bem como no exão 4 da κ caseína ovina (2 padrões SSCP).

A análise dos contrastes lineares entre o padrão RFLP designado por BC-GH-*Pst*I e o padrão ABC-GH-*Pst*I revelou que o primeiro está associado a uma maior teor proteico ($p < 0.08$). Não foram detectadas associações sobre a quantidade de leite produzida e teor butiroso. Em relação à α_1 -caseína caprina-(exão 9) o padrão AB revelou ser superior ao padrão ABC em relação à quantidade de leite produzida ($p < 0.00001$) teor butiroso ($p < 0.005$) e proteico ($p < 0.00001$) enquanto que o padrão AA (exão 10-11) da mesma caseína revelou ainda ser superior ao padrão AB em relação à quantidade de leite produzida ($p < 0.00001$) teor butiroso ($p < 0.005$) e proteico ($p < 0.00001$). A quantidade de leite produzida, teor butiroso e teor proteico não parecem ser afectados pelos restantes polimorfismos conformacionais obtidos na α -La e β -caseína caprina.

PALAVRAS CHAVE: RFLP, SSCP, polimorfismo genético, produção leiteira, hormona de crescimento, lactoproteínas.

Study of genetic polymorphisms and their relation with milk traits in Algarvia goat breed and Serra da Estrela ovine breed.

Abstract

In this study we identified and analysed restriction polymorphisms (RFLPs) and conformation polymorphisms (SSCPs) from genomic DNA extracted from 77 goats "Algarvia" and 70 sheep "Serra da Estrela".

This study revealed a caprine GH (Growth Hormone) gene polymorphism in *Southern Blot* analysis using *Pst*I restriction enzyme. The patterns were designated by GH-*Pst*I ABC and GH-*Pst*I BC.

The analysis of denatured amplification products was carried out by polyacrylamide gel electrophoresis. Several conformation polymorphisms were revealed: on exon 9 and 10-11 of caprine α_{s1} casein gene (3 SSCP patterns each one), on exon 1 of caprine α -lactoalbumin gene (2 SSCP patterns) and on exon 7 of caprine β casein (3 SSCP patterns). The same analysis on ovine sheep breed revealed conformation polymorphisms in exon 4 of κ casein gene (2 SSCP patterns).

Linear contrasts between RFLP patterns designated by GH-*Pst*I ABC and GH-*Pst*I BC showed that the former is associated to high protein content ($p < 0.08$). However it was not found any relationship with both, milk yield and fat content. As far as caprine α_{s1} -casein (exon 9) is concerned, linear contrasts analysis revealed that the SSCP pattern AB, is better than ABC in milk yield ($p < 0.00001$), fat ($p < 0.0005$) and protein content ($p < 0.00001$). Pattern AA (exon 10-11) of this same casein revealed superior in milk yield ($p < 0.00001$), fat ($p < 0.0005$) and protein content ($p < 0.00001$) to AB. Finally, milk yield, fat and protein content were not found to be associated to the others polymorphisms detected in α -lactoalbumin and β -casein gene.

KEYWORDS: RFLP, SSCP, genetic polymorphism, milk traits, growth hormone, milk proteins.

Índice

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Índice.....	iii
<i>I. Introdução e Objectivos</i>	1
1. Introdução.....	1
2. Objectivos.....	2
<i>II. Estado Actual dos Conhecimentos</i>	3
1. A lactação: definição e controlo.....	3
2. Lactoproteínas.....	4
2.1. Estrutura das principais proteínas do leite: α_{s1} , α_{s2} , β e κ caseínas, β LG e α La	5
2.2. Estrutura dos genes das proteínas do leite.....	6
2.3. Interesse do estudo de polimorfismos.....	8
2.4. Detecção de polimorfismos genéticos.....	10
2.5. Variantes proteicas e nucleotídicas.....	13
<u>Lactoproteínas caprinas</u>	13
<u>Lactoproteínas ovinas</u>	17
2.6. Relações genéticas entre <i>locus</i> e localização cromossómica.....	17
3. Factores de Crescimento.....	18
3.1. A hormona de crescimento (GH).....	19
<u>Estrutura e origem da hormona de crescimento (GH)</u>	19
<u>Regulação da secreção da GH</u>	19
<u>Estrutura do gene da hormona de crescimento (GH)</u>	19
3.2. O receptor celular da GH (GHR).....	21
<u>Estrutura do receptor</u>	21

<u>Regulação da síntese do receptor</u>	22
3.3. " <i>Insulin Like Growth Factor</i> " (IGF).....	22
<u>Estrutura e origem dos IGFs</u>	22
<u>Papel da GH e sua relação com o IGF-I</u>	23
3.4. Variantes genóticas.....	23
4. Características das raças estudadas.....	25
4.1. Raça caprina Algarvia.....	25
<u>Origem</u>	25
<u>Importância e distribuição geográfica</u>	25
<u>Maneio alimentar</u>	26
<u>Produtividade</u>	26
4.2. Raça ovina Serra da Estrela.....	27
<u>Origem</u>	27
<u>Importância e distribuição geográfica</u>	27
<u>Maneio alimentar</u>	27
<u>Produtividade</u>	28
4.3. Perspectivas.....	28
III. Material e Métodos	29
1. Animais.....	29
2. Análises de laboratório.....	29
2.1. Lise diferencial.....	29
2.2. Extracção de DNA genómico.....	30
2.3. Quantificação de DNA.....	30
3. Detecção de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLPs).....	30
3.1. " <i>Southern Blot</i> ".....	30
3.2. Sondas.....	31
<u>Sonda bGH</u>	32
<u>Sonda bGHR8</u>	33
<u>Sonda bIGF-I</u>	33

<u>Sondas bPRL e bIGF-R</u>	33
4. Detecção de polimorfismos conformacionais.....	33
4.1. Amplificação e marcação do DNA através da amplificação <i>in vitro</i> (PCR).....	33
4.2. Desnaturação do produto amplificado.....	35
4.3. Condições do gel e autorradiografia.....	35
5. Análise Estatística.....	35
IV. Resultados	37
1. Detecção de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição.....	37
1.1. Hibridação no <i>locus</i> da hormona de crescimento (GH).....	38
<u>Polimorfismo GH.PstI</u>	38
<u>Polimorfismo GH.EcoRI</u>	39
<u>Outras análises de restrição</u>	40
1.2. Hibridação no <i>locus</i> do receptor da hormona de crescimento.....	41
1.3. Hibridação no <i>locus</i> do "Insulin Like Growth Factor" (IGF-I).....	43
1.4. Hibridação no <i>locus</i> da prolactina (PRL) e do receptor do "Insulin Like Growth Factor .I" (IGF-R).....	44
2. Detecção de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCPs)...	45
2.1. Análise conformacional do gene da α .Lactoalbumina (exão 1).....	47
2.2. Análises conformacionais dos genes das caseínas.....	49
<u>Análise conformacional do gene da α_{s1}.CN (exão 9)</u>	49
<u>Análise conformacional do gene da α_{s1}.CN (exões 10-11)</u>	49
<u>Análise conformacional do gene da β.CN (exão 7)</u>	50
<u>Análise conformacional do gene da κ.CN (exão 4)</u>	51
3. Análise Estatística.....	53
3.1. Polimorfismo de restrição GH-PstI.....	53
3.2. Polimorfismos conformacionais dos genes das proteínas do leite.....	53
<u>α.Lactoalbumina (exão 1)</u>	53
<u>α_{s1}.CN (exões 9, 10 e 11)</u>	54
<u>β. Cn (exão 7)</u>	55

V. Discussão	56
1. Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs).....	56
1.1. Polimorfismo de restrição no locus da hormona de crescimento (GH).....	58
<u>Polimorfismo devido a uma variação do número de genes</u>	58
<u>Polimorfismo GH-PstI</u>	63
<u>Polimorfismo GH-EcoRI</u>	64
1.2. Outras hibridações.....	64
<u>Hibridação no locus do receptor da hormona de crescimento (GHR)</u>	64
2. Polimorfismos conformacionais (Sscp's).....	65
2.1. Polimorfismo conformacional no gene da α -La.....	66
2.2. Polimorfismo conformacional nos genes das caseínas.....	66
<u>αs₁-CN</u>	66
<u>β-CN</u>	68
3. Correlações entre polimorfismos e caracteres de produção.....	68
3.1. Polimorfismo de restrição na hormona de crescimento (GH-PstI).....	69
3.2. Polimorfismos conformacionais em proteínas do leite.....	70
 VI. Conclusões e perspectivas	 71
 VII. Referências Bibliográficas	 73

I. Introdução e Objectivos

1. Introdução

Nos esquemas tradicionais de produção animal, a selecção de animais de elevado potencial para a produção de leite é limitada por este carácter ser apenas expresso por fêmeas em lactação. Este facto é limitante no rendimento e eficácia dos programas de selecção visando melhorar a produção leiteira, pois é necessário que os animais atinjam a maturidade para se avaliar o seu potencial. Com o objectivo de ultrapassar este problema, uma nova abordagem foi introduzida, baseada na detecção de polimorfismos genéticos ao nível nucleotídico. Esta abordagem, aliada a desenvolvimentos e progressos nas técnicas de Biologia Molecular, tem tornado possível uma análise do genótipo dos animais com a correspondente identificação precoce, ao nascimento, dos que apresentam um potencial genético elevado.

A maior parte dos estudos relacionados com a qualidade do leite foram realizados em bovinos (Grosclaude, 1988; Aleandri *et al.*, 1990; Bech & Kristiansen, 1990; Dalgleish, 1992; Rocha *et al.*, 1992). Os resultados destes estudos têm servido de referência e foram aplicados a investigações em outras espécies. Deste modo, foi demonstrada a existência de polimorfismos nas lactoproteínas caprinas (Chianese *et al.*, 1990; Di Lucia *et al.*, 1990; Bouniol *et al.*, 1993, 1994) assim como a existência de um polimorfismo associado a uma variação alélica quantitativa na α_1 -caseína (Leroux *et al.*, 1990, 1992; Martin, 1993; Martin & Grosclaude, 1993). Variantes genéticas das caseínas foram também identificadas em ovinos, (Leveziel *et al.*, 1991; Di Gregorio *et al.*, 1991; Montgomery *et al.*, 1995) não sido contudo estabelecida qualquer correlação entre estes polimorfismos e caracteres produtivos.

Um procedimento baseado na detecção de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) pode ser aplicado à determinação de variantes. É possível, seguindo esta estratégia, detectar polimorfismos causados por deleções ou inserções no DNA que originam fragmentos de tamanhos variados, ou ainda qualquer mutação, desde que coincidente com o local de reconhecimento de uma enzima de restrição.

Outra possível abordagem consiste na detecção de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP, *Single Strand Conformation Polymorphism*). É baseada na observação de que o comportamento electroforético de pequenos fragmentos de DNA de cadeia simples,

em gel não desnaturante, é função não apenas do seu tamanho mas também da sua sequência. As moléculas de DNA monocatenárias resultantes de desnaturação, podem assumir diferentes conformações tridimensionais que podem ser postas em evidência por electroforese.

As raças autóctones constituem um valioso património genético nacional e são, regra geral, suporte económico da população rural que sobrevive em regiões austeras. Possuem uma notável adaptação ao meio, podendo contribuir desta forma para a valorização e preservação destas regiões. As raças autóctones portuguesas caprina Algarvia e ovina Serra da Estrela são no panorama nacional das que apresentam melhor desempenho em termos de produção de leite. São desta forma animais de elevado potencial e fortes candidatos a estudos deste tipo.

2. Objectivos

São objectivos do presente trabalho de investigação:

1. Identificar em caprinos da raça Algarvia e em ovinos Serra da Estrela polimorfismos ao nível dos genes da hormona de crescimento (GH), do receptor celular da hormona de crescimento (GHR), do "Insulin Like Growth Factor" (IGF-I) e das quatro principais lactoproteínas ou seja as caseínas α_1 , β e κ e a α -lactoalbumina.

2. Estudar a correlação entre estes polimorfismos e os caracteres de produção leiteira, (produção de leite, teor butiroso e teor proteico).

II. Estado Actual dos Conhecimentos

1. A lactação: definição e controlo

A lactação é um processo biológico característico da classe dos mamíferos podendo ser definida como a secreção do leite nas glândulas mamárias e sua condução para o exterior. Ela depende da presença de glândulas mamárias constituindo a fase final do ciclo da reprodução. É um processo altamente organizado, dependente não só do material genético e de um controlo hormonal complexo, mas também de influências nutricionais e ambientais. Na altura do parto, muitos elementos nutritivos que compõem o leite, são sintetizados em quantidades superiores às necessárias à nutrição dos jovens animais. É o caso dos animais que são alvo de uma selecção intensa por parte do homem em virtude das produções leiteiras destinadas à alimentação humana.

Os genes, que codificam para as proteínas do leite, são especificamente expressos durante a lactação nas células epiteliais da glândula mamária estando sob um controlo hormonal multicomplexo (Figura 1).

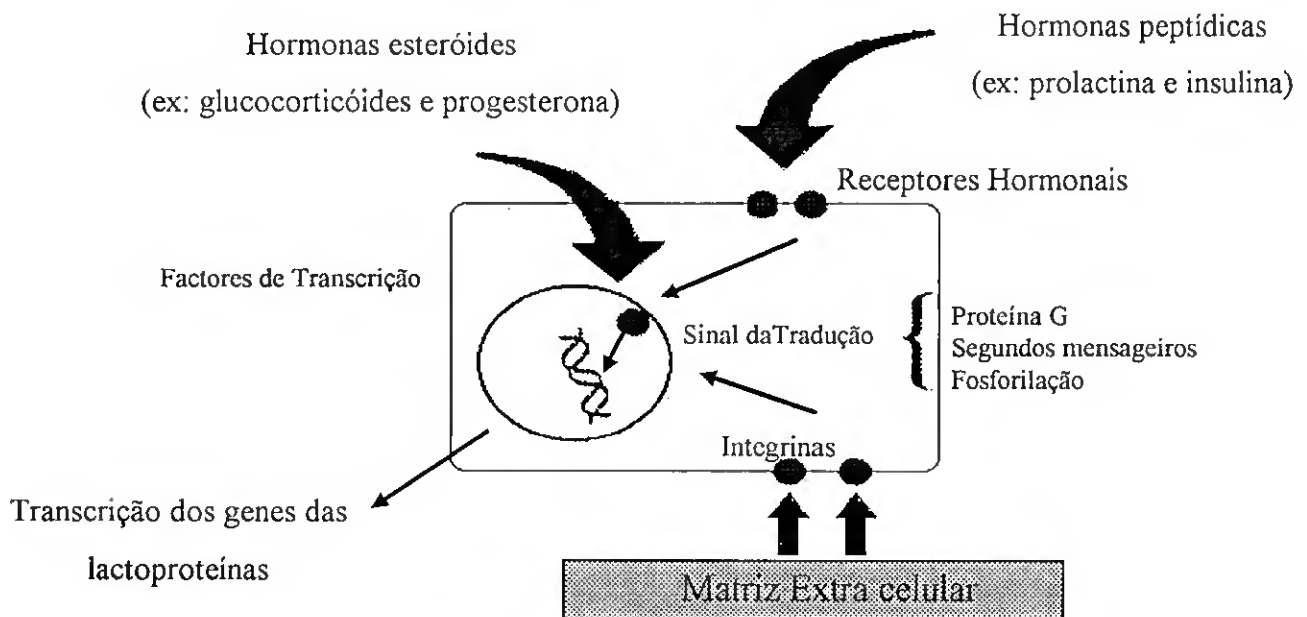


Figura 1. Controlo da expressão dos genes das lactoproteínas nas células epiteliais da glândula mamária.

Não existe uma só hormona a desencadear a lactação. Uma cascata de acontecimentos ocorre no sistema endócrino durante o terceiro período de gestação, preparando a glândula mamária para a secreção de leite. Os principais estímulos para a lactogénese são o acréscimo de secreções de prolactina, glucocorticóides e estradiol-17 β e o decréscimo de secreção de progesterona. Outras proteínas, tais como a insulina e a hormona de crescimento também parecem influenciar a lactogénese, amplificando o efeito lactogénico da prolactina. Muitos destes estímulos estão provavelmente envolvidos no desenvolvimento da glândula mamária durante a gestação (Groenen & Poel, 1993; 1994). Além disto, e em adição à acção hormonal, interacções entre as células epiteliais e a matriz extra celular (ECM) jogam um papel vital na expressão dos genes das lactoproteínas (Groenen & Poel, 1993; 1994).

2. Lactoproteínas

Devido ao seu valor comercial e significado nutritivo o leite é provavelmente o alimento mais conhecido, no que diz respeito à biossíntese, composição e estrutura química dos seus componentes (Martin & Grosclaude, 1993). É processado e transformado numa grande variedade de produtos que compreendem mais que 25% da dieta no mundo industrializado. O leite é um sistema complexo que comporta duas fases líquidas fisicamente homogéneas: uma fase aquosa e uma fase lipídica, nas quais se repartem os diversos constituintes de natureza glicídica, lipídica, proteica e mineral. O essencial da fracção proteica divide-se na fracção aquosa ou solúvel (lactosoro) e na fase coloidal (micelas de caseínas).

Muitas das propriedades do leite são função do seu conteúdo em proteínas. Estas possuem uma gama diversificada de propriedades podendo formar aglomerados e interactuar com outros componentes tais como a água, sais e lípidos. Desta forma contribuem para as características organolépticas dos produtos derivados do leite e adicionam atributos tais como o aroma, o sabor e a textura.

A composição proteica difere quantitativamente e qualitativamente entre espécies (Tabela 1) O conteúdo total em proteínas pode variar entre 10g/l (Primatas) a 200 g/l (Lagomorfa), sendo de aproximadamente 32g/l em ruminantes. Podem ser divididas em dois grupos fundamentais: as caseínas (α ₁-CN, α ₂-CN, β -CN e κ -CN) e as proteínas do lactosoro β -Lactoglobulina (β -LG) e a α -Lactoalbumina (α -La). Desta forma e em termos proteicos, cerca de 95% do leite provêm da expressão de seis genes que codificam especificamente para

seis proteínas: a β -LG e a α -LG que constituem as duas proteínas maioritárias do lactosoro, e as quatro caseínas (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN e κ -CN) que são os elementos proteicos das micelas caseínicas.

Tabela 1. Composição proteica no leite de ruminantes (g/l)

Lactoproteína	Vaca	Ovelha	Cabra
α_{s1} -CN	10	7	0-7
α_{s2} -CN	3.7	7	4
β -CN	10	28	10
κ -CN	3.5	3.5	6
α -La	1.2	0.8-2.4	1.2
β -La	3.3	2.8-5	2.3

Adaptado de Martin & Grousclaude, 1993.

2.1. Estrutura das principais proteínas do leite : α_{s1} , α_{s2} , β e κ caseínas, β -LG e α -La.

O leite dos ruminantes contém geralmente entre 2.5% e 3.5% de proteína. Esta quantidade depende de vários factores entre os quais a raça, estágio de lactação e estado físico e nutricional do animal. As lactoproteínas possuem estrutura e propriedades diversas (Tabela 2).

Tabela 2. Estrutura e propriedades das diferentes proteínas do leite dos ruminantes.

Proteína	Número de a.a.	Resíduos fosforilados	Resíduos sulfídricos	S-S	Sensibilidade ao Ca^{++}	Quantidade no leite (g/l)
α_{s1} -CN	199	7-9	0	0	+	10.0
α_{s2} -CN	207-208	9-13	2	0	+	2.5
β -CN	207-209	5-6	0	0	+	10.0
κ -CN	169-171	1-3	2	0	-	2.5
β -LG	162	0	5	2	-	3.1
α -La	123	0	8	4	-	1.2

a.a. aminoácidos

A distinção mais óbvia está entre as proteínas sensíveis ao cálcio (α_{s1} , α_{s2} e β caseína) e as não sensíveis ao cálcio (κ caseína) ou seja proteínas que ligam o cálcio e proteínas que o

não ligam. Esta propriedade possibilita a formação das micelas de caseína. Estas partículas contêm caseína, combinada com cálcio, fosfatos e pequenas quantidades de citratos (Dalglish, 1992). Os principais sítios de ligação para o cálcio nas caseínas são os resíduos fosfoserílicos mas outros sítios ácidos podem ligar também íões cálcio. Quando um número suficiente de íões cálcio se ligam a estas caseínas, ocorre precipitação. A κ -caseína não precipita uma vez que liga muito pouco cálcio, possuindo apenas um ou dois resíduos de fosfoserina, mas actua estabilizando a estrutura micelar. Cerca de 95% das caseínas existentes no leite bovino encontram-se sob a forma de micelas combinadas com cerca de 2/3 do cálcio e uma pequena quantidade de citrato (Dalglish, 1992). As micelas de caseína possuem variados tamanhos, sendo as mais pequenas mais ricas em κ caseína (Donnelly *et al.*, 1984; Dalglish, 1992). Poucos detalhes são conhecidos acerca da estrutura da micela de caseína. Contudo, alguns dados relativos ao comportamento destas estruturas sugerem que as micelas possuem uma face exterior rica em κ caseína, e um núcleo interior rico em α_1 , α_2 e β -caseínas.

As proteínas sensíveis ao cálcio são fosforiladas e juntamente com a κ caseína constituem a fonte primária de aminoácidos, cálcio e fosfatos para o jovem animal. Além disso constituem a base para a indústria do queijo.

As proteínas maioritárias do lactosoro estão envolvidas na síntese de lactose no caso da α -La (Ebner & Brodbeck, 1968) e possivelmente no transporte de pequenas moléculas hidrofóbicas no caso da β -LG (Papiz *et al.*, 1986).

2.2. Estrutura dos genes das proteínas do leite.

Desde a primeira publicação da estrutura parcial da α -caseína do rato por YuLee & Rosen (1983), cerca de 20 sequências nucleotídicas dos genes das proteínas lácteas foram determinadas, incluindo a estrutura dos genes que codificam para as seis maiores lactoproteínas em ruminantes que foram clonados e parcialmente sequenciados. (Tabela 3). Comparações inter-específicas destas sequências estabelecem que a organização geral dos genes foi conservada no decurso da evolução (Mercier & Grousclaude, 1993).

Comparações intra e inter específicas dos genes que codificam para as proteínas lácteas, bem como a análise da sequência de aminoácidos das proteínas permitem concluir que:

1) Os três genes das proteínas sensíveis ao cálcio (α_1 , α_2 e β caseína), partilham motivos comuns na região do promotor (Chikuni *et al.*, 1993) e contêm regiões similares que codificam para o péptido sinal e sítios multifosforilados (Bonsing J. & Mackinlay, 1987; Gronen & Poel, 1994). Apresentam desta forma uma organização geral muito semelhante a que reforça a ideia de uma origem filogenética comum (Mercier *et al.*, 1985; Mercier & Vilotte, 1993).

2). Uma análise inter-específica comparativa global ao nível da estrutura primária revela uma forte similaridade que atinge os 95% para as proteínas do lactosoro mas que não excede os 85% para a κ caseína (Martin, 1993). As maiores diferenças relacionam-se com o tamanho dos intrões, onde contudo vários tipos de sequências repetidas têm sido encontradas.

Tabela 3. Sequências nucleotídicas das proteínas maioritárias do leite

Gene	Ruminante	Sequência	Referência
α_1 -CN	bovinos	completa	Koczan et al., 1991
α_1 -CN	caprinos	parcial	Leroux et al., 1992
α_1 -CN	ovinos	parcial	Mercier et al., 1985
α_2 -CN	bovinos	completa	Groenen et al., 1993
α_2 -CN	caprinos	parcial	Bouniol, C.A., 1992*
α_2 -CN	ovinos	parcial	Boisnard et al., 1985
β -CN	bovinos	completa	Bonsing et al., 1988
β -CN	caprinos	parcial	Roberts et al., 1992
β -CN	ovinos	completa	Provot et al., 1995
κ -CN	bovinos	parcial	Alexander et al., 1988
κ -CN	caprinos	parcial	Tabata et al., 1992*
κ -CN	ovinos	parcial	Furet, 1990*
α -La	bovinos	completa	Vilotte et al., 1987
α -La	caprinos	completa	Vilotte et al., 1991
α -La	ovinos	parcial	Gaye et al., 1987
β -LG	bovinos	completa	Alexander et al., 1992
β -LG	caprinos	completa	Folch <i>et al.</i> , 1994
β -LG	ovinos	completa	Harris et al., 1988

* submissão directa ao EMBL/GenBank/DBJ databases.

3) Uma sequência *consensus*, de 30 bp, exibindo uma homologia de 70-80% localizada aproximadamente 100 nucleótidos a montante do início da transcrição dos genes das lactoproteínas (ou mais precisamente dos genes que codificam para as proteínas sensíveis ao cálcio) foi identificada em ruminantes. Contudo, a assim denominada *milk box* (Hall *et al.*, 1987; Groenen. & Poel, 1994) ainda permanece controversa, devido à fraca homologia observada em zonas importantes de alguns genes, fazendo com que seja necessário introduzir intervalos de tamanho variável na maioria destas sequências para um alinhamento óptimo. Por outro lado esta sequência não foi encontrada na região do promotor da κ -CN e da β -LG e apenas parcialmente no gene bovino que codifica para a α -La. Assim o significado desta *milk box* é discutível.

2.3. Interesse do estudo dos polimorfismos

A elucidação da estrutura primária das lactoproteínas nos anos 70 originou a identificação e a caracterização de variantes genéticas baseadas em polimorfismos bioquímicos. Foi demonstrado então, que a heterogeneidade das caseínas é função da *o*-fosforilação incompleta das α e β -caseínas, da *o*-glicosilação da κ -caseína, da proteólise parcial pela plasmina e do polimorfismo genético (Martin, 1993).

O polimorfismo das proteínas em geral e das lactoproteínas em particular, é detectado através da sua distinta mobilidade electroforética o que permite separar as duas variantes da mesma proteína quando estas diferem em tamanho ou carga. Este polimorfismo parece ser em grande parte consequência de diferenças nas sequências codificantes do gene as quais representam apenas uma pequena parte da totalidade do gene (3 a 7% para os genes das caseínas). Desta forma, o polimorfismo observado ao nível da proteína traduz apenas parcialmente o polimorfismo existente a nível do gene (Martin, 1993). Foram efectuados estudos visando a identificação de variabilidade nucleotídica em partes não codificantes dos genes (intrões, sequências promotoras e reguladoras) e portanto não acessíveis a partir da análise estrutural da proteína. Aqueles revelaram que estas mutações poderão ter um efeito, por vezes considerável, no taxa de síntese o que se observa nas caseínas caprinas (Leroux *et al.*, 1992). Por outro lado, dois terços das substituições na proteína não modificam o comportamento desta em electroforese o que torna a análise a nível proteico incompleta.

A frequência do polimorfismo genético é variável mas existe mesmo em animais sujeitos a uma elevada pressão selectiva. A identificação das variantes genóticas das proteínas do leite e a sua utilização em melhoramento animal constitui um exemplo de como a genética molecular poderá ter impacto directo em produções de interesse económico. A família das caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β e κ), a β -Lactoglobulina e a α -Lactoalbumina influenciam significativamente a composição e as propriedades fisico-químicas do leite. As variantes genéticas destas proteínas têm sido ainda associadas com a quantidade e qualidade do queijo derivado desse leite (Martin, 1993). A maior parte dos estudos relacionados com a qualidade do leite foram realizados em bovinos (Grosclaude, 1988; Aleandri *et al.*, 1990; Bech & Kristiansen, 1990; Dalgleish, 1992; Rocha *et al.*, 1992). Os resultados destes estudos têm servido de referência e foram aplicados a investigações em outras espécies. Deste modo, foi demonstrada a existência de polimorfismos nas lactoproteínas caprinas (Chianese *et al.*, 1990; Di Lucia *et al.*, 1990; Bouniol *et al.*, 1993, 1994) assim como a existência de um polimorfismo associado a uma variação alélica quantitativa na α_{s1} -caseína (Leroux *et al.*, 1990, 1992; Martin, 1993; Martin & Grosclaude, 1993) tendo ainda sido encontradas relações entre a aptidão para a produção de queijo e as variantes genéticas das fracções caseínicas (Remeuf, 1989, 1993; Serradilla *et al.*, 1992; Manfredi *et al.*, 1993).

No passado, as estratégias convencionais de melhoramento em produção animal, resultaram num aumento substancial do potencial para a produção de leite. A implementação e aplicação à produção animal das técnicas de Biologia Molecular torna possível seleccionar desde o nascimento os animais portadores de alelos fortes e assim melhorar a qualidade do leite. No melhoramento genético em produção leiteira, são importantes a determinação das variantes proteicas e o conhecimento acerca da regulação e expressão dos diferentes genes que codificam para as proteínas do leite. O conhecimento dos mecanismos regulatórios envolvidos na expressão dos genes das lactoproteínas, bem como a identificação e correlação das variantes genéticas com caracteres de produção é assim de primordial importância em programas de melhoramento.

O método clássico utilizado para determinar as variantes é, tal como referido a electroforese das proteínas. Utilizando esta abordagem é muitas vezes difícil identificar as lactoproteínas devido a padrões complexos que aparecem como resultado de incorporações pós-translacionais de quantidades variáveis de carboidratos e do aparecimento de bandas que resolvem na mesma região. Além disso, o facto de se utilizar leite faz depender a realização destes estudos a fêmeas em lactação. Torna-se assim impossível a determinação do genótipo

dos machos por métodos electroforéticos e necessária a realização de *testes de progenie*. Este facto faz com que este tipo análise dure pelo menos 6 anos resultando assim morosa e dispendiosa a sua utilização em programas de melhoramento. Com o objectivo de ultrapassar este problema tem-se procurado determinar as variantes genóticas ao nível da sequência nucleotídica utilizando novas abordagens, tais como a identificação de polimorfismos de fragmento de comprimento de restrição (RFLPs). Esta técnica tem sido aplicada à identificação de variantes (Leveziel *et al.*, 1991; Damiani *et al.*, 1989) e permite a identificação ao nascimento de alelos que estão associados com uma elevada taxa de síntese de lactoproteínas (Leroux, *et al.*, 1990; 1991; 1993). Outro tipo de abordagem consiste na utilização de técnicas derivadas do da amplificação *in vitro* por PCR (Polymerase Chain Reaction) tais como PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*).

Os polimorfismos obtidos (RFLPs ou SSCPs) poderão afectar directamente a expressão genética, por efeitos directos no *splicing* do mRNA, estabilidade do mRNA, taxa de transcrição genética ou sequência do produto final. Em virtude destes polimorfismos não se restringirem a mudanças que afectam fenótipos eles poderão ser utilizados ainda como marcadores, se associados a um genótipo de interesse (Beckmann & Soller, 1983). A ligação dos RFLP's ou SSCP's a características que são poligénicas na natureza permite prognosticar acerca do valor genético de um animal. Uma vez que a hormona de crescimento (GH), a prolactina (PRL) e o "*Insulin Like Growth Factor-I*" (IGF-I) estão envolvidos na lactação, uma correlação entre os polimorfismos identificados nestes genes, a par dos identificados nas lactoproteínas, e caracteres produtivos tais como a produção de leite e o teor proteico ou butiroso poderá ser estabelecida (Lucy *et al.*, 1993; Hoj *et al.*, 1993).

2.4. Detecção de polimorfismos genéticos

A identificação de polimorfismos de fragmento de comprimento de restrição (RFLPs) após digestão enzimática do DNA genómico e hibridação com uma sonda marcada ou não radioactivamente (*Southern Blot*) constitui uma das abordagens mais utilizadas na detecção de variantes genéticas. (Figura 2).

A grande vantagem desta técnica reside no facto de não ser necessário conhecimento prévio da estrutura e sequência do gene alvo. Delecções e/ou inserções podem ser detectadas pelo tamanho dos fragmentos obtidos. As diferenças de intensidades entre nas bandas

(assumindo que a quantidade de DNA é constante) pode ser atribuída à presença de mais de uma cópia do mesmo gene. Mutações pontuais podem também ser detectadas se estas alterarem as sequências de reconhecimento das enzimas de restrição, originando padrões de hibridação diversos.

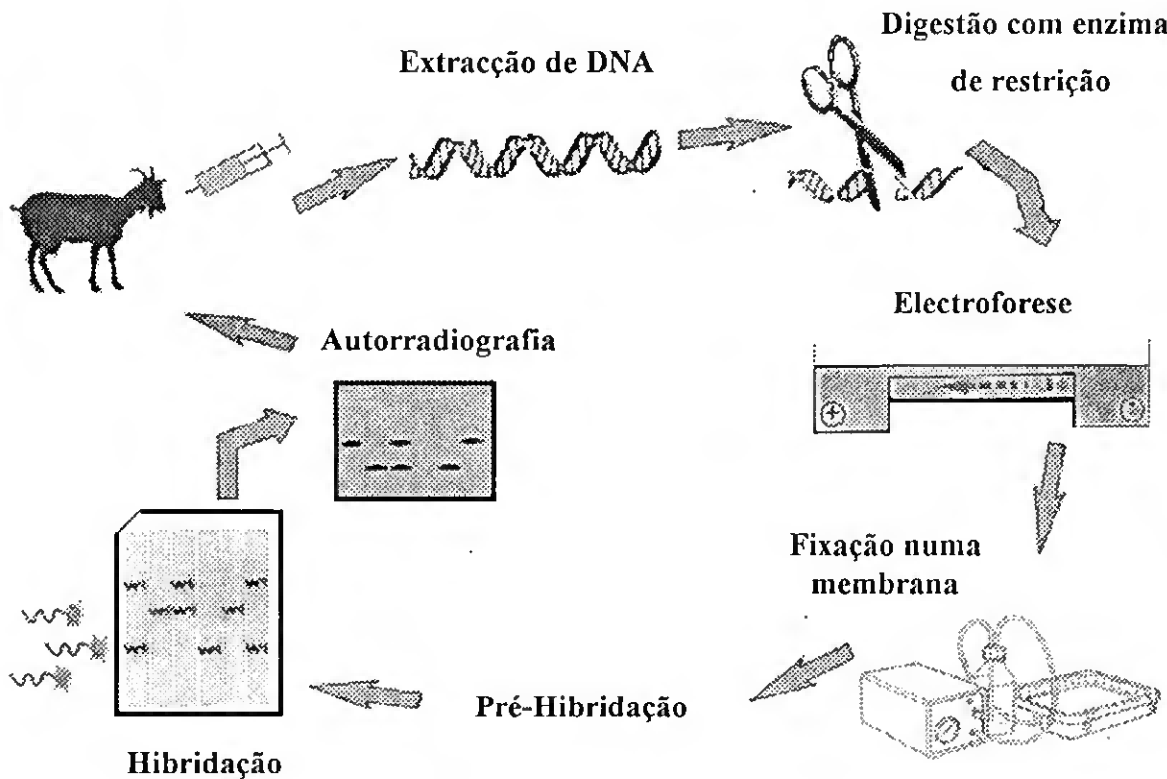


Figura 2. Principais etapas de detecção de polimorfismos de fragmento de comprimento de restrição (RFLPs).

Um outro tipo de método utilizado na detecção de polimorfismos é baseado na amplificação *in vitro* por PCR (Polymerase Chain Reaction). A utilização generalizada de métodos deste tipo advém do facto de se ter tornado acessível nos últimos anos informação sobre a sequência de um grande número de genes onde alterações simples de bases constituem o tipo de mutações mais comuns (mutações pontuais). Uma das abordagens possíveis consiste na chamada análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples, SSCP's (Orita *et al.*, 1989). Após a amplificação das sequências alvo estas são desnaturadas e separadas electrofóreticamente num gel não desnaturante de poliacrilamida (Figura 3). Esta técnica é baseada na observação de que a migração de pequenos fragmentos de DNA de cadeia monocatenária em gel não desnaturante é função não apenas do seu tamanho mas também da sua sequência. As moléculas de DNA monocatenárias resultantes da desnaturação assumem

uma conformação tridimensional e podem originar padrões electroforéticos distintos, caso existam diferenças em termos de sequência, mesmo pontuais.

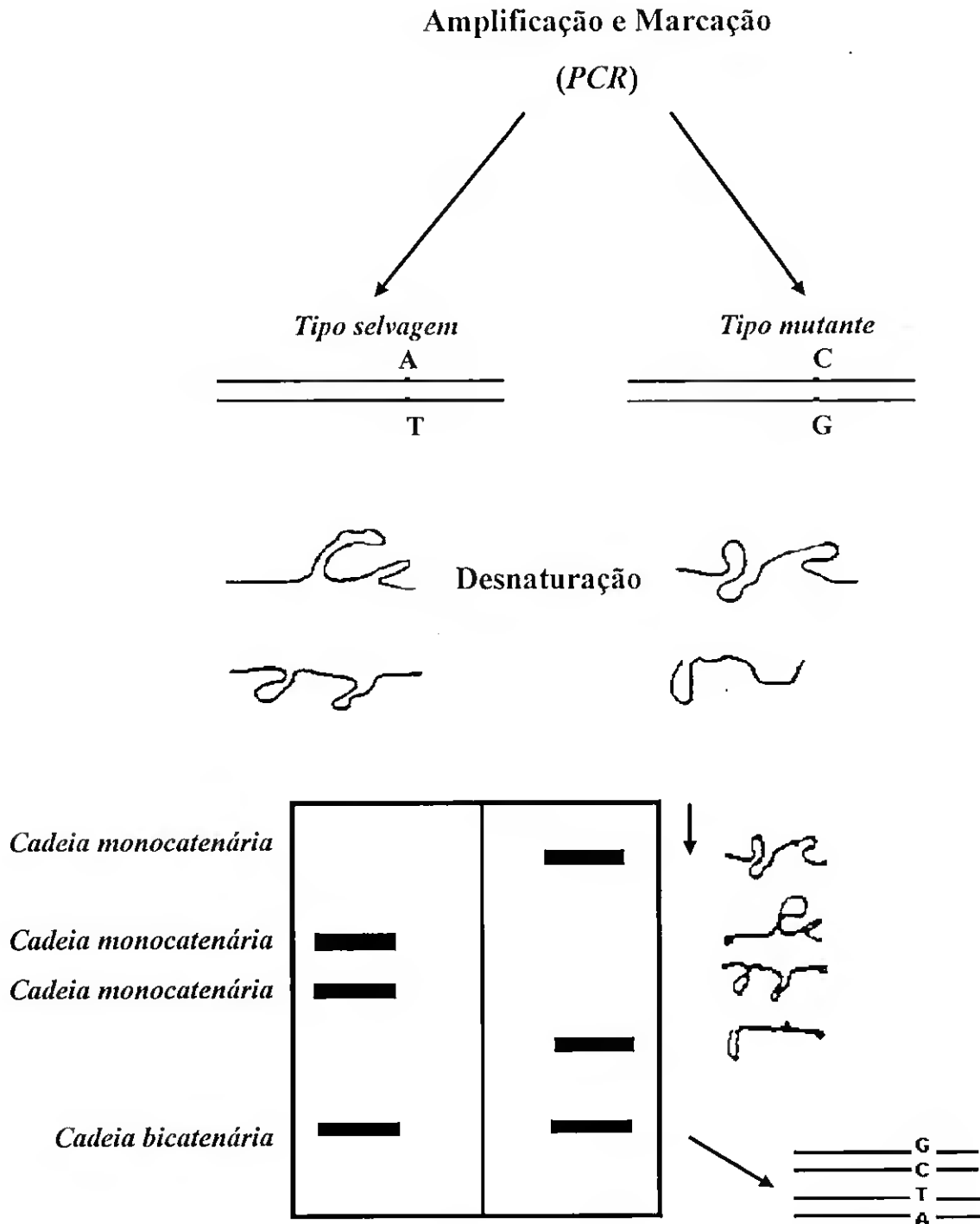


Figura 3. Detecção de polimorfismos conformacionais (SSCPs).

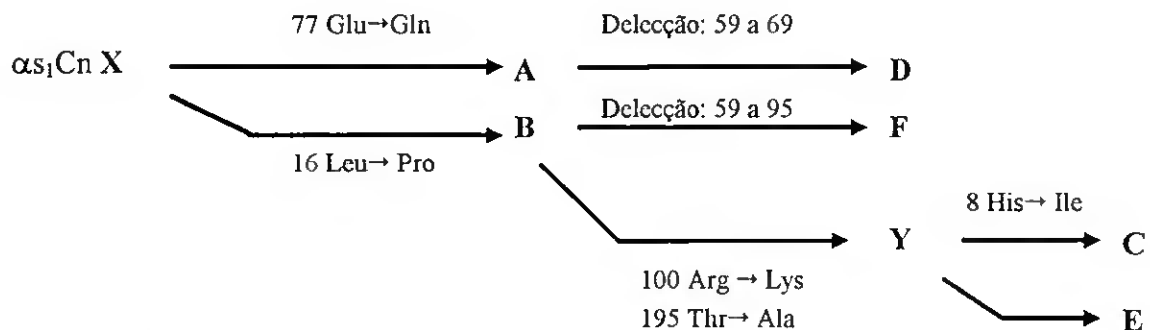
A grande vantagem da análise por SSCP, reside na sua relativa simplicidade e sensibilidade. Não são necessários passos adicionais após a amplificação via PCR e o método

permite o exame simultâneo de várias amostras. A visualização com recurso a isótopos radioactivos é o método que apresenta maior sensibilidade. Contudo, é possível a visualização por métodos não radioactivos utilizando por exemplo o brometo de etídio (Yap *et al.*, 1992) ou nitrato de prata (Mohabeer A. *et al.*, 1991). Vários parâmetros parecem afectar a sensibilidade do método. Esta parece decrescer com o aumento do tamanho do produto amplificado. Estudos efectuados (Hayashi K. *et al.*, 1993; Beier D, 1993; Fan *et al.*, 1993; Sheffield *et al.*, 1993) parecem demonstrar a eficiência da detecção de polimorfismos conformacionais atinge os 90% utilizando produtos PCR menores que 200 bp e 80% em fragmentos amplificados entre 300-400 bp. Contudo poderão ser utilizados fragmentos maiores desde que se proceda à sua digestão utilizando enzimas de restrição após a amplificação por PCR (Iwanana *et al.*, 1992). Outros factores tais como a temperatura de electroforese, composição do gel e concentração de tampão parecem ainda influenciar a eficiência desta técnica (Beier, 1993).

2.5. Variantes proteicas e nucleotídicas

Lactoproteínas caprinas

As variantes proteicas e relações filogenéticas existentes entre as seis principais lactoproteínas caprinas encontram-se esquematizadas na Figura 4.



β -CN A, B e 0

κ -CN A e B

α -La A e B

Figura 4. Polimorfismos genéticos e relações filogenéticas existentes entre as variantes das seis principais lactoproteínas caprinas. São indicadas as posições das substituições ou deleções na cadeia peptídica. As variantes x e y correspondem a variantes hipotéticas em investigação. (Adaptado de Martin, 1993).

A α -Lactoalbumina caprina é pouco diferente da sua homóloga bovina. Duas variantes proteicas estão identificadas (Maes *et al*, 1976).

No que diz respeito à fracção caseínica, a β -caseína, componente maioritário dos leites caprinos, foi durante muito tempo considerada monomórfica nesta espécie, até que a análise de leite de cabra da raça Garganica revelou a existência de um provável alelo nulo (Dall'Ólio *et al* 1989). Este fenótipo foi detectado numa população local de cabras corsas (Mahé, 1989) e mais recentemente num grupo de cabras crioulas de Guadalupe com uma frequência relativamente elevada (20%) (Mahé & Grosclaude, 1993). Segundo estes autores, que referem igualmente a existência de um alelo B na β caseína muito raro (3%), existirão pelo menos dois alelos nulos. Dados recentes (Martin, 1993), estimam em pelo menos quatro alelos conhecidos para esta caseína.

Em relação à da κ -caseína caprina as duas variantes identificadas diferenciam-se por uma substituição supostamente localizada na região N-terminal (paracaseína κ) da molécula, e denominadas κ -CN A e κ -CN B por analogia com as variantes bovinas (Di Luccia *et al* 1990).

Em relação à α ₁-CN caprina, estudos iniciados há mais de uma década (Boulanger *et al.*, 1984; Grosclaude *et al.*, 1987) evidenciaram a pouco usual complexidade do polimorfismo desta caseína. Deste modo, o *locus* α ₁-CN é caracterizado pelo seu extremo polimorfismo e pela sua associação a uma variabilidade alélica quantitativa. Existem pelo menos 7 alelos que se distribuem em quatro classes quantitativas: os alelos A, B e C associados a uma taxa elevada de síntese de α ₁-CN (3,6 g/l por alelo) o alelo E associado a uma taxa intermédia (1,6 g/l, por alelo), os alelos F e D associados a uma taxa reduzida (0.6 g/l) e o alelo 0 que confere um fenótipo nulo, ou seja um animal homozigótico 0/0 não sintetiza α ₁-CN. A análise da estrutura primária da variantes A, B, C e E mostra que estas se diferenciam entre si por variações ao nível de substituições em alguns aminoácidos enquanto que as variantes D e F apresentam alterações estruturais muito profundas, materializadas por deleções internas, de respectivamente 11 e 37 aminoácidos, incluindo o local de fosforilação múltiplo desta caseína (Figura 4.). A variante A distingue-se da variante B por substituições Pro→Leu na posição 16 e Glu→Gln na posição 77. As variantes C e E possuem um resíduo de Lisina na posição 100 e um resíduo de Alanina na posição 195, ao passo que os outros alelos apresentam respectivamente nestas duas posições um resíduo de Arginina e um resíduo de Treonina respectivamente. A variante C diferencia-se de todas as outras pela presença de um resíduo de Isoleucina na posição 8. A análise dos transcritos dos alelos F e A permite dizer que a deleção

interna de 37 resíduos, característica da variante F, é consequência da eliminação de três exões (9, 10, e 11) no decurso dos processo de maturação dos transcritos primários (Leroux *et al.*, 1992). A causa deste facto reside provavelmente numa deleção de um único nucleótido no exão 9 (Martin, 1993). No alelo E existe provavelmente uma inserção de 458 bp no último exão que corresponde a uma região importante da extremidade 3', não codificante do mRNA. Esta inserção estaria implicada na redução da taxa de síntese desta variante em virtude de influenciar a estabilidade/tradutabilidade do mRNA correspondente (Martin, 1993).

A distribuição da frequência dos vários alelos encontra-se representada na Tabela 4. Da observação da tabela pode verificar-se que os alelos E e F (associados a reduções na taxa de α_{S1} -CN do leite) predominam nas raças europeias.

Tabela 4. Frequência alélica no *locus* α_{S1} -CN em raças leiteiras caprinas europeias

Raça	País	Efectivo	Alelos						
			A	B	C	D	E	F	0
Alpina	França	213	0.14	0.05	0.01	-	0.34	0.41	0.05
Alpina	Itália	80	-	-	-	-	0.35	0.59	0.06
Saanen	França	159	0.07	0.06	-	-	0.41	0.43	0.03
Saanen	Itália	70	0.03	0.003			0.49	0.46	-
Poitevina	França	172	0.05	0.35	-	-	0.45	0.14	-
Granadina	Espanha	77	0.08	0.25	-	-	0.62	0.05	-
Malaguenha	Espanha	56	-	0.25	-	-	0.70	0.05	-

Adaptado de Martin, 1993.

Os polimorfismos da α_{S1} -CN caprina resultam em efeitos quantitativos e qualitativos. Assim, deleções ocorrendo nas variantes D e F removem partes altamente hidrofílicas da molécula incluindo um sítio de multifosforilação, envolvido na ligação ao cálcio e consequentemente na estrutura micelar. Este facto tem efeitos importantes nas propriedades físico-químicas da micela. Além disso a proporção relativa das quatro caseínas no leite de indivíduos homozigóticos F/F é diferente da presente em animais portadores de dois alelos associados com um nível elevado de α_{S1} -CN (ex: homozigótico A/A). Estas diferenças induzem alterações nas propriedades físico-químicas das variantes da α_{S1} -CN o que se reflete nas propriedades tecnológicas dos dois tipos de leite (Tabela 5).

Os alelos da α_{s1} -CN associados com um reduzido conteúdo em caseína (denominados alelos E e F) são largamente predominantes nas raças francesas (Tabela 4). Uma possibilidade de incrementar o conteúdo em caseína do leite, consiste em seleccionar indivíduos portadores dos alelos favoráveis. Contudo, antes de iniciar um programa de selecção em favor dos alelos fortes, é necessário averiguar outros possíveis efeitos do polimorfismo em caracteres produtivos e reprodutivos. As investigações realizadas neste sentido forneceram dados mostrando que este polimorfismo não tem aparentemente reflexos na quantidade do leite (Martin & Grosclaude, 1993). Além disso, revelam ainda que o leite proveniente de animais portadores de alelos fortes possui ainda um conteúdo em gordura superior. O alelo do tipo A/A exhibe micelas menores e produz uma quantidade de queijo superior ao tipo F/F devido ao seu elevado teor em caseína e gordura. O incremento da firmeza da coalhada observada em animais A/A, parece ser resultado de diferenças em relação à composição proteica.

Tabela 5. Genótipos no *locus* α_{s1} e associação com as propriedades físico-químicas e tecnológicas do leite.

Composição ou Propriedades do leite	Genótipos		
	A/A	E/E	F/F
Proteínas (g/l)	31.9	27.6	25.6
Caseína (g/l)	26.7	22.8	20.7
Gordura (g/l)	33.6	32.0	29.4
Cálcio (g/l)	1.19	1.10	1.06
Tamanho da micela (nm)	221	265	269
Firmeza da coalhada (mm)	5	4	3
Rendimento em queijo (kg/100Kg de leite)	21.7	19.1	18.3

A identificação de polimorfismos de restrição confirma este polimorfismo ao nível do DNA (Leroux C. *et al.*, 1990) e sugere, entre outras observações, que as deleções que ocorrem dentro da proteína poderão ser devidas a um *splicing* diferenciado mais que a deleções dentro do gene. A organização estrutural da unidade de transcrição da α_{s1} -CN caprina foi estabelecida parcialmente por PCR e sequenciação, tendo sido demonstrado que ambas as deleções que ocorrem nas variantes F e D, provêm de um processamento defeituoso do transcrito primário (Leroux *et al.*, 1992). O acontecimento mutacional responsável pelo *outslicing* dos três exões (exões 9, 10 e 11) durante o processamento dos transcritos

primários (pré-mRNA) da variante F, é provavelmente a deleção de uma simples base, que ocorre no primeiro exão não sujeito a *splicing* (exão 9). Contudo, mensageiros que sofreram um *splicing* correcto são também produzidos, assim como transcritos nos quais até cinco exões sofreram deleção. Nove diferentes transcritos foram isolados e caracterizados. Estas formas múltiplas poderão originar uma disfunção induzida da maquinaria de *splicing*, que falha no reconhecimento dos sítios de *splicing* diminuindo assim a eficácia do processo. Este facto poderá ocasionar uma menor quantidade de mRNA sintetizado e assim uma redução da quantidade de α_1 -CN no leite. No alelo E existe uma inserção de 458 bp no último exão do gene (19º exão). Esta inserção poderá estar envolvida na redução do conteúdo em α_1 -CN no leite de cabras portadoras do alelo E.

Lactoproteínas ovinas

Em ovinos a descrição do polimorfismo das lactoproteínas é muito limitado, quando comparado com os caprinos ou os bovinos (Leveziel *et al.*, 1991), não tendo sido estabelecidas correlações entre os polimorfismos observados e caracteres produtivos.

Na β -CN foi identificado um polimorfismo por análise ao nível proteico (King J., 1967; Leveziel H. *et al.*, 1991.); foram ainda determinados RFLPs neste *locus* utilizando as enzimas de restrição *Bgl* I e *Taq* I (Leveziel, *et al.*, 1991; Di Gregorio *et al.*, 1991).

No *locus* da α_1 -CN foram também determinados dois polimorfismos de restrição (RFLPs) utilizando as enzimas de restrição *Bgl* I e *Taq* I (Leveziel *et al.*, 1991; Di Gregorio *et al.*, 1991).

Em relação à κ -CN foram determinadas duas variantes nucleotídicas utilizando as enzimas de restrição *Pvu* II e *Hind* III (Leveziel *et al.*, 1991; Di Gregorio *et al.*, 1991).

2.6. Relações genéticas entre *locus* e localização cromossómica

Foi descrito em bovinos um polimorfismo genético das quatro caseínas, ligadas num *cluster* autossómico (Grosclaude, 1965; 1978). De igual forma, uma ligação entre os loci das α -caseínas foi proposta em cabras (Boulanger *et al.*, 1984). Em ovelhas, estudos efectuados (King, 1967; Arave *et al.*, 1973; Di Stasio, 1983; Dall'Ollio & Gellin, 1989) referem a presença de um padrão polimórfico denominado complexo α -CN ($\alpha_1 + \alpha_2$). Mais tarde (Leveziel H.

et al., 1991) foi estabelecido que os genes destas quatro caseínas se encontram organizados formando um *cluster* autossómico à semelhança do que acontece em bovinos e caprinos (Figura 5). Nos bovinos, os genes das quatro caseínas foram localizados no cromossoma 6 enquanto que nos ovinos e caprinos foram localizados no cromossoma 4 (Mercier & Vilotte, 1993).

O gene codificante para a α -lactoalbumina caprina está localizado no cromossoma 5 (Vilotte *et al.*, 1991) e em ovinos no cromossoma 3 (Martin, 1993).

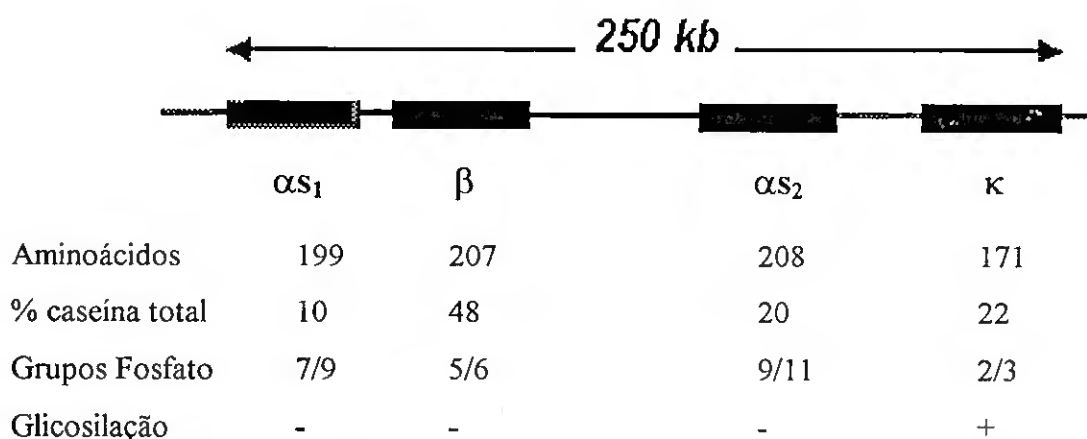


Figura 5. Organização dos genes codificantes das caseínas no *locus* Cn e principais características estruturais das proteínas correspondentes em caprinos.

3. Factores de Crescimento

O crescimento é um fenómeno complexo. Investigações realizadas em bovinos (Renaville *et al.*, 1992; 1994; 1995), indicam que as hormonas do eixo somatotrópico, em particular a somatotropina (ou hormona de crescimento, GH) e as somatomedinas (ou *Insulin Like Growth Factors*, IGFs), desempenham um papel fundamental no controlo do crescimento.

A obtenção por recombinação genética de grandes quantidades de GH, permitiu a realização de investigações de longa duração, num número de animais considerável, sobre o papel da GH no crescimento. Os resultados apontam para um efeito directo da GH sobre a taxa de síntese proteica (MacRae *et al.*, 1991). Em bovinos, a maioria das observações indica que a administração de GH favorece essencialmente a produção leiteira (West *et al.*, 1990). A administração de somatotropina induz ainda um aumento sensível nos teores plasmáticos de IGF-I em bovinos (Lemal *et al.*, 1989), pelo que é de esperar um efeito positivo das

somatomedinas sobre o crescimento e produção leiteira. Por outro lado a actividade biológica da GH e dos IGFs está sob dependência directa dos seus receptores celulares, GHR e IGF-R. Desta forma estes genes poderão ser candidatos interessantes na identificação de marcadores genéticos e sua associação com parâmetros produtivos.

3.1. A hormona de crescimento (GH)

Estrutura e origem da hormona de crescimento (GH)

A hormona de crescimento (GH) ou somatotropina (STH) é um polipéptido monocatenário, de 217 aminoácidos com um peso molecular de 22 kDa. Possui duas pontes bissulfito intramoleculares e é sintetizada pelas células acidófilas (somatotróficas) do lobo anterior da hipófise (Baumann, 1991).

Regulação da secreção da GH

Em mamíferos adultos, a secreção da hormona de crescimento está sob controlo hormonal complexo (Figura 6); é influenciada pelas hormonas hipotalâmicas, a TRH ("Thyrotropin Releasing Hormone") e pela GRF ou somatocrinina ("Growth Hormone Releasing Factor"), que estimulam a sua secreção e ainda pela somatostatina ou SRIF, ("Somatotropin Inhibitory Factor") que a inibe (Bachman *et al.*, 1993).

Estrutura do gene da hormona de crescimento (GH)

Os genes que codificam para a hormona de crescimento em ratos, humanos, bovinos, ovinos e caprinos foram sequenciados e publicados (Barta *et al.*, 1981; DeNoto *et al.*, 1981; Woychik *et al.*, 1982; Orian *et al.*, 1988; Kioka *et al.*, 1989) sendo muito conservados nestas espécies. A homologia entre a sequência nucleotídica da hormona de crescimento (GH) caprina e as suas homólogas ovina, bovina, porcina e humana é de respectivamente 99%, 98%, 90% e 74% (Kioka *et al.*, 1989).

Ao contrário da hormona de crescimento humana em que existem pelo menos cinco *genes tipo GH*, nos bovinos apenas existe uma simples cópia (Gordon *et al.*, 1983). Nos ovinos existem duas cópias do gene da hormona de crescimento separadas por 3.5 Kb estando

os seus promotores separados por apenas 5 kb. A sua proximidade faz supor que não se trata de um pseudo gene e que esta ligação próxima poderá afectar os seus modos de expressão (Valinsky *et al.*, 1990; Gootwine *et al.*, 1993).

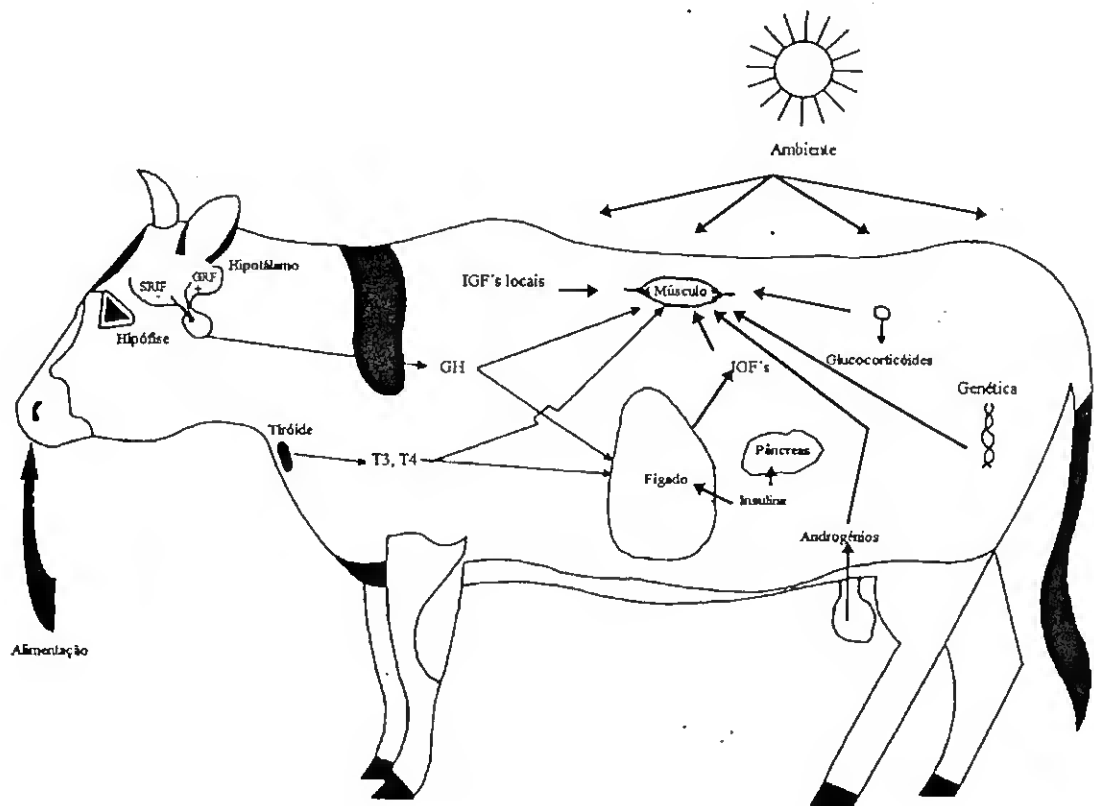


Figura 6. Principais factores que influenciam a regulação do crescimento nos bovinos.(SRIF=somastostatina; GRF=somatocrinina; IGFs="Insulin Like Growth Factors" ou somatomedinas; GH= hormona de crescimento ou somatotropina; T3=Triiodotironina; T4 =Tiroxina).

Adaptado de Renaville *et al.*, 1992.

O gene caprino da hormona de crescimento (gGH) tem cerca de 2,5 kb e é constituído por cinco intrões e cinco exões (Kioka *et al.*, 1989). A sequência do promotor é altamente conservada atingindo homologias nucleotídicas de 98% em relação aos bovinos. A homologia ao nível do cDNA com bovinos atinge os 99%.

O gene ovino da hormona de crescimento (oGH) tem cerca de 2.5 kb e é constituído por cinco exões e cinco intrões. A sequência do promotor é altamente conservada atingindo homologias nucleotídicas de 98% em relação aos bovinos. A homologia ao nível do cDNA com bovinos atinge os 99% (Byrne *et al.*, 1987).

3.2. O receptor celular da GH (GHR)

Designa-se por receptor da hormona de crescimento (*Growth Hormone Receptor*, *GHR*) o seu receptor celular, sendo necessário para que a hormona de crescimento (GH) exerça a sua acção. Foi sugerido que a *GH-binding protein* (GHBP) seja igualmente um produto do gene do receptor da hormona de crescimento (GHR) originado por um mecanismo de *splicing* diferenciado (Baumbach *et al.*, 1989; Moody *et al.*, 1995). Certas mutações no gene da GHR foram associadas com o nanismo em galinhas (Burnside *et al.*, 1992; Moody *et al.*, 1995) e humanos (Godowski *et al.*, 1989; Moody *et al.*, 1995). A diversidade de acções da GH é provavelmente devida a variantes do receptor (Mathews, 1991). Receptores da GH foram encontrados em diferentes tecidos nomeadamente nos hepatócitos, adipócitos, linfócitos, macrófagos, fibroblastos, osteoblastos e células epiteliais da próstata (Mathews, 1991). O mRNA que codifica para o receptor foi detectado ao nível do fígado, tecidos adiposos, rins, hipófise anterior e ao nível da glândula mamária (Hauser *et al.*, 1990; Mathews, 1991) pondo em causa as hipóteses que refutam a acção directa da GH sobre a glândula mamária.

Estrutura do receptor



Os cDNAs do gene do receptor da hormona de crescimento em diversas espécies nomeadamente humanos, bovinos e ovinos foram clonados e sequenciados (Godowski *et al.*, 1989; Hauser *et al.*, 1990; Adams *et al.*, 1990). Estes cDNAs codificam para uma proteína madura de 614-626 aminoácidos, compreendendo um péptido sinal de 18-25 resíduos. Análises de hidropatia sugerem que a proteína contém um domínio extracelular de ~250 aminoácidos, uma porção transmembranar hidrófila de ~24 aminoácidos e um domínio intracelular de ~350 aminoácidos (Hauser *et al.*, 1990; Adams *et al.*, 1990). Estudos comparativos da sequência de a.a. entre receptores de diversas espécies mostram um elevado grau de homologia (Hauser *et al.*, 1990).

Em bovinos, foram identificados dois tipos de receptores: um com fraca afinidade pela GH e outro com uma afinidade elevada pela GH e muito sensível à degradação proteolítica (Breier B. H. *et al.*, 1988). Foi igualmente sugerido (Mathews, 1991) que a diversidade da acções da GH é devida à presença de variantes de receptores.

Regulação da síntese do receptor

A GH constitui o principal factor de regulação do seu receptor, com dois tipos de influências opostas. Nos bovinos a administração de GH induz um aumento do número de receptores com alta afinidade para a GH, enquanto que o número de receptores com baixa afinidade permanece inalterado (Breier & Gluckman, 1991). Com o aumento progressivo das concentrações séricas de GH, um efeito oposto começa a ser exercido sobre o número de receptores (Breier *et al.*, 1988).

3.3. "Insulin-like Growth Factor" (IGF)

Estrutura e origem dos IGFs

Os IGFs apresentam uma estrutura similar à da proinsulina e daí o nome de "Insulin-like Growth Factor". Foram isolados dois IGFs com um peso molecular ~7500 Da: IGF-I, polipéptido de 70 aminoácidos que regula principalmente o crescimento pós-natal e IGF-II, polipéptido de 67 aminoácidos, que controla o crescimento embrionário. Existem homologias muito fortes entre as sequências da IGF-I em diversas espécies animais nomeadamente humanos, bovinos e ovinos. O mesmo não acontece em relação à IGF-II que parece ser altamente específica (Lemal *et al.*, 1989). Os IGFs são produzidos por um grande número de tecidos, mas essencialmente pelo fígado. Foi demonstrado (Eingmann *et al.*, 1984) que as raças de cães de grande porte possuem teores plasmáticos de IGF-I mais elevados do que as raças de cães de pequeno porte e que pacientes com acromegalia apresentam taxas de IGF-I superiores à média da população verificando-se o oposto em pigmeus. Os IGFs são factores essenciais ao crescimento de certos tecidos e têm um efeito directo sobre o peso corporal e desenvolvimento do esqueleto. Alguns resultados preliminares (Renaville *et al.*, 1995) apontam ainda para uma possível ligação entre níveis elevados de GH endógena e secreção de IGF-I, com produções de leite. Assim o gene que codifica para o IGF-I poderá ser um sério candidato na identificação de marcadores genéticos servindo de base para o estabelecimento de relações com parâmetros zootécnicos.

Papel da GH e sua relação com o IGF-I.

A GH é reconhecida principalmente pelo seu papel no crescimento em geral. Possui assim um certo número de efeitos específicos que se podem subdividir em duas categorias 1) por um lado a sua influência directa sobre o crescimento que se efectua essencialmente através do IGF-I e 2) os seus efeitos directos sobre o metabolismo dos carbohidratos e lípidos.

A hormona de crescimento induz a secreção dos IGFs (Davis *et al.*, 1987) em vários tecidos, mas principalmente no fígado. Estes factores circulam no plasma associados às proteínas de ligação, que os protegem da proteólise (Daughaday, 1981). Dois receptores específicos dos IGFs foram identificadas: o primeiro com uma grande afinidade pelo IGF-I e que se liga debilmente ao IGF-II e o segundo que se liga preferencialmente ao IGF-II e sem afinidade pela insulina. O receptor do IGF-I possui uma estrutura similar ao receptor da insulina (Daughaday, 1981).

A presença de receptores de IGF-I foi posta em evidência ao nível dos tecidos mamários (Campbell & Baumrucker, 1986) e a administração por via arterial de IGF-I recombinante em caprinos traduz-se por um aumento da produção leiteira (Prosser *et al.*, 1990). O mesmo efeito não foi obtido com a administração de GH (MacDowell *et al.*, 1987).

A hormona de crescimento exógena estimula o crescimento do parênquima mamário (Sejrsen *et al.*, 1986). Um tratamento com GH induz o aumento do conteúdo proteico do leite (Bauman. *et al.*, 1985) sendo a quantidade de α -La no leite proporcional à dose de GH injectada (Eppard *et al.*, 1985). Por outro lado a identificação recente de um receptor mamário da hormona de crescimento (Glimm *et al.*, 1990) permite formular a hipótese de uma acção directa desta hormona sobre a glândula mamária.

3.4. Variantes genotípicas

A identificação de variantes genotípicas e sua relação com caracteres de produção têm sido alvo de investigação durante os últimos anos. O uso de marcadores genéticos ligados a genes codificantes para factores de crescimento e/ou seus receptores, que possuem papel importante no crescimento e produção de leite, torna possível a verificação do seu significado biológico. Além disso torna possível a selecção precoce de animais portadores dos chamados "alelos fortes" que correspondem a animais que exibem características produtivas vantajosas.

A identificação de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLP's) no seio do gene que codifica para a hormona de crescimento ou em regiões flanqueadoras, e a sua correlação com características fisiológicas, pode ser uma fonte de marcadores genéticos para o crescimento e/ou produção de leite (Beckmann & Soller, 1983). Em bovinos foram detectados RFLP's no mesmo gene (Hallerman *et al.*, 1987, Cowan *et al.*, 1989) e foram estabelecidas correlações entre estes polimorfismos e caracteres de produção (Hoj, 1993; Lucy *et al.*, 1993; Rocha *et al.*, 1992).

Polimorfismos de restrição no gene ovino codificante para a hormona de crescimento (oGH) (Valinsky *et al.*, 1990; Parsons *et al.*, 1992; Gootwine *et al.*, 1993; Montgomery *et al.*, 1995) e no gene da "Insulin Like growth Factor" (oIGF-I) foram também assinalados (Adams & Maddox, 1994). Em caprinos foi referida a existência de bandas resultantes da digestão de DNA genómico e hibridação com uma sonda bovina (bGH) em 7 cabras Saanen (Valinsky *et al.*, 1990). Contudo não foi feita qualquer correlação entre estes polimorfismos e caracteres produtivos ou outros.

4. Características das raças estudadas

As raças tradicionais constituem um valioso património genético nacional sendo o suporte económico de um extracto da população rural que sobrevive em zonas agrícolas demasiado austeras. No presente estudo foram analisados animais provenientes de duas raças tradicionais, a raça caprina Algarvia e a ovina Serra da Estrela, tendo-se identificado algumas variantes lactoproteicas e estudado a relação entre estas variantes e parâmetros de produção.

4.1. Raça caprina Algarvia

Origem

Desconhece-se a sua origem, embora se admita que esta raça resulte de um cruzamento entre a raça Charnequeira (Alentejo) e animais de raças exóticas de Espanha e Marrocos.

Importância e distribuição geográfica

A raça Algarvia deve o seu nome à sua zona de dispersão: o Algarve. O caprino algarvio distribui-se numa das zonas mais desfavorecidas da Serra e Barrocal onde se inclui a totalidade dos Concelhos de Alcoutim e as freguesias do interior do Concelho de Castro Marim (vulgo Nordeste Algarvio).

O meio é pobre em pastagens cultivadas ou espontâneas, com predomínio de espécies arbustivas (Cistáceas e Lavândulas) e herbáceas anuais. O relevo é bastante irregular e com declives acentuados, com uma queda pluviométrica anual baixa (500 a 600 mm) e concentrada num curto período de tempo. Os solos, esqueléticos de xistos e grauvaques, são de fraca aptidão agrícola.

O efectivo actual desta raça é de cerca de 8 000 animais o que corresponde a cerca de 50% do efectivo caprino algarvio e a 3% do efectivo nacional.

Maneio alimentar

A alimentação do caprino algarvio é sobretudo à base de forragens naturais e dos subprodutos da exploração agrícola. O sistema e modo de apascentação varia ao longo do ano e está condicionado à abundância/escassez de pastos e às condições climáticas sendo desta forma muito dependente do meio.

Produtividade

As suas potencialidades produtivas colocam-na em lugar de destaque no panorama caprino nacional, sendo a segunda melhor raça nacional caprina produtora de leite. Além disso têm sido determinadas variedades superiores próximas das raças exóticas especializadas pelo que é de admitir uma possível resposta positiva a acções de melhoramento e selecção (Tabela 6). As produções médias de leite atingem 404 a 524 kg de leite em 278 dias de lactação com um máximo de 730.5 kg em 204 dias.

Tabela 6. Parâmetros produtivos de caprinos pertencentes a duas raças caprinas francesas (Alpina e Saanen) e portuguesas (Algarvia).

Raças	Lactação (dias)	Leite (kg)	Teor proteico (%)	Teor butiroso (%)
Alpina	233	572	2.68	3.22
Saanen	245	623	2.65	3.14
Algarvia	278	524	3.5	3.7

Fonte: Direcção regional de Agricultura do Algarve

Em termos de produção de carne a sua modesta aptidão creatopoiética é compensada pela elevada prolificidade, fertilidade e fecundidade (Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros reprodutores dos caprinos de raça Algarvia;

Parâmetros (%)	1994/95	1995/96
Fertilidade	95	70
Prolificidade	1.65	1.9
Fecundidade	1.54	1.3

Fonte: Direcção regional de Agricultura do Algarve, 1996.

O peso médio à nascença é de 3,13 kg para os machos e 2,68 kg para as fêmeas sendo o peso médio na altura da venda de 8-10 kg (45 a 60 dias de idade) com rendimentos de carcaça de cerca de 63%.

4.2. Raça ovina Serra da Estrela

Origem

A origem desta raça remonta ao início da colonização humana nesta área da Península. As informações mais precisas indicam que a raça Serra da Estrela é descendente do grupo *Ovis aries ligeriensis* de Sanson (Sul e Centro de França).

Importância e distribuição geográfica

O solar desta raça situa-se nos vales e encostas da Serra da Estrela e no início do Vale do Mondego. Esta área está incluída nos distritos da Guarda, Coimbra e Viseu. Existem rebanhos noutras regiões tais como Góis, Pampilhosa da Serra, Lousã, Penela e Penacova. No entanto os parâmetros produtivos, nomeadamente no que diz respeito à quantidade de leite produzido, são inferiores às exibidas pelos animais oriundos da zona da Serra da Estrela.

A exploração deste gado é feita em pequenas explorações do tipo familiar com rebanhos pequenos (30 a 100 cabeças). Em virtude da sua excelente aptidão para a produção de leite, os criadores obtêm na actividade razoáveis proventos.

A população total é de cerca de 280 000 efectivos, sendo após a raça Merino Branco, a de maior expansão em Portugal.

Maneio alimentar

Os animais são explorados em regime extensivo alimentando-se à base de pastagens tradicionais e semeadas, muitas delas regadas. Como complementos utilizam-se fenos, subprodutos agrícolas e por vezes, já em muitas explorações alimentos concentrados. O rebanho é sempre acompanhado pelo pastor, regressando todas as noites ao curral.

Produtividade

O leite é sem dúvida o seu principal objectivo produtivo, para o qual manifesta elevado potencial, sendo a melhor raça ovina tradicional para a produção de leite em Portugal. A produção total por animal pode atingir 200 kg num período de lactação que compreende 7 a 8 meses. Alguns indivíduos atingem mesmo os 500 kg de leite por lactação o que excede o nível de produção das melhores raças exóticas.

O leite dos ovinos Serra da Estrela é escoado para a produção de queijo, constituindo matéria prima para o fabrico do queijo Serra da Estrela, o mais apreciado dos queijos portugueses.

4.3. Perspectivas

A diluição das assimetrias entre o Litoral e a Serra passa pela valorização produtiva de vastas áreas do território nacional, garantindo total ou parcialmente o rendimento e fixação das populações humanas nessas regiões. As raças tradicionais, tendo como principal qualidade a sua notável adaptação às zonas onde são exploradas poderão contribuir para a preservação e valorização destas regiões. A viabilização do seu futuro implica medidas concretas tais como :

- racionalização dos circuitos de comercialização e do maneio da exploração.
- implementação do registo Zootécnico dos contrastes leiteiros.
- estudo das potencialidades genéticas.
- melhoria e selecção dos efectivos mais representativos.

III. Material e Métodos

1. Animais

Foram analisados neste trabalho:

-77 caprinos da raça algarvia, provenientes de um núcleo caprino propriedade da Direcção Regional de Agricultura do Algarve (Unidade de Exploração do Paúl- Messines)

-70 ovinos da raça Serra da Estrela provenientes de um núcleo ovino propriedade da Estação Zootécnica Nacional (Fonte Boa-Vale de Santarém).

Os dados analisados nos caprinos compreenderam caracteres de produção de leite, vocação primordial desta raça. Foram efectuados contrastes quantitativos (quantidade de leite produzido em kg) e contrastes qualitativos (teor em gordura e proteínas) ao longo de 3 anos (1994, 1995 e 1996).

Os animais constituintes do rebanho de caprinos de raça Algarvia estudados foram adquiridos jovens e em diferentes explorações geograficamente distintas. O critério utilizado na constituição inicial do rebanho analisado foi apenas os relacionados com a observação do chamado *padrão de raça* (coloração e pelagem). Os animais constituem desta forma uma amostra aleatória ("*random*") e representativa dos caprinos de raça Algarvia.

2. Análises de laboratório

As análises de laboratório foram realizadas a partir de sangue (50 ml) recolhido por punção venosa, em EDTA (0.25%); o sangue foi conservado em gelo e processado 24 horas depois.

2.1. Lise diferencial

A 50 ml de sangue (amostra) foram adicionados 310 ml de água destilada e a mistura agitada durante 20 segundos. De seguida foram adicionados 90 ml de 5x PBS (35mM Na_2HPO_4 , 30mM KH_2HPO_4 , 0.15 M NaCl) e a mistura centrifugada (1100xg) durante 20

minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspenso em 30 ml de tampão 1x TNE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl; pH8).

2.2. Extração de DNA genómico

À suspensão resultante do procedimento anterior foram adicionados 300 µl de proteinase K pré digerida (concentração final de 20 mg/ml) e 1,5 ml de SDSa 10%. A solução foi incubada sob agitação durante 3 horas, a 37°C.

Ao obtido no procedimento anterior foram adicionados 2 ml de NaCl (4M) e 1 volume (~35ml) de fenol-clorofórmio. A mistura foi agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugada (25 minutos a 1550xg) e recuperada a fase aquosa. Esta operação foi repetida até que a fase aquosa se apresentou transparente. Foram adicionados dois volumes de etanol absoluto à fase aquosa e o DNA foi enrolado em redor de uma pipeta de Pasteur fechada e lavado com etanol a 70%. Em seguida foi ressuspenso em 4 ml de tampão 1xTE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). As amostras de DNA foram dissolvidas, sob agitação ligeira em períodos de tempo variáveis entre 5 a 30 dias, à temperatura ambiente, após o que foram armazenadas a 4°C.

2.3. Quantificação de DNA

Quando o DNA se dissolveu a sua concentração foi estimada medindo a sua densidade óptica (D.O) a 260 nm e a 280 nm. A concentração foi deduzida usando a relação IDO (260 nm) ~ 50 mg de DNA/ml. A concentração final foi obtida considerando a diluição utilizada para medir a D.O.

Uma indicação geral acerca da pureza do DNA é dada pelo quociente entre a absorvância a 260 nm e a 280 nm. O DNA extraído apresentou quocientes entre 1.8 e 2.

3. Detecção de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLPs)

3.1. "Southern Blot" (Southern, 1975)

Foram digeridos 10 µg de DNA genómico durante 4 horas utilizando 100 U de enzima de restrição (Amersham Int., Amersham, UK). Os fragmentos obtidos foram separados num gel de agarose a 0.8% e transferidos sob vácuo (VacuGene TM XL Blotting System, Pharmacia) para membranas carregadas positivamente (Nylon Hybond TM+, Amersham). O DNA foi fixado durante 2 horas num forno a 80°C. De seguida, as membranas foram pré hibridadas num período mínimo de 3 horas a 65°C, numa solução 3x SSC (1x SSC contém 0.15 M NaCl, 15 mM citrato de sódio, pH 7), tampão Denhardt concentrado 10x, 0,1% SDS e 200 µg/ml de DNA de esperma de salmão.

A hibridação foi realizada à temperatura de 65°C, numa solução de hibridação idêntica à anterior a que se adicionou $1,0 \times 10^8$ cpm de uma sonda desnaturada e marcada com deoxicidina 5'-(α - 32 P) fosfato (Amersham). As membranas foram lavadas 2x 30 minutos numa solução 2xSSC contendo 0.1% SDS e 2x 30 minutos numa solução 0.2x SSC contendo 0.1% SDS a 65°C. As membranas foram expostas durante 3 dias a -70°C num filme Kodak X-AR (Rochester, NY, USA) na presença de um ecrã reforçado. Os fragmentos de digestão de λ HindII e ϕ -X 174/HaeIII foram utilizados como marcadores moleculares

3.2. Sondas

As sondas utilizadas no presente trabalho foram elaboradas no Laboratório de Biologia Molecular e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agronómicas de Gembloux (Bélgica).

As sondas e enzimas de restrição utilizadas estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Sondas e enzimas de restrição utilizadas.

Sonda Utilizada			
	bGH	bGHR8	IGF-I
Caprinos de raça Algarvia	<i>TaqI</i> , <i>PstI</i> , <i>EcoRI/BamHI</i> e <i>PstI/HindIII</i>	<i>TaqI</i> , <i>MspI</i> , <i>SacI</i> , <i>EcoRI/BamHI</i> e <i>PstI/HindIII</i> ,	<i>SacI</i> e <i>EcoRI</i>
Ovinos de raça Serra da Estrela	<i>MspI</i> e <i>EcoRI</i>	<i>TaqI</i>	n.u.

n.u.: não utilizada

Sonda bGH

A sonda do gene GH bovino utilizado foi obtida da seguinte forma:

-um fragmento *BamHI-SmaI* de 1505 bp representando a porção do gene da hormona de crescimento (Gordon *et al*, 1983) da sétima base do exão 1 até à vigésima primeira base do exão 5 foi amplificado a partir de DNA genómico bovino e clonado no vector *pBluescript* KS+. A metodologia de ligação, transformação de *E.coli*, amplificação e purificação foram efectuados segundo os protocolos descritos (Sambrook *et al.*, 1989). O fragmento correspondente à sonda foi cortado do vector utilizando as enzimas de restrição *BamHI* e *SmaI* e separado do plasmídeo por electroforese em gel de agarose. O fragmento foi retirado do gel após o que se seguiu uma purificação utilizando um *Kit* comercial (Gene Clean, Westburg, Netherlands). Após verificação da sequência nucleotídica foi marcado radioactivamente e utilizado como sonda.

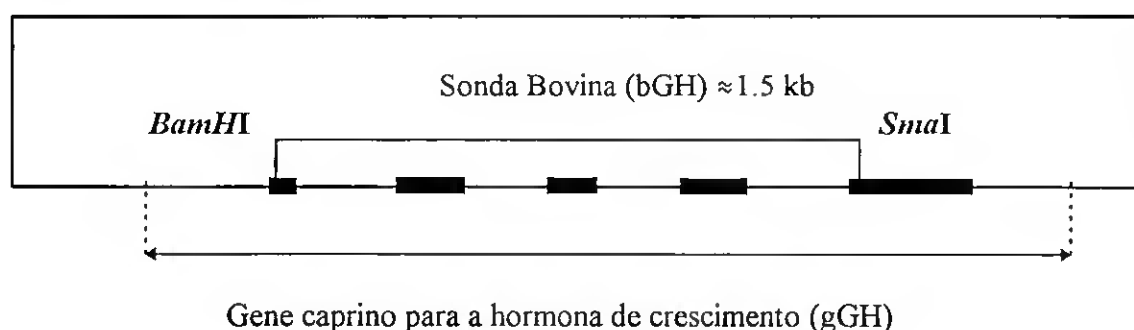


Figura 7. Região correspondente à sonda bovina para a hormona de crescimento bovina utilizada (fragmento de 1505 bp assinalado entre as enzimas de restrição *BamHI* e *SmaI*) e região homóloga do gene da hormona de crescimento caprino (gGH). As caixas a negro representam exões.

Sonda bGHR8

A sonda bovina GHR utilizada constitui um fragmento *EcoRI* de 1040 bp (denominada GHR8), contendo a região codante para a parte C-terminal da região intracelular do receptor (amino ácido 331 ao amino ácido 634) que se estende do nucleótido 1194 ao nucleótido 2233 do cDNA (Sneyers *et al.*, 1992).

Sonda bIGF-I

A sonda bovina IGF-I de ≈ 1.5 kb foi produzida por amplificação *in vitro* (PCR) e é correspondente à totalidade da região codificante do homólogo bovino.

Sondas bPRL e bIGF-R

A sonda PRL corresponde a um fragmento de 0.7 kb, tal como descrito por Luck *et al.*, 1986. A sonda do IGF-R foi preparada no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Agronômicas de Gembloux (Bélgica) e corresponde a um fragmento de 2.75 kb na região 3' do cDNA bovino.

4. Detecção de polimorfismos conformacionais (Sscp's) em proteínas do leite

4.1. Amplificação e marcação do DNA através da amplificação *in vitro* (PCR)

As amplificações de DNA foram realizadas utilizando 50 ng de DNA genómico, 3 pmol de cada *primer*, 25 μ M dNTP's, 1 μ Ci de α^{32} PdCTP (actividade específica > 5000Ci/mmol, Amersham), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 9), 0.1% Triton X-100 e 0.5 U de *Taq* DNA polymerase (Amersham) num volume final de 20 μ l. O programa de amplificação com 30 ciclos foi adaptado às condições de hibridação específica de cada par de *primes*. As condições de amplificação incluíram:

- desnaturação durante 5 minutos a 94°C
- 30 ciclos de:
 - desnaturação durante 30 segundos a 94°C.
 - *annealing* durante a 60°C ou 62°C.
 - extensão durante 30 segundos a 72°C.

A descrição dos *primers* utilizados bem como o gene alvo e a sua localização apresentam-se nas Tabela 9 (*Capra hircus*) e 10 (*Ovis aries*).

Tabela 9. *Primers* utilizados na detecção de polimorfismos conformacionais (*Capra hircus*)

Gene alvo	<i>Primers</i> Utilizados 5' → 3'	Localização
α_1 -Cn	GTTAGCAACCCATTAAGTGTGG GGATAGAGCTACATACATAGTG	exão 9
α_1 -Cn	TGATGTGTCTGGTTAATTAGC CACAAATTCTTGCTCATTCC	exão 10 e 11
β -Cn	CTTCTTTCCAGGATGAACTCC GACTTACAAGAATAGGGAAGG	exão 7
κ -Cn	GAGAAAGATGAAAGATTCTTCG GCTTCTGGATTATCTACAGTG	exão 5
α -La	CTCTTCCTGGATGTAAGGCTT AGCCTGGGTGGCATGGAATA	exão 1

Tabela 10. *Primers* utilizados na detecção de polimorfismos conformacionais (*Ovis aries*)

Gene Alvo	<i>Primers</i> Utilizados (5' → 3')	Localização
α_1 -Cn	TGATGTGTCTGGTTAATTAGC CACAAATTCTTGCTCATTCC	exão 10 e 11 (?)*
β -Cn	CTTCTTTCCAGGATGAACTCC GACTTACAAGAATAGGGAAGG	exão 7
κ -Cn	GAGAAAGATGAAAGATTCTTCG GCTTCTGGATTATCTACAGTG	exão 5 (?)*
α -La	CTCTTCCTGGATGTAAGGCTT AGCCTGGGTGGCATGGAATA	exão 1 (?)*

* Sequência não publicada

4.2. Desnaturação do produto amplificado

A mistura foi diluída dez vezes numa solução desnaturante (95% de formamida, 10 mM NaOH, 0.1% xileno cianol e 0.1% de azul de Bromofenol). As amostras foram desnaturadas pelo calor a 95°C durante 5 minutos e imediatamente colocadas em gelo picado.

4.3. Condições do gel e autorradiografia

Foram preparados 100 ml de gel não desnaturante, contendo 10 ml de glicerol, 15 ml de policrilamida-bisacrilamida (30: 0.8), 30 ml de TEMED, 800 µl de persulfato de amónio (0.1%) e 1X TBE (90 mM Tris-Borato, pH 8.3, 4 mM EDTA). O gel foi colocado num sistema de electroforese idêntico ao utilizado para sequenciação de ácidos nucleicos. Oito µl de amostra foram corridas durante 4 a 8 horas à temperatura ambiente com o tampão recirculado e arrefecido em gelo fundido. Após a electroforese o gel foi fixado numa solução contendo 10% de metanol e 10% ácido acético. Seguidamente foi transferido (Bio-rad gel dryer, mod 583), para uma folha de papel Whatmann 3 MM e autorradiografado (Hyperfilm-MP, Amersham) durante um período variável (\approx 16 horas) à temperatura ambiente.

5. Análise Estatística

Na análise estatística foram utilizados dados de rendimento leiteiro (kg de leite produzido), teor butiroso (%) e teor proteico (%) referentes aos anos de 1994, 1995 e 1996 provenientes de um rebanho de caprinos de raça Algarvia pertencentes à Direcção Regional de agricultura do Algarve (Unidade do Paúl-S.Bartolomeu de Messines). Os dados foram recolhidos individualmente sendo os animais submetidos a duas lactações diárias (manhã e tarde). Em cada contraste (inicialmente variável com a data do parto e posteriormente de 28 em 28 dias) foi medida a quantidade de leite produzido em kg (média da ordenha da manhã com a ordenha da tarde) e determinada a percentagem em gorduras e proteínas. Estes dados foram fornecidos pela Direcção Regional de Agricultura do Algarve após o que foram normalizados e corrigidos de acordo com os efeitos ambientais fixos ou seja a curva de lactação, a estação do ano e o tipo de parto (simples ou duplo). O tratamento dos dados desta forma dá-nos aquilo que é denominado de *predicted producing ability* (PPA) ou seja uma forma de estimar a superioridade de um determinado animal (Pander & Hill, 1993; Ptak E. *et*

al., 1993). Este tratamento dos dados foi feito para a quantidade de leite contrastada (kg), teor butiroso (%) e teor proteico (%). Os P.P.As obtidos foram de seguida ajustados a 305 dias de lactação. Posteriormente foi feita uma análise de contrastes lineares dos padrões RFLP e SSCP obtidos usando o programa SAS (SAS Institute, Cary, NC) e utilizando o procedimento MIXED (SAS PROCEDURE MIXED). A análise estatística foi realizada por Nicolas Gengler da Unidade de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agronómicas de Gembloux (Bélgica).

IV. Resultados

1. Detecção de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição.

Os fragmentos de restrição detectados e padrões electroforéticos correspondentes a 77 caprinos de raça Algarvia e 70 ovinos Serra da Estrela encontram-se resumidos nas Tabelas 12 (Caprinos) e 13 (Ovinos). Na figura 6 e seguintes estão representados os "padrões tipo" obtidos em 77 caprinos e 70 ovinos pertencentes às raças referidas à excepção da figura 8 em que a análise foi efectuada em 28 animais.

Tabela 12. Caprinos

Sonda	Enzima de Restrição	Tamanho dos fragmentos (kb)	Padrões Electroforéticos (Frequência)
GH	<i>TaqI</i>	5.8(A)* e 4.8(B)*	AB (1)
	<i>PstI</i>	2.5(A)*, 1.5(B)* e 1.0 (C)*	ABC (0.38) e BC (0.62)
	<i>EcoRV/BamHI</i>	8.9 (A)* e 4.9 (B)*	AB (1)
	<i>PstI/HindIII</i>	2.5(A)*, 1.5 (B)* e 1.0 (C)*	ABC (0.38) e BC (0.62)
GHR8	<i>TaqI</i>	5.5(A)* e 1.3(B)*	AB (1)
	<i>PstI/HindIII</i>	2.65(A)* e 1.2(B)*	AB (1)
	<i>BamIII/EcoRI</i>	3.65 (A)*	A (1)
	<i>MspI</i>	5.4 (A)*	A (1)
	<i>SacI</i>	4.6 (B)* e 1.8 (C)*	BC (1)
IGF-I	<i>EcoRI</i>	6.6 (A)*	A (1)
	<i>SacI</i>	7.8 (A)* e 4.6 (B)*	AB (1)

*Designação arbitrária

Tabela 13. Ovinos

Sonda	Enzima de Restrição	Tamanho dos fragmentos (kb)	Padrão Electroforéticos (Frequência)
GH	<i>MspI</i>	3.8 (A)*, 1.5 (B)* e 0.7 (C)*	ABC(1)
	<i>EcoRI</i>	16 (A)*, 12.2 (B)* e 6.7 (C)*	AB, ABC e AC
GHR8	<i>TaqI</i>	7 (A)*	A (1)

* Designação arbitrária

1.1. Hibridação no *locus* da hormona de crescimento (GH)

Os polimorfismos de restrição (RFLPs) detectados com a enzima de restrição *PstI* em caprinos e com a enzima de restrição *EcoRI* em ovinos estão indicados nas Figuras 6 e 8 respectivamente.

Polimorfismo GH-*PstI*

As Figuras 6 e 7 mostram os padrões electroforéticos tipo obtidos após digestão de DNA genómico de 77 caprinos de raça algarvia com as enzima de restrição *PstI* e *PstI/HindIII* e hibridação com uma sonda bovina da hormona de crescimento (bGH). Três fragmentos diferentes foram obtidos. Estes fragmentos de 2.5, 1.5 e 1.0 kb foram arbitrariamente designados por A, B e C.

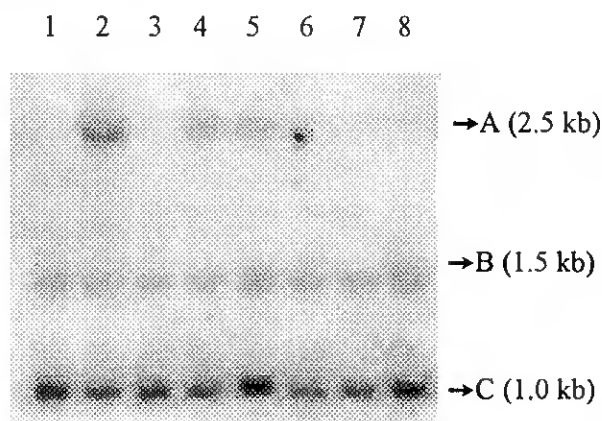


Figura 6. Autorradiografia dos fragmentos de restrição detectados após digestão do DNA genómico caprino com a enzima de restrição *PstI* e hibridação com uma sonda do gene da hormona de crescimento bovina (bGH). 1, 3, 6, 7 e 8 (padrão BC) e 2, 4 e 5 (padrão ABC). O tamanho dos fragmentos indicado em kb foi determinado por comparação com o dos marcadores moleculares λ /*HindIII* e ϕ X174 RF DNA/*HaeIII*.

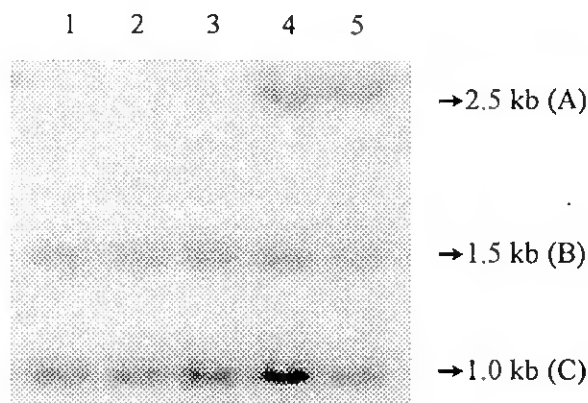


Figura 7. Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) no gene caprino codificante para a hormona de crescimento. As amostras de DNA genómico foram duplamente digeridas com as enzimas de restrição *Hind* III e *Pst* I e hibridadas com uma sonda do gene da hormona de crescimento bovino (bGH). 1,2 e 3 (BC), 4 e 5 (ABC). O tamanho dos fragmento (em kb) foi estimado por comparação com o dos marcadores moleculares λ *Hind*III e ϕ X174 RF DNA/*Hae*III

Polimorfismo GH-*EcoR* I

A Figura 8. mostra os padrões electroforéticos obtidos após digestão de DNA genómico ovino com a enzima de restrição *EcoR* I e hibridação com uma sonda para o gene bovino da hormona de crescimento. Foram obtidos três fragmentos diferentes. Estes fragmentos de 16, 12.2 e 6.7 kb foram arbitrariamente designados por A, B e C. Esta análise foi efectuada em apenas 28 animais pelo que estes resultados não foram considerados no tratamento estatístico posterior.

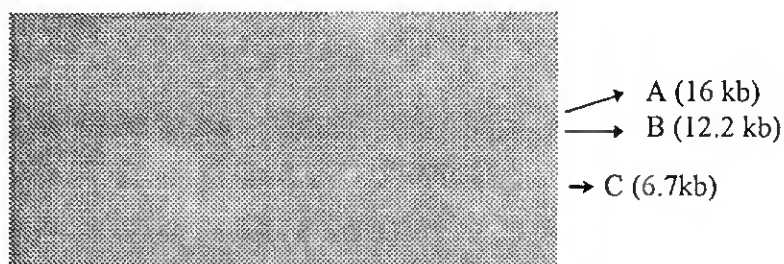


Figura 8. Hibridação com uma sonda do gene da hormona de crescimento bovina (bGH) de amostras de DNA genómico ovino após digestão com a enzima de restrição *EcoR*I O tamanho dos fragmentos é indicado à direita (kb) tendo sido estimado por comparação com o dos marcadores moleculares λ *Hind*III e ϕ X174 RF DNA/*Hae*III. Tal como referido anteriormente esta análise foi efectuada em 28 animais.

Outras análises de restrição

Um padrão electroforético foi registado após digestão de DNA genómico caprino com as enzimas *BamHI/EcoRI* (Figuras 9) e *TaqI* (Figura 10) e hibridação com uma sonda codificante para o gene da hormona de crescimento bovina (bGH). Contudo é de destacar as diferenças de intensidades entre as bandas observadas.

Nos ovinos, a digestão com a enzima *Msp I* e hibridação com a mesma sonda forneceu um padrão de hibridação semelhante em todos os animais (Figura 11)

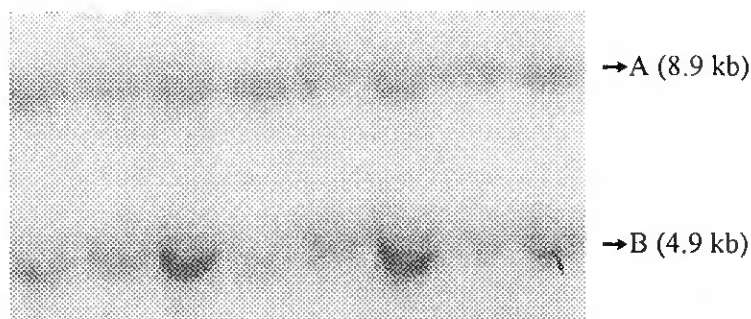


Figura 9. Padrão típico observado após dupla digestão de DNA genómico caprino com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* e hibridação com uma sonda codificante para o gene da hormona de crescimento bovina (bGH). O tamanho dos fragmentos (em kb) foi estimado por comparação com o dos marcadores moleculares λ *HindIII* e ϕ X174 RF DNA/*HaeIII*



Figura 10. Autorradiografia dos fragmentos de restrição detectados após digestão do DNA genómico caprino com a enzima *Taq I* e hibridação com uma sonda do gene bovino da hormona de crescimento (bGH). O tamanho dos fragmentos (em kb) foi estimado por comparação com o dos marcadores moleculares λ *HindIII* e ϕ X174 RF DNA/*HaeIII*

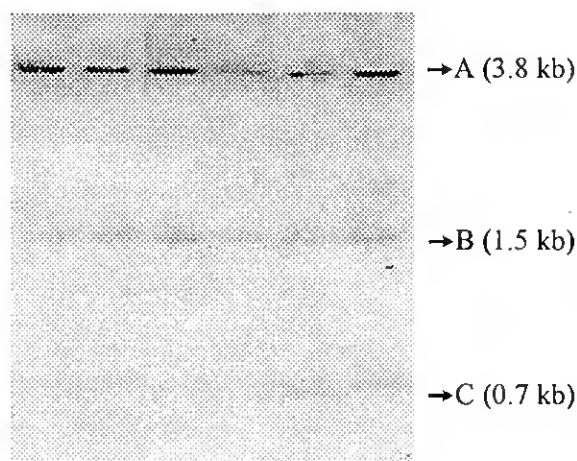


Figura 11. Autorradiografia dos fragmentos de restrição detectados após digestão do DNA genómico ovino com a enzima *Msp* I e hibridação com uma sonda do gene da hormona de crescimento bovino (bGH). O tamanho dos fragmentos (em kb) foi estimado por comparação com o dos marcadores moleculares λ *Hind*III e ϕ X174 RF DNA/*Hae*III

1.2. Hibridação no locus do receptor da hormona de crescimento (GHR)

A presença de uma só banda correspondente a um único padrão de hibridação foi constatada após a digestão de DNA genómico caprino com as enzimas de restrição *Taq*I, *Pst*I/*Hind*III, *Bam*HI/*Eco*RI, *Sac*I, e *Msp*I (Figuras 12, 13, 14, 15 e 16) e DNA genómico ovino com a enzima de restrição *Taq* I (Figura 17) e hibridação com uma sonda bovina do receptor da hormona de crescimento (bGHR8).

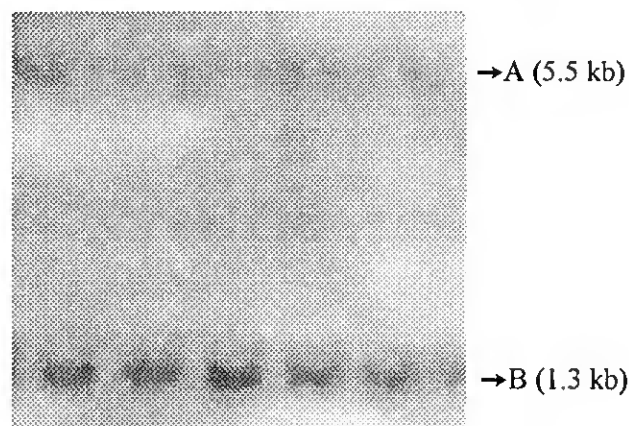


Figura 12. Padrão observado após digestão do DNA genómico caprino com a enzima *Taq* I e hibridação com uma sonda bovina do receptor do gene da hormona de crescimento (bGHR8). O tamanho dos fragmentos (em kb) foi estimado por comparação com o dos marcadores moleculares λ *Hind*III e ϕ X174 RF DNA/*Hae*III

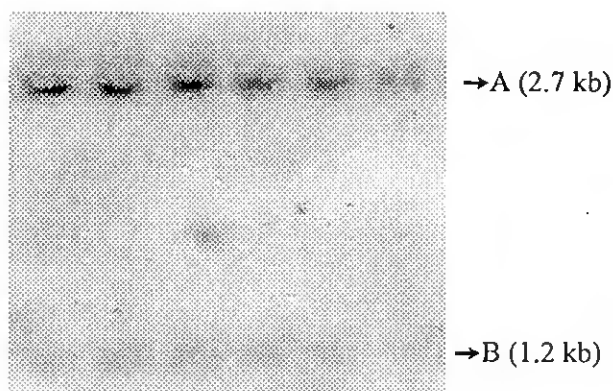


Figura 13. Autorradiografia dos fragmentos de restrição detectados após digestão do DNA genômico caprino com as enzimas *Hind* III/*Pst* I e hibridação com uma sonda do gene bovino do receptor da hormona de crescimento (bGHR8). O tamanho dos fragmentos (em kb) foi estimado por comparação com o dos marcadores moleculares λ /*Hind*III e ϕ X174 RF DNA/*Hae*III

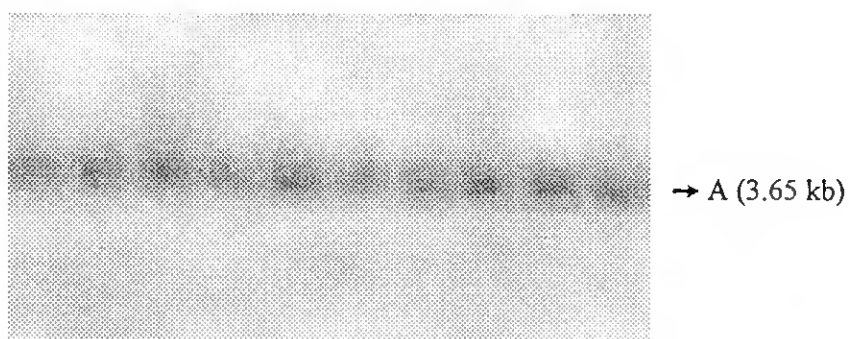


Figura 14. Padrão de hibridação detectado após digestão do DNA genômico caprino com as enzimas *Bam*HI/*Eco*RI e hibridação com uma sonda bovina do gene do receptor da hormona de crescimento (bGHR8). O tamanho do fragmento (em kb) foi estimado por comparação com o dos marcadores moleculares λ /*Hind*III e ϕ X174 RF DNA/*Hae*III

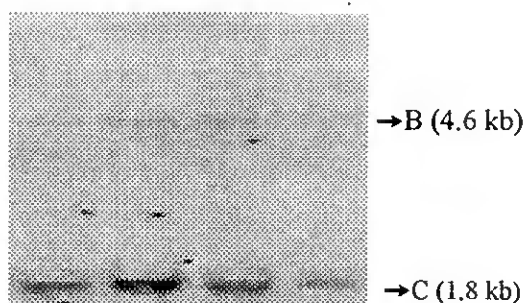


Figura 15. Autorradiografia dos fragmentos de restrição detectados após digestão do DNA genômico caprino com a enzima *Sac*I e hibridação com uma sonda do gene receptor da hormona de crescimento bovina (bGHR8). O tamanho dos fragmentos (em kb) foi estimado por comparação com o dos marcadores moleculares λ /*Hind*III e ϕ X174 RF DNA/*Hae*III.



Figura 16. Padrão de hibridação detectado após digestão do DNA genómico caprino com a enzima *Msp* I e hibridação com uma sonda bovina do gene do receptor da hormona de crescimento (bGHR8). O tamanho dos fragmentos (em kb) foi estimado por comparação com o dos marcadores moleculares λ *Hind*III e ϕ X174 RF DNA/*Hae*III

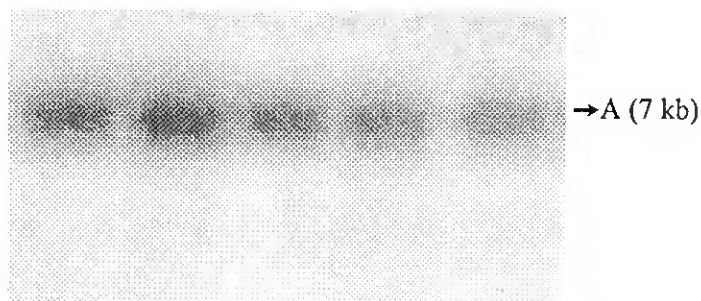


Figura 17. Autorradiografia dos fragmentos de restrição detectados após digestão do DNA genómico ovino com a enzima *Taq* I e hibridação com uma sonda do gene bovino do receptor da hormona de crescimento (bGHR8). O tamanho dos fragmentos (em kb) foi estimado por comparação com o dos marcadores moleculares λ *Hind*III e ϕ X174 RF DNA/*Hae*III

1.3. Hibridação no locus do " *Insulin Like Growth Factor* " (IGF-I)

Um padrão electroforético foi registado após digestão de DNA genómico caprino com as enzimas *Eco*RI e *Sac*I (Figuras 18 e 19) e hibridação com uma sonda do gene IGF-I bovino.

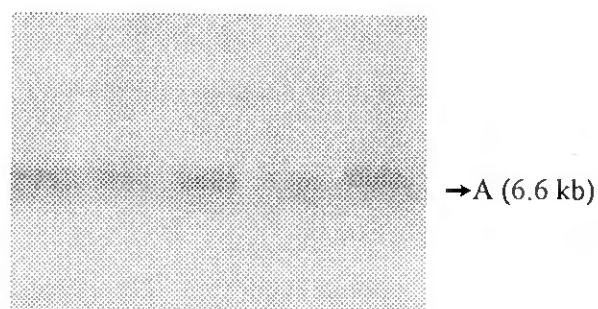


Figura 18. Autorradiografia dos fragmentos de restrição detectados após digestão do DNA genómico caprino com a enzima *EcoR* I e hibridação com uma sonda do gene bovino IGF-I. O tamanho dos fragmentos (em kb) foi estimado por comparação com o dos marcadores moleculares λ /*Hind*III e ϕ X174 RF DNA/*Hae*III

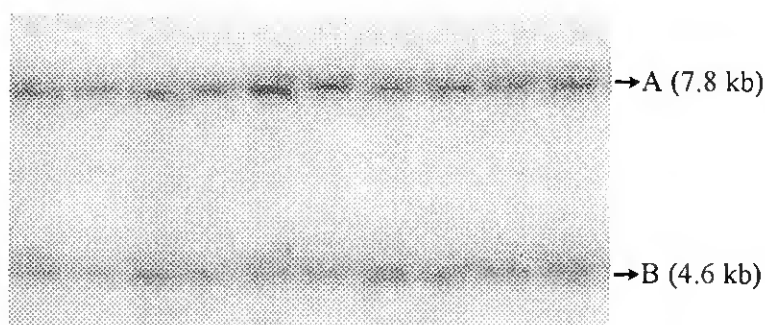


Figura 19. Autorradiografia dos fragmentos de restrição detectados após digestão do DNA genómico caprino com a enzima *Sac* I e hibridação com uma sonda do gene IGF-I bovino. O tamanho dos fragmentos (em kb) foi estimado por comparação com o dos marcadores moleculares λ /*Hind*III e ϕ X174 RF DNA/*Hae*III.

1.4. Hibridação no locus da prolactina (PRL) e do receptor do "Insulin Like Growth Factor" (IGF-R).

As sondas bovinas da prolactina (PRL) e do receptor celular do "Insulin Like Growth factor" (IGF-R) não hibridaram contra o DNA genómico ovino e caprino (caso da sonda IGF-R) ou resultaram em padrões de hibridação confusos e com muito *background* (caso da sonda PRL).

2. Detecção de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCPs)

Os padrões electroforéticos obtidos bem como as respectivas frequências referentes a 77 Caprinos de raça Algarvia e 70 Ovinos Serra da Estrela encontram-se na Tabela 14 e Tabela 15 respectivamente.

Tabela 14. Caprinos

Gene Visado/Exão(s)	Primers utilizados 5'→3'	Padrões Electroforéticos	Frequência
α_{S1} -CN (Exão 9)	GTTAGCAACCCATTAAGTGTGG GGATAGAGCTACATACATAGTG	3	^a ABC (0.397) ^a AB (0.588) ^a *BC (0.015)
α_{S1} -CN (Exões 10-11)	TGATGTGTCTGGTTAATTAGC CACAACATTCTTGCTCATTCC	3	^a AB (0.397) ^a AA (0.588) ^a *BB (0.015)
β -CN (Exão 7)	CTTCTTTCCAGGATGAACTCC GACTTACAAGAATAGGGAAGG	3	^a AAC (0.895) ^a *ABC (0.09) ^a BBC (0.015)
κ -CN (Exão 4)	GAGAAAGATGAAAGATTCTTCG GCTTCTGGATTATCTACAGTG	1	^a AB (1)
α -La (Exão 1)	CTCTTCCTGGATGTAAGGCTT AGCCTGGGTGGCATGGAATA	2	^a A ((0.64) ^a AB (0.36)

* Padrões electroforéticos de frequências raras que não foram considerados nas análises subsequentes.

^a Designação arbitrária

Tabela 15. Ovinos

Gene Visado	Primers utilizados 5'→3'	Padrões Electroforéticos	Frequência
α_{S1} -CN**	TGATGTGTCTGGTTAATTAGC CACAACATTCTTGCTCATTCC	1	1
β -CN (exão 7)	CTTCTTTCCAGGATGAACTCC GACTTACAAGAATAGGGAAGG	1	1
κ -CN**	GAGAAAGATGAAAGATTCTTCG GCTTCTGGATTATCTACAGTG	2	^a A (0.971) ^a *B (0.029)
α -La**	CTCTTCCTGGATGTAAGGCTT AGCCTGGGTGGCATGGAATA	1	1

^a Designação arbitrária; ** Sequência não publicada

* Padrão electroforético de frequência raras que não foi considerado na análise subsequente

Os fragmentos amplificados correspondem a regiões exónicas dos genes que codificam para lactoproteínas caprinas e ovinas. Os fragmentos amplificados utilizando os iniciadores referidos (*primers*) encontram-se representados na Figura 20 (β , κ , α_{s1} - Cn) e 21 (α -La).

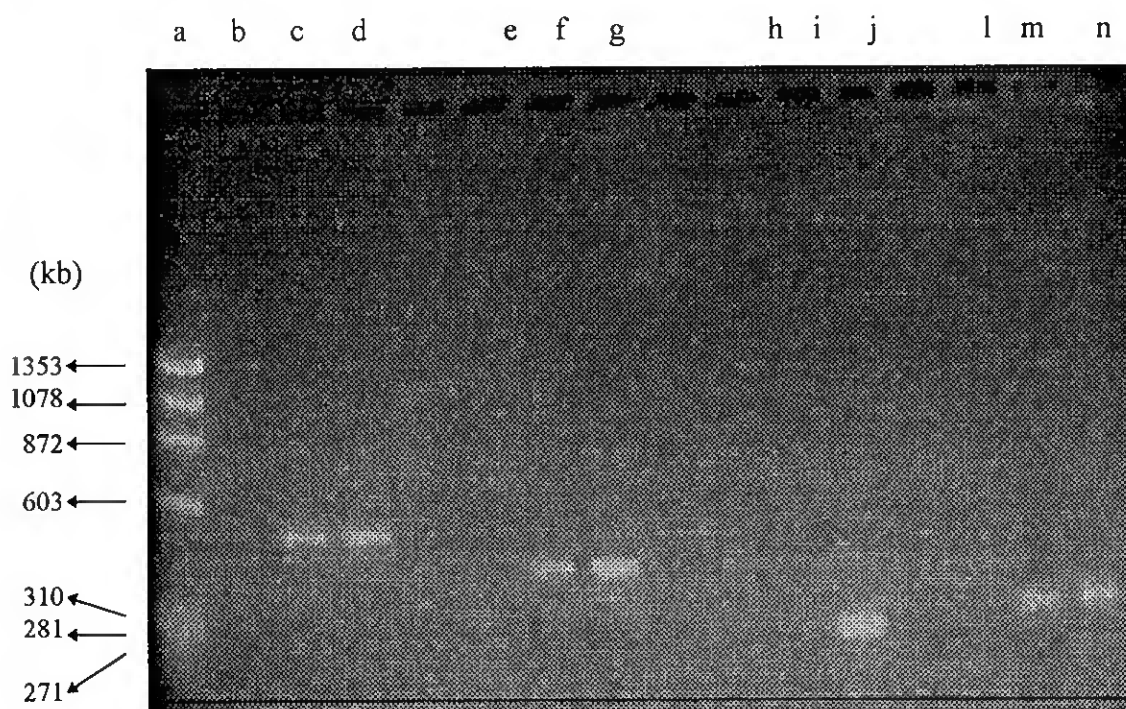


Figura 20. Visualização em gel de agarose a 2% dos fragmentos amplificados utilizando *primers* específicos para a β -CN (c e d), κ -CN (f e g), α_{s1} -CN exão 9 (I e j) e α_{s1} -CN exões 10-11 (m e n). c, f, I e m caprinos; d, g, j e n ovinos; controlos negativos b, e, h e m. Marcador molecular, *HaeIII* ϕ x174 a (em kb).

O tamanho dos fragmentos amplificados deduzido a partir das sequências publicadas é de 500 bp em caprinos e 512 bp em ovinos na β -CN, 367 bp em caprinos (κ -CN), 257 bp em caprinos (α_{s1} -CN, exão 9) e 305 bp em caprinos (α_{s1} -CN, exões 10-11).

De notar que não ocorreu amplificação utilizando os *primers* destinados a amplificar a sequência homologa ovina da α_{s1} -caseína caprina (exão 9).

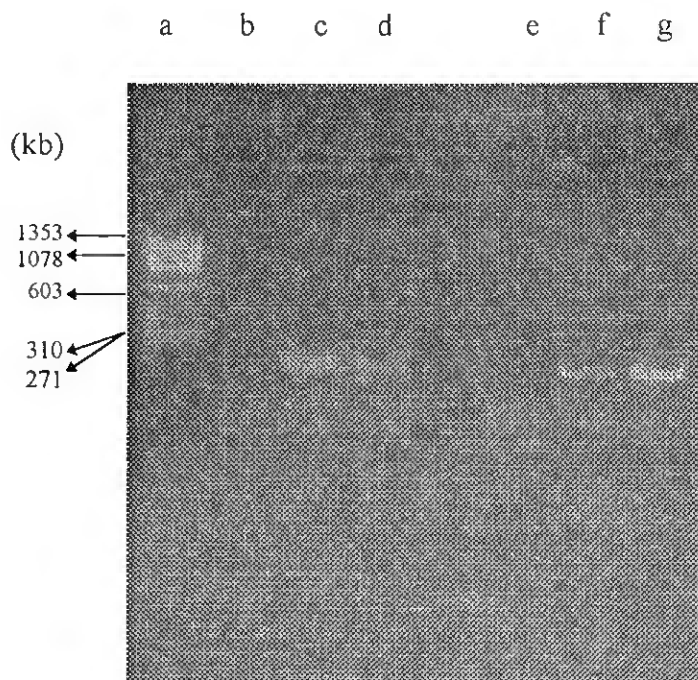


Figura 21. Análise em gel de agarose a 2% dos fragmentos amplificados utilizando *primers* específicos para a α -La com temperatura de hibridação de 62°C (c e d) e 60°C (f e g); Marcador molecular, *HaeIII* ϕ x174, a (em kb); controlo negativo: b e c. Os fragmentos amplificados, deduzidos a partir da sequência publicada são de 167 bp em caprinos (c e f).

2.1. Análise conformacional do gene da α -Lactoalbumina (exão 1)

O produto amplificado de 167 bp estende-se desde o nucleotídeo 689 ao 855 do gene caprino para a α -La, tal como descrito por Vilotte *et al*, 1991. Este *amplicon* corresponde no homólogo bovino à região compreendida entre o nucleótido 657 e o nucleótido 822 (Vilotte *et al*, 1987). A sequência do homólogo ovino não se encontra publicada. Contudo devido ao elevado grau de homologia existente ao nível da sequência do mRNA (Gaye *et al.*, 1987) é de prever que o fragmento amplificado de tamanho idêntico corresponda à mesma região.

Nos caprinos foram observados dois polimorfismos conformacionais (Figura 22) enquanto que nos ovinos apenas foi detectado um padrão de electroforese (Figura 23).

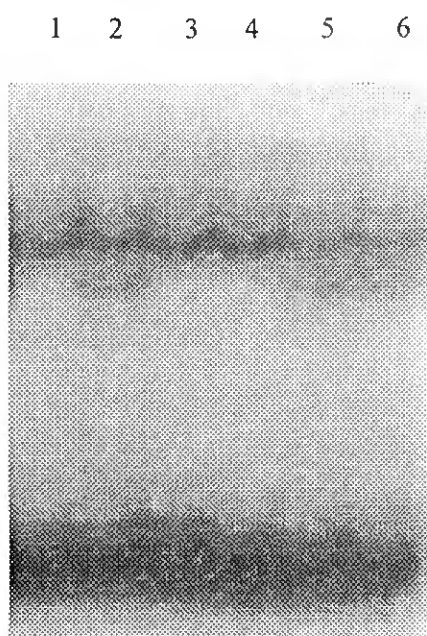


Figura 22. Autorradiografia do exão 1 polimórfico da α -Lactoalbumina caprina (α -La).
1,3, e 4 padrão A; 2, 5 e 6 padrão AB. O fragmento amplificado é de 167 bp.

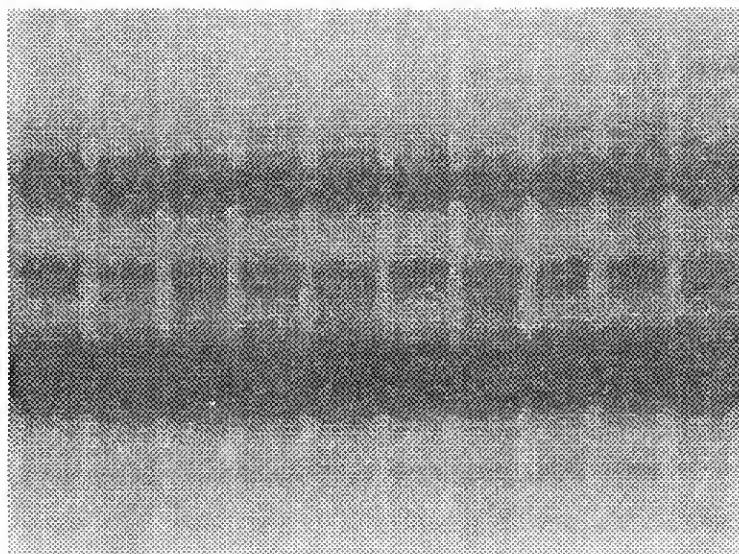


Figura 23. Análise PCR-Sscp do exão 1 da α -Lactoalbumina ovina (α -La).

2.2. Análises conformacionais dos genes das caseínas

Análise conformacional do gene da α_1 -CN (exão 9)

O produto amplificado de 257 bp estende-se desde o nucleotídeo 127 ao 383 da sequência parcial publicada do gene caprino da α_1 -CN (Exão 9-11), tal como descrito por Leroux *et al*, 1992, cobrindo a totalidade do exão 9.

Nos caprinos foram observados dois padrões conformacionais (Figura 24). Nos ovinos não ocorreu amplificação utilizando os *primers* destinados a amplificar a sequência homologa ovina da α_1 caseína caprina (exão 9).

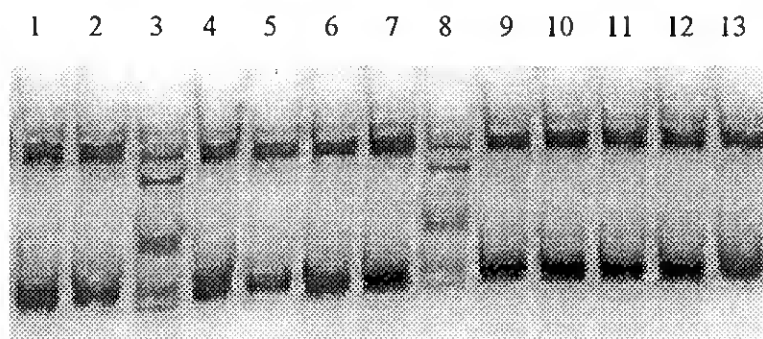


Figura 24. Análise PCR-Sscp do exão 9 do gene da α_1 -CN caprina. (3 e 8) padrão ABC; (1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 e 13) padrão AB.

Análise conformacional do gene da α_1 -CN (exões 10-11)

Em caprinos o produto amplificado de 305 bp estende-se desde o nucleotídeo 949 ao 1253 da sequência parcial publicada do gene caprino para a α_1 -CN tal como descrito por Leroux *et al*, 1992, cobrindo a totalidade dos exões 10 e 11.

A estrutura do homólogo ovino não se encontra publicada. Contudo devido ao elevado grau de homologia existente ao nível da sequência do mRNA (Mercier *et al.*, 1985) é de prever que o fragmento amplificado de tamanho idêntico corresponda à mesma região .

Em caprinos, foram observados dois padrões conformacionais, enquanto que nos ovinos apenas foi observado um padrão conformacional (Figuras 25 e 26).

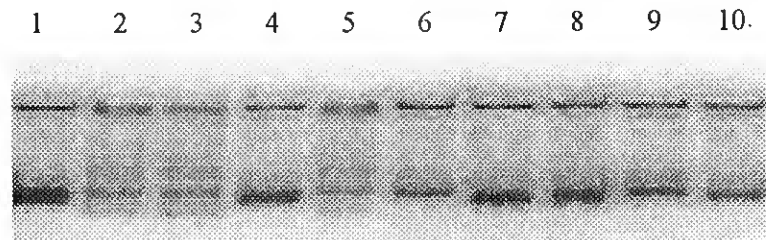


Figura 25. Análise PCR-Sscp dos exões 10-11 do gene da α_1 -CN caprina. (2, 3 e 5) padrão AB, restantes padrão AA.

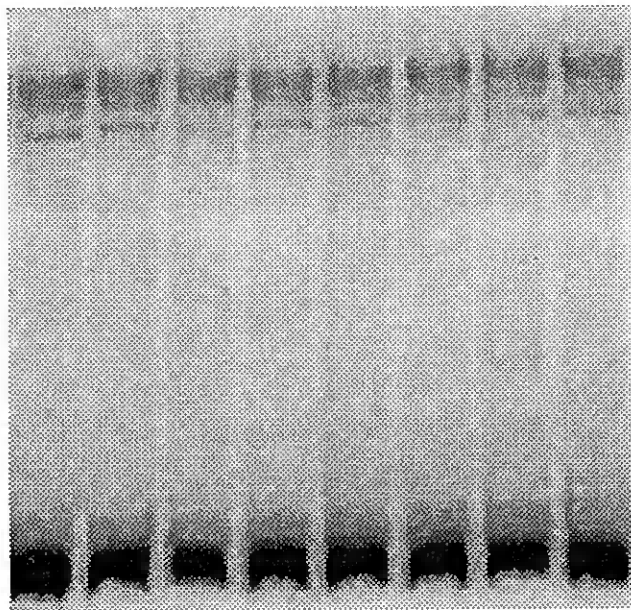


Figura 26. Análise PCR-Sscp dos exões 10-11 do gene da α_1 -CN ovina.

Análise conformacional do gene da β -CN (exão 7)

O produto amplificado de 500 bp estende-se desde o nucleotídeo 115 ao 614 do exão 7 do gene caprino da β -CN, tal como descrito por Roberts *et al*, 1992. Em relação ao homólogo ovino o produto amplificado de 512 bp estende-se desde o nucleotídeo 11597 ao

12108 exão 7 do gene ovino da β -CN, tal como descrito por Provot *et al*, 1995. Foram observados dois padrões electroforéticos em caprinos (Figura 27) enquanto que os ovinos se revelaram monomórficos (Figura 28).

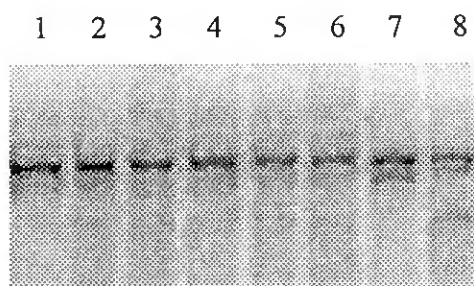


Figura 27. Análise PCR-Sscp do exão 7 do gene da β -CN caprina. ABC (8), restantes AAC.

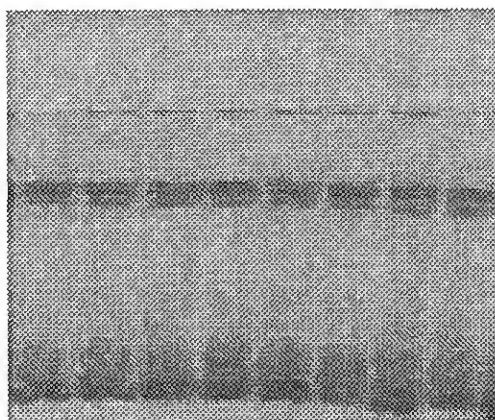


Figura 28. Análise PCR-Sscp do exão 7 do gene da β -CN ovina

Análise conformacional do gene da κ -CN (exão 4)

Em caprinos, o produto amplificado de 367 bp estende-se desde o nucleotídeo 6 ao 372 do gene caprino da κ -CN tal como descrito (Tabata *et al*, 1992, submissão directa ao EMBL/GenBank/DDBJ data bases), cobrindo o exão 4. A análise nesta região revelou-se monomórfica (Figura 29)

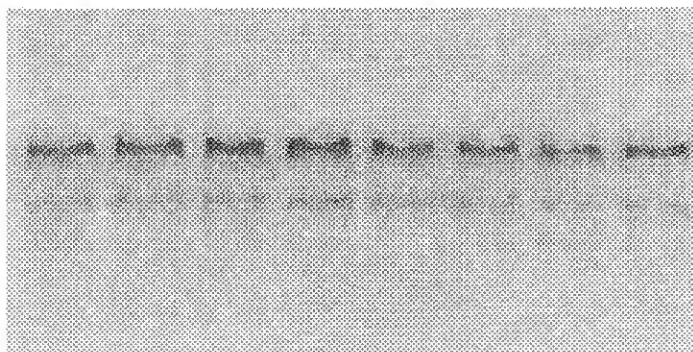


Figura 29. Análise PCR-Sscp do exão 4 da k-CN caprina

A estrutura do homólogo ovino não se encontra publicada. Contudo devido ao elevado grau de homologia existente ao nível da sequência do mRNA (Mercier *et al.*, 1985) é de prever que a porção amplificada de tamanho idêntico corresponda à mesma região da existente no gene caprino. Foram obtidos dois padrões conformacionais em ovinos (Figura 30).

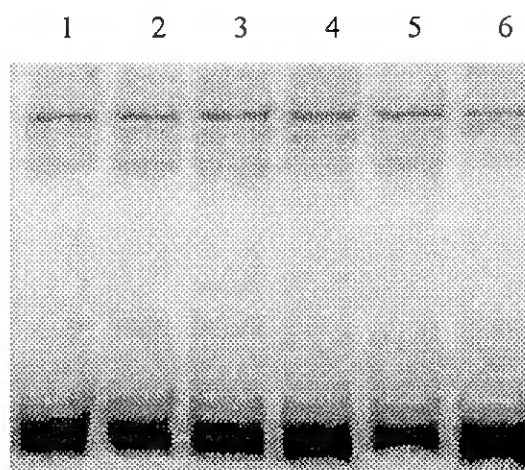


Figura 30. Análise PCR-Sscp do exão 4 do gene da k-CN ovina; 1, 2, 5 e 6 (padrão A), 3 e 4 (padrão B).

3. Análise Estatística

3.1. Polimorfismo de restrição GH-*Pst*I

A tabela 16 apresenta os resultados das relações obtidas entre os polimorfismos de restrição detectados com a enzima *Pst*I no gene codificante para a hormona de crescimento caprina e a quantidade de leite produzido, teor butiroso e teor proteico. O padrão electroforético ABC está relacionado com um decréscimo no teor em proteínas do leite em relação ao padrão BC ($p < 0.08$). O polimorfismo de restrição GH-*Pst*I parece desta forma poder ser relacionado com o teor proteico do leite. Contudo, a quantidade de leite produzida e o teor butiroso não parecem ser afectados por este RFLP (Tabela 16).

Tabela 16. Estimativa dos efeitos e contrastes (\pm desvio padrão) dos *Profiles* GH-*Pst*I sobre os caracteres de produção leiteira considerando 305 dias de lactação em caprinos de raça Algarvia.

Polimorfismo GH- <i>Pst</i> I		Caracteres de produção leiteira		
<i>Profile</i>	Frequência	Leite (kg)	Teor Butiroso (%)	Teor Proteico (%)
ABC	0.38	-8.9 \pm 12.31*	-0.57 \pm 0.77*	-0.52 \pm 0.34***
BC	0.62	8.17 \pm 10.27*	0.33 \pm 0.65*	0.281 \pm 0.285*
Contraste ABC vs BC		17.1 \pm 16.0*	-0.9 \pm 1.0*	-0.8 \pm 0.4**

* Não significativo; ** Nível de significância $p < 0.08$ *** Nível de significância $p < 0.15$

3.2. Polimorfismos conformacionais dos genes das proteínas do leite

α -Lactoalbumina (exão 1)

Os polimorfismos conformacionais obtidos não possuem relação com a quantidade de leite produzido e teor proteico (Tabela 19) apresentando valores não significativos $p > 0.2$. O padrão electroforético AB apresenta-se significativamente superior ($p < 0.1098$) ao padrão electroforético A, em relação ao teor butiroso.

Tabela 19. Estimativa dos efeitos e contrastes (\pm desvio padrão) dos *Profiles* α -La (exão 1) sobre os caracteres de produção leiteira considerando 305 dias de lactação em caprinos de raça Algarvia.

Polimorfismo conformacional α -La (exão 1)		Caracteres de produção leiteira		
<i>Profile</i>	Frequência	Leite (kg)	Teor Butiroso (%)	Teor Proteico (%)
A	0.64	-6.1 \pm 9.76**	-0.6 \pm 0.6**	-0.2 \pm 0.27**
AB	0.36	15.0 \pm 13.33**	1.051 \pm 0.83**	0.25 \pm 0.37**
Contraste A vs AB		-21.2 \pm 16.5**	-1.66 \pm 1.03*	-0.45 \pm 0.46**

*Nível de significância $p < 0.1098$; ** Não significativo α ₁-CN (exões 9, 10 e 11)

Os polimorfismos conformacionais obtidos no gene codificante para a α ₁-CN (exão 9) caprina parecem influenciar a quantidade de leite produzido, o teor butiroso e o teor proteico (Tabela 17). O padrão electroforético AB é significativamente superior ao padrão electroforético ABC na quantidade de leite produzido ($p < 0.00001$), teor butiroso ($p < 0.005$) e teor proteico ($p < 0.00001$). No que diz respeito aos exões 10 e 11 os polimorfismos conformacionais obtidos possuem igualmente relação com a quantidade de leite produzido, teor butiroso e teor proteico (Tabela 18). Desta forma o padrão electroforético AA é significativamente superior ao padrão electroforético AB na quantidade de leite produzido ($p < 0.00001$), teor butiroso ($p < 0.005$) e teor proteico ($p < 0.00001$).

Tabela 17. Estimativa dos efeitos e contrastes (\pm desvio padrão) dos *Profiles* α ₁-CN (Exão 9) sobre os caracteres de produção leiteira considerando 305 dias de lactação em caprinos de raça Algarvia.

Polimorfismo conformacional α ₁ -CN (exão 9)		Caracteres de produção leiteira		
<i>Profile</i>	Frequência	Leite (kg)	Teor Butiroso (%)	Teor Proteico (%)
AB	0.588	27.63 \pm 8.75**	1.171 \pm 0.59***	0.75 \pm 0.24**
ABC	0.397	-38.23 \pm 11.2**	-1.8 \pm 0.76***	-1.35 \pm 0.32*
BC	0.015	n.c.	n.c.	n.c.
Contraste AB vs ABC		65.9 \pm 14.2*	2.99 \pm 0.96**	2.1 \pm 1.56*

*Nível de significância $p < 0.00001$; ** Nível de significância $p < 0.005$ *** Nível de significância $p < 0.01$

n.c. Não considerada

Tabela 18. Estimativa dos efeitos e contrastes (\pm desvio padrão) dos *Profiles* α_{S1} -CN (Exões 10-11) sobre os caracteres de produção leiteira considerando 305 dias de lactação em caprinos de raça Algarvia.

Polimorfismo conformacional α_{S1} -CN (exão 10)		Caracteres de produção leiteira		
<i>Profile</i>	Frequência	Leite (kg)	Teor Butiroso (%)	Teor Proteico (%)
AA	0.588	27.36 \pm 8.75**	1.171 \pm 0.59***	0.75 \pm 0.24**
AB	0.397	-38.23 \pm 11.2**	-1.8 \pm 0.76***	-1.35 \pm 0.32*
BB	0.015	n.c.	n.c.	n.c.
Contraste AA vs AB		65.9 \pm 14.2*	2.99 \pm 0.96**	2.1 \pm 1.56*

*Nível de significância $p < 0.00001$; ** Nível de significância $p < 0.005$ *** Nível de significância $p < 0.01$
n.c. Não considerada

β - Cn (exão 7)

Os polimorfismos conformacionais obtidos não possuem relação com o teor butiroso e o teor proteico (Tabela 20) apresentando níveis de significância $p > 0.1$. Contudo, o padrão electroforético AAC é significativamente inferior ($p < 0.08$) ao padrão ABC, em relação à quantidade de leite produzido.

Tabela 20. Estimativa dos efeitos e contrastes (\pm desvio padrão) dos *Profiles* β -CN (Exão 7) sobre os caracteres de produção leiteira considerando 305 dias de lactação em caprinos de raça Algarvia.

Polimorfismo conformacional β -CN (Exão 7)		Caracteres de produção leiteira		
<i>Profile</i>	Frequência	Leite (kg)	Teor Butiroso (%)	Teor Proteico (%)
AAC	0.895	-3.59 \pm 8.29**	-0.28 \pm 0.52**	-0.1 \pm 0.23**
ABC	0.09	44.8 \pm 25.73*	2.13 \pm 1.61**	0.64 \pm 0.74**
BBC	0.015	n.c.	n.c.	n.c.
Contraste AAC vs ABC		-48.44 \pm 27.0*	-2.41 \pm 1.7**	-0.75 \pm 0.78**

* Nível de significância $p < 0.08$; **Não significativo; n.c. Não considerado;

V. Discussão

1. Polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLPs).

Os genes bovinos apresentam uma homologia elevada com os genes correspondentes ovinos e caprinos, pelo que seria de esperar que sondas de DNA heterólogas bovinas hibridassem com o DNA genómico de caprinos e ovinos, o que foi observado nas hibridações usando as sondas bovinas GH, GHR8 e IGF-I. Contudo, as sondas bovinas da prolactina (PRL) e do receptor celular do "*Insulin Like Growth Factor*" (IGF-R) não hibridaram contra o DNA genómico ovino e caprino (caso da sonda IGF-R) ou resultaram em padrões de hibridação confusos e com muito *background* (caso da sonda PRL). Este insucesso na hibridação foi observado mesmo após se ter tentado modificar as condições da hibridação (baixando a temperatura de hibridação) e da lavagem final (aumentando a concentração salina) por forma a facilitar a hibridação mantendo contudo a sua especificidade. A sonda do IGF-R foi preparada no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Agrónomas de Gembloux (Bélgica) e corresponde a um fragmento de 2.75 kb na região 3' do cDNA bovino. As sequências correspondentes em ovinos e caprinos não são conhecidas. Desta forma poderá eventualmente corresponder a uma zona de fraca homologia insuficiente para obter hibridação. Por outro lado a sonda da PRL corresponde a um fragmento de 0.7 kb, como descrito por Luck *et al.*, 1986. A sequência do gene da prolactina caprina não se encontra publicada e em ovinos é apenas conhecida a sequência nucleotídica do mRNA (GENBANK/M27057). Admite-se que esta hormona e a hormona de crescimento (GH) derivam de um mesmo gene ancestral (Niall *et al.*, 1971; Miller & Eberhardt, 1983), o que faria supor a existência de um elevado grau de homologia entre os genes da prolactina bovina e os genes correspondentes ovinos ou caprinos, à semelhança de que acontece em relação à hormona de crescimento. O facto de ter obtido um padrão de hibridação muito confuso permite formular a hipótese de que o fragmento utilizado como sonda devido ao seu reduzido tamanho, se possa ter hibridado com várias regiões do genoma caprino. Em termos de trabalho futuro será importante a produção e a utilização de sondas homólogas PRL e IGF-R, caprinas e ovinas.

Foram detectados poucos RFLPs nos animais analisados. Este facto pode ser atribuído a vários factores. A variabilidade genética nos animais é de um modo geral baixa, tendo sido estimado que apenas 1% das bases do genoma são polimórficas e que 1% destas variantes possam ser determinadas utilizando a abordagem RFLP (Jeffreys, 1987 *in* Prokop, 1990) Por outro lado, os genes analisados são pouco polimórficos. Estes genes, codificantes de factores de crescimento e dos seus receptores celulares, são muito conservados no decurso da evolução (Montgomery *et al.*, 1995). Em comparação com o observado nos seus homólogos bovinos número de polimorfismos de restrição obtidos nos genes analisados de ovinos e caprinos é consideravelmente menor. Poder-se-á formular a hipótese de perda de sensibilidade no método uma vez que as sondas utilizadas na análise são de origem bovina. Contudo, estudos recentes (Montgomery *et al.*, 1992, 1995) permitem afirmar que este factor não influi por forma a justificar por si só o reduzido número de polimorfismos de restrição obtidos. Os referidos autores, utilizando um conjunto de sondas de várias origens, concluíram que, apesar de ser sempre preferível a utilização de sondas homólogas, a utilização de sondas bovinas parece resultar em 69% dos casos, enquanto que utilizando sondas homólogas o sucesso é de 78%. Outra hipótese, para explicar o número relativamente baixo de polimorfismo observados, reside numa limitação do método, ou seja, no facto de ser necessário para a detecção do polimorfismo que este coincida com um local de reconhecimento de uma enzima de restrição. No entanto, para tentar superar esta limitação foram utilizadas neste estudo enzimas reconhecidas por detectarem um maior número de polimorfismos (Devor, 1988; Schumm *et al.*, 1988; Montgomery *et al.*, 1992). Uma terceira hipótese diz respeito ao grau de parentesco entre os animais. Assim, animais com grau de parentesco elevado serão *à priori* animais mais próximos geneticamente e logo exibindo normalmente menor grau de polimorfismo. Os animais constituintes do rebanho de caprinos de raça Algarvia estudados foram adquiridos jovens e em diferentes explorações geograficamente distintas. O critério utilizado na constituição inicial do rebanho analisado foi apenas os relacionados com a observação do chamado *padrão de raça* (coloração e pelagem). Os animais constituem desta forma uma amostra aleatória ("*random*") e representativa dos caprinos de raça Algarvia. Em relação aos ovinos Serra da Estrela, os dados genealógicos disponíveis permitem afirmar que não existem relações de parentesco elevadas entre eles.

1.1. Polimorfismo de restrição no *locus* da hormona de crescimento (GH)

A hormona de crescimento (GH) tem um papel chave na regulação do crescimento, lactação e desenvolvimento mamário, e conseqüentemente, o gene que codifica para a GH possui elevado potencial como marcador relacionado com a produção de leite. Variações alélicas na sequência estrutural ou regulatória destes genes poderão assim ter interesse, devido aos efeitos directos ou indirectos na produção de leite. Variações em intrões ou sequências flanqueadoras têm igualmente interesse potencial como marcadores genéticos (Hallerman *et al.*, 1987).

Nos ovinos de raça Booroola Merino a enzima *PvuII* permitiu detectar um polimorfismo de restrição no *locus* da GH (Parsons *et al.*, 1992; Gootwine *et al.* 1993). Nos mesmos animais foi demonstrada ainda a existência de um polimorfismo, ao nível do mesmo gene, com a enzima *TaqI* (Parsons *et al.*, 1992). Os mesmos autores referem a não existência de polimorfismos utilizando as enzimas *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *HindIII* ou *PstI*. Em relação aos caprinos não foi revelado qualquer polimorfismo ao nível da GH, tendo sido apenas referida a existência de sequências de DNA repetidas na região do gene caprino codificante para a hormona de crescimento (Yoshiaki *et al.*, 1991). Estes autores formularam a hipótese de uma duplicação genética ocorrida inicialmente seguida de inserção ou deleção de segmentos de DNA. Poderão estar envolvidas neste processo sequências repetidas de DNA encontradas no genoma caprino (Yoshiaki *et al.*, 1991).

Polimorfismo devido a uma variação do número de genes

Um padrão comum às análises de restrição efectuadas nos caprinos consiste na obtenção de duas bandas. Teoricamente duas ou mais bandas de hibridação são produzidas quando 1) a enzima de restrição corta na região do gene abrangida pela sonda 2) existem mutações no gene ou nas regiões flanqueadoras e/ou quando a amostra de DNA provém de um animal heterozigótico ou 3) quando existe mais do que uma cópia do mesmo gene. As primeiras duas possibilidades podem ser excluídas por duas razões: excepto a enzima *PstI*, nenhuma das enzimas de restrição utilizadas corta dentro do gene estrutural coberto pela sonda (Figura 31) e é pouco provável

que as 77 cabras estudadas sejam todas heterozigóticas. Desta forma estas possibilidades não podem explicar a existência de duas bandas de hibridação após digestão com as enzimas de restrição *Taq I*, *EcoRI* e *BamHI* (Figuras 33 e 34)

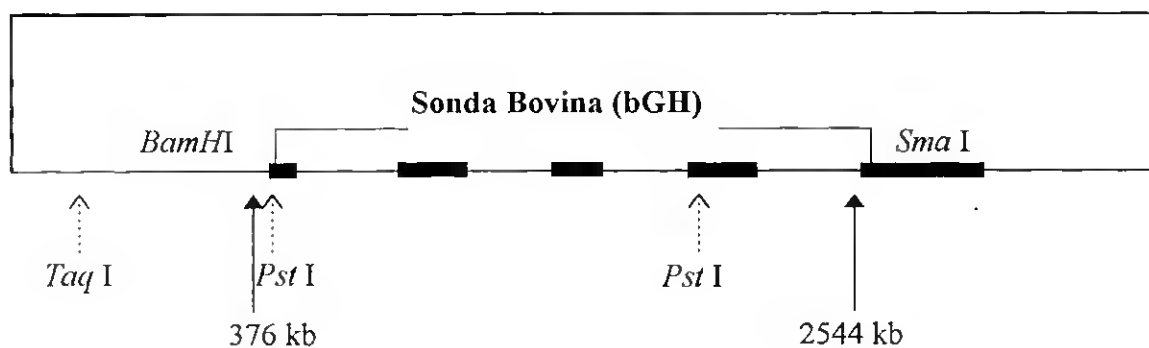
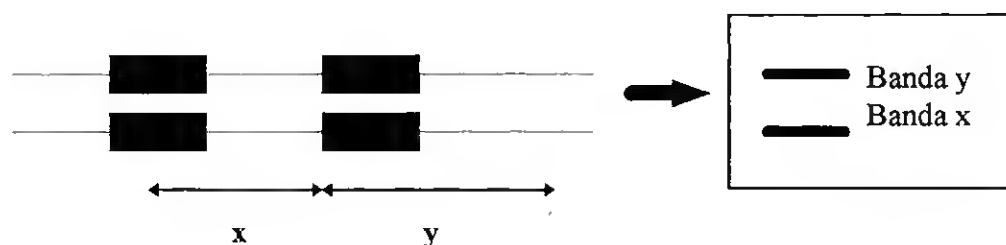


Figura 31. Organização estrutural do gene codificante para a hormona de crescimento caprina (gGH). As caixas a cheio representam exões. A região do gene caprino abrangida pela sonda bovina (bGH) utilizada é indicada (entre as posições 376 e 2544) bem como o local de restrição das enzimas que cortam no gene estrutural ou regiões flangeadoras

Deste modo, a interpretação deste polimorfismo poderá ser a de que o gene codificante para a hormona de crescimento caprina (gGH) esteja duplicado e que a presença de duas bandas de hibridação após a digestão com as enzimas *Taq I* e *EcoRI/BamHI* (Figuras 33 e 34) seja devida à existência de duas cópias do gene. Por outro lado enquanto que as diferenças em termos de intensidades observadas (Figuras 9 e 10, IV. Resultados) poderão ser devidas a diferenças alélicas (Figura 32).

Hipótese A



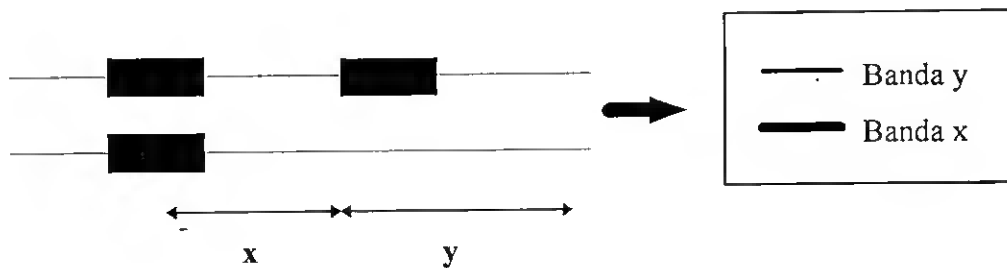
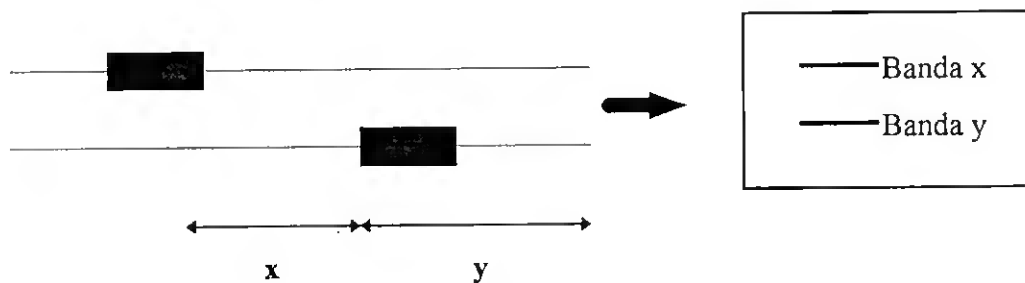
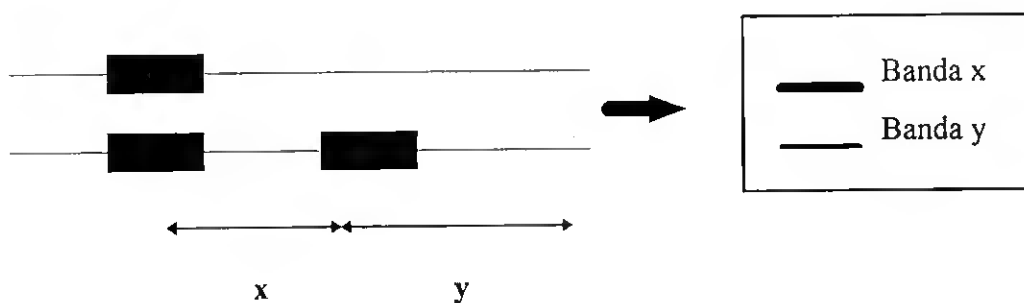
Hipótese B*Hipótese C**Hipótese D*

Figura 32. Hipóteses explicativas da variações de intensidade observadas nos fragmentos identificados.

As caixas a negro representam os dois genes propostos da hormona de crescimento caprina (gGH). As bandas x e y são bandas hipotéticas obtidas após digestão enzimática e hibridação com uma sonda do gene da hormona de crescimento bovina.

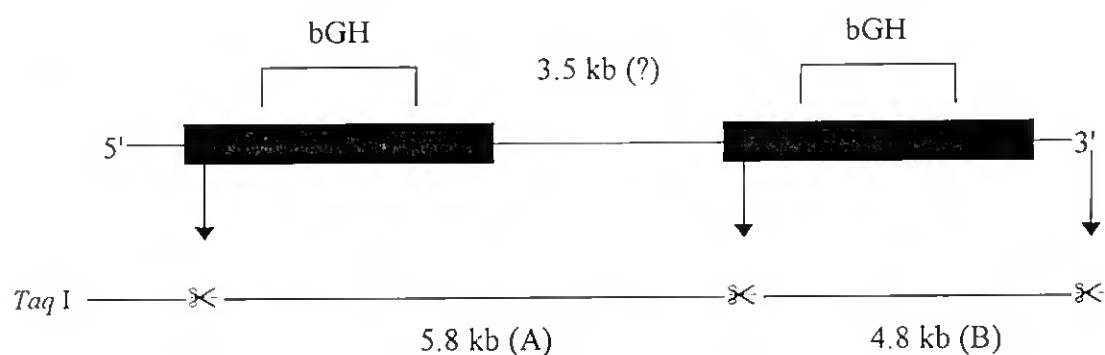


Figura 33. Mapa de restrição mostrando o padrão obtido após digestão com *Taq* I. As caixas a negro representam os dois genes codificantes propostos para a hormona de crescimento caprina. Os locais de corte assinalados por \times foram deduzidos a partir da sequência publicada (Kioka *et al.*, 1990).

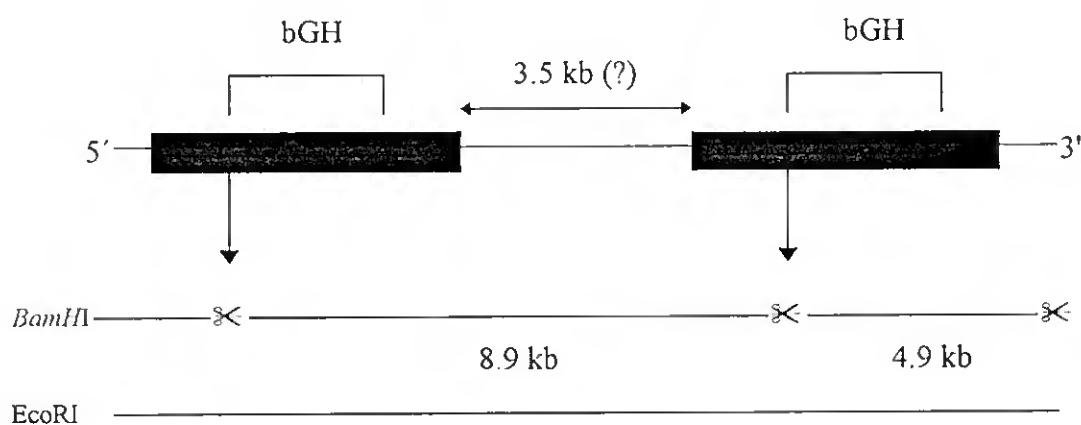


Figura 34. Mapa de restrição mostrando o padrão obtido após digestão com *Eco*RI/*Bam*HI. As caixas a negro representam os dois genes codificantes propostos para a hormona de crescimento caprina. Os locais de corte deduzidos a partir da sequência publicada (Kioka *et al.*, 1989) da enzima encontra-se assinalados por \times.

O gene codificante para a hormona de crescimento é um membro de uma família multigênica que inclui, entre outros, os genes da somatotropina coriônica e da prolactina. Estes genes estão envolvidos em séries de duplicações. Assim, ao nível do gene que codifica para a hormona de crescimento existe uma grande variabilidade entre espécies em termos de número de genes. Nos bovinos existe apenas uma simples cópia (Woychik *et al.*, 1982), enquanto que

o genoma humano possui cinco genes "tipo" GH (Moore *et al.*, 1982; Barsh *et al.*, 1983). O gene e os seus pseudogenes estão afastados de aproximadamente 34.5 kb. Nos ovinos existem duas cópias do gene (Figura 35) que codifica para a hormona de crescimento, separadas por 3.5 kb, estando os seus promotores separados por apenas 5 kb de DNA genómico. A sua proximidade faz supor que não se trata de um pseudogene e que esta ligação próxima poderá afectar os seus modos de expressão (Valinsky *et al.*, 1990; Montgomery *et al.*, 1995). Em caprinos de raça Saanen foi referida ainda a existência de sequências de DNA repetidas na região do gene codificante para a hormona de crescimento (Yoshiaki *et al.*, 1991).

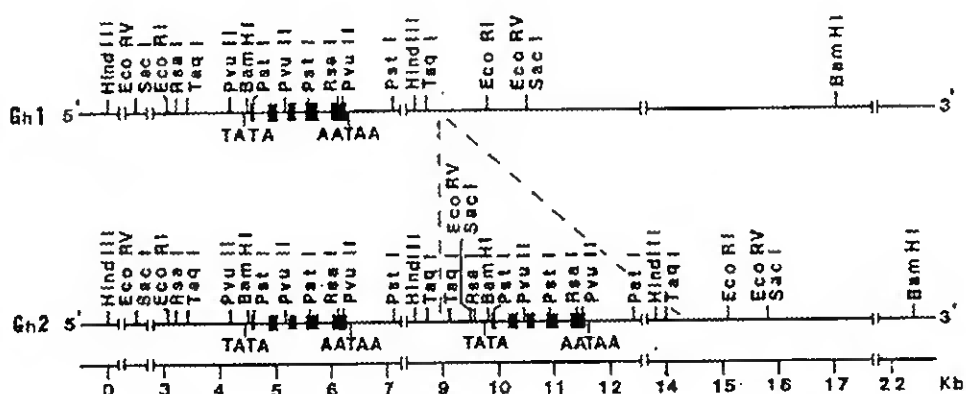


Figura 35. Mapa de restrição dos alelos GH₁ e GH₂ do gene codificante para a hormona de crescimento ovina. Os exões estão representados como caixas a negro. A local de inserção proposto para o duplicado está indicado (Adaptado de Valinsky *et al.*, 1990).

Ovelhas, cabras e bovinos pertencem à família Bovidae. Os bovinos apenas têm uma única cópia do gene GH (Woychik *et al.*, 1982) e os resultados obtidos parecem confirmar que a organização estrutural do gene que codifica para a hormona de crescimento é diferente nos caprinos e ovinos.

Dois hipóteses podem ser formuladas para explicar a história evolutiva nos Bovidae:

1) Um ancestral Bovidae transportaria uma única cópia; aquando da divergência dos Caprinae o gene terá sido duplicado, seguido de uma inserção ou deleção de fragmentos de

DNA. As sequências repetidas existentes no DNA caprino poderão ser resultantes deste processo (Yoshiaki *et al.*, 1991)

2) O Bovidae ancestral seria polimórfico quanto ao número de genes da GH e a selecção teria favorecido a presença de dois genes em Caprinae e de uma simples cópia em Bovidae. A este respeito, é referida por alguns autores a presença de uma banda suplementar de 4.5 kb após digestão de DNA genómico bovino com a enzima *BamHI*, que poderia corresponder ao gene GH duplicado (Hallerman *et al.*, 1987).

O facto de não terem sido identificados nos ovinos de raça Serra da Estrela e nos caprinos de raça Algarvia indivíduos portadores de apenas uma cópia do gene, tal como relatado em ovinos de raça Awassi, Assaf e Booroola (Valinsky *et al.*, 1990) poderá ser explicado pelo número de animais submetidos a este estudo (77 animais). Com efeito, a presença de apenas uma cópia do gene é um acontecimento muito raro nos ovinos de raça Awassi, Assaf e Booroola. Num estudo em que foram analisados 70 animais, foi apenas identificado um indivíduo portador de um único gene (Valinsky *et al.*, 1990; Gootwine *et al.*, 1993).

Polimorfismo GH-*PstI*

Na Figura 36 encontram-se representados os fragmentos de restrição obtidos após digestão de DNA genómico caprino com a enzima de restrição *PstI* e hibridação com uma sonda bovina da hormona de crescimento. Três fragmentos diferentes foram obtidos: estas bandas de 2.5, 1.5 e 1.0 kb foram arbitrariamente designadas por A, B e C. Os fragmentos obtidos, bem como este polimorfismo de restrição no *locus* GH nunca foi descrito na espécie caprina. Este polimorfismo poderá ser devido à presença/ausência da sequência de reconhecimento da enzima de restrição *Pst I* assinalada na figura 36 por *

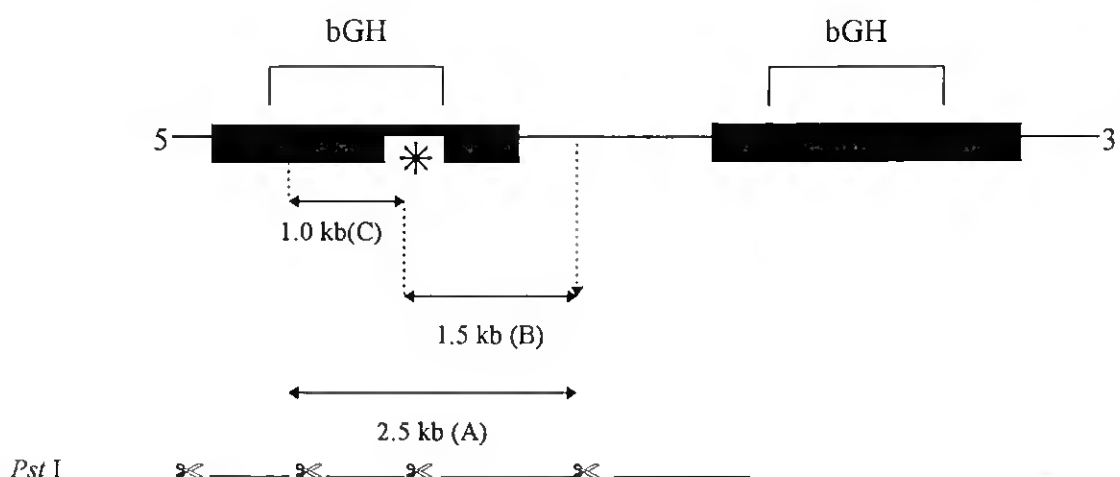


Figura 36. Mapa de restrição mostrando o padrão obtido após digestão com *PstI*. As caixas a negro representam os dois genes codificantes propostos para a hormona de crescimento caprina. O local proposto para a mutação coincidente com o local de corte da enzima de restrição *PstI* é indicado por *. Os locais de corte, deduzidos a partir da sequência publicada (Kioka *et al.*, 1990) em caprinos de raça Saanen, encontram-se assinalados por ⌘, dando origem a fragmentos de 1.0 kb, 1.5 kb e 2.5 kb.

Polimorfismo GH-*EcoRI*

O polimorfismo observado nos ovinos estudados nunca foi descrito. Alguns autores (Gootwine *et al.*, 1992) referem a presença de duas bandas de 12.2 kb e 6.7 kb que poderão corresponder às bandas por nós observadas de 12.9 kb e 7 kb. Contudo a banda de 16 kb nunca foi detectada em estudos anteriores. Uma vez que, tal como referido anteriormente apenas foram analisados 28 animais, um estudo futuro alargado a um maior número de animais poderá revelar-se conclusivo acerca da origem deste polimorfismo.

1.2. Hibridação no *locus* do receptor da hormona de crescimento (GHR)

A análise de restrição utilizando as enzimas *TaqI*, *HindIII*, *PstI*, *BamHI*, *SacI*, *EcoRI*, *MspI* nos caprinos e *TaqI* em ovinos e hibridação com a sonda bovina GHR8 revelou a presença de uma só banda e de um padrão de hibridação (Figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17; IV *Resultados*). O facto de a sonda bovina GHR8 hibridar com DNA caprino apoia a hipótese da existência de um alto grau de homologia ao nível deste gene, apesar de não ser conhecida a

sequência nucleotídica em caprinos. Em ovinos é conhecida a sequência do mRNA (Adams *et al.*, 1990; 1994) que possui uma homologia de 93% com a sequência homóloga bovina (Kopchick *et al.*, 1992 submissão directa ao EMBL/GenBank/DDBJ databases).

2. Polimorfismos conformacionais (Sscp's).

A identificação de polimorfismos conformacionais constitui uma estratégia só recentemente utilizada na detecção de mutações em bovinos e em sequências intrónicas de alguns genes tais com GH, IGF-1 e PRL, tendo sido igualmente sugerida a sua possível utilização como marcadores genéticos (Kirkpatrick, 1992 a), 1992 b), 1993; Kirkpatrick *et al.*, 1993; Kirkpatrick & Hart, 1994; Neibergs *et al* 1993, 1994) não tendo sido contudo estabelecida correlação entre a variabilidade detectada e caracteres de produção.

Esta técnica revelou-se aparentemente mais sensível na detecção de polimorfismos quando comparada com outras abordagens testadas tais como os RFLPs ou PCR/RFLP, possuindo ainda vantagens em termos de tempo e custos. Deste modo e neste trabalho procurou-se detectar variantes genóticas com base nesta técnica que se baseia no estabelecimento de polimorfismos conformacionais de DNA monocatenário. No entanto o facto de ser uma abordagem derivada do PCR faz com que seja extremamente sensível a qualquer variação nomeadamente de condições de amplificação, composição do gel de electroforese e temperatura de corrida. Tornou-se assim necessário uma optimização prévia das condições técnicas utilizadas por forma a prevenir eventuais artefactos que possam ser confundidos com alterações conformacionais resultantes de polimorfismos (Damjan & Dean, 1993; Grompe, 1993).

Os resultados obtidos e os polimorfismos conformacionais obtidos permitem perspectivar em termos de estudo futuro que esta abordagem possa ser utilizada na detecção de polimorfismos noutras regiões directa ou indirectamente relacionadas com caracteres produtivos.

2.1. Polimorfismo conformacional no gene da α -La.

Com o objectivo de determinar possíveis correlações entre a α -La e parâmetros de produção foi analisada a região adjacente a 5' do gene que codifica para a α -La caprina. Esta região é homóloga de uma região da α -La bovina na qual foi determinado um polimorfismo que foi associado à quantidade de GH secretada (Bleck *et al*, 1993; Mao *et al*, 1991).

Nos caprinos, o produto amplificado de 166 bp estende-se desde o nucleotídeo 689 ao 855 do gene caprino para a α -La, tal como descrito por Vilotte *et al*, 1991. Este fragmento amplificado corresponde no homólogo bovino à região compreendida entre o nucleótido 657 e o nucleótido 822 (Vilotte *et al*, 1987). Em ovinos apenas é conhecida a sequência do mRNA codificante para a α -La (Gaye *et al*, 1987). Contudo, os *primers* utilizados amplificaram um fragmento do mesmo tamanho (166 bp) do amplificado em caprinos (Figura 21; IV *Resultados*) sendo provável desta forma que a região amplificada corresponda à homóloga ovina.

Foram obtidos dois padrões conformacionais no gene caprino. Em termos de análise molecular será importante determinar, através da sequenciação dos fragmentos obtidos, os locais exactos das mutações e a natureza da variabilidade nucleotídica.

2.2. Polimorfismo conformacional nos genes das caseínas

α s₁-CN

Estudos realizados mostraram a existência de polimorfismos no gene que codifica para a α s₁-CN caprina (Leroux *et al.*, 1990, 1992; Brignon *et al.*, 1990; Manfredi *et al.* 1993, Mahé & Grosclaude, 1993). Foi igualmente demonstrado que este polimorfismo está sob controlo de pelo menos 7 alelos autossómicos denominados α s₁- Cn A, B, C, D, E, F e 0 e que são segregados de acordo com características mendelianas. (Grosclaude *et al.*, 1987; Mahé & Grousclaude, 1993; Martin, 1993).

Os alelos A, B e C denominados “alelos fortes” estão associados a um alto conteúdo em α s₁-CN (3,6 g/l por alelo) enquanto que o alelo E denominado “alelo intermédio” e os alelos D e F (“alelos fracos”) estariam associados com níveis intermédios (1,6 g/l) e baixos (0,6

g/l) respectivamente. O alelo 0 será provavelmente um alelo nulo. Os alelos E e F são os alelos mais frequentes (75% e 84%) nas raças estudadas (Alpina Francesa e Saanen). Uma correlação forte foi observada entre a quantidade de α_{S1} -CN e as restantes caseínas presentes no leite caprino (Grosclaude *et al* 1987) e daí o interesse em seleccionar animais portadores dos alelos A, B ou C. Além disso os alelos designados como “alelos fortes” foram correlacionados com alto teor em proteínas/lípidos no leite de animais portadores deste alelo (Manfredi *et al.*, 1993), com características organolépticas dos queijos (Heil & Dumont, 1993) e com características físico-químicas e tecnológicas do leite (Remeuf, 1993).

A estrutura primária da α_{S1} -CN e as alterações estruturais que diferenciam as variantes estão determinadas (Brignon *et al.*, 1990; Martin, 1993). As variantes A, B, C e E diferem entre si por simples substituições de aminoácidos, enquanto que as variantes D e F diferem das variantes A e B por uma deleção de respectivamente 11 e 37 aminoácidos a partir da posição 59. Os exões 9, 10 e 11, juntos codificam para os 37 resíduos de aminoácidos presentes na variante A, mas ausentes na variante F. O exão 9 codifica para a sequência presente na variante A, mas ausente na variante D. Uma deleção de um simples nucleótido no exão 9 e duas inserções, de 11 e 3 pares de bases no intrão 9, foram identificadas (Leroux *et al.*, 1992) como sendo as mutações potencialmente responsáveis pela omissão alternativa destes três exões no mRNA maduro. Segundo os mesmos autores, estas mutações poderiam ter efeito sobre a eficiência e especificidade do processo de *splicing*, uma vez que levariam à formação de transcritos primários aberrantes que comprometeriam o *splicing* correcto, originando desta forma uma redução substancial na quantidade de transcritos funcionais com consequências na quantidade de α_{S1} -CN existente no leite de animais portadores destes alelos. Desta forma no presente estudo foram analisadas estas regiões em 77 caprinos de raça Algarvia tendo sido determinados quatro polimorfismos conformacionais nos três exões escolhidos (exão 9, 10 e 11). Ao nível molecular será importante elucidar através da sequenciação nucleotídica a origem de cada um dos genótipos identificados e verificar se o polimorfismo identificado possui relação com as variantes proteicas existentes.

Em ovinos, a descrição do polimorfismo em caseínas é muito limitado (Leveziel *et al.*, 1991). A α_{S1} -CN ovina foi considerada monomórfica (Leroux *et al.*, 1992). Recentemente, (Ferranti *et al.*, 1995) foram determinadas três variantes, A, C e D que se diferenciam entre si por mutações simples que estão envolvidas no grau de fosforilação da proteína madura. A variante C difere da variante A por uma substituição na posição 13 de uma serina por uma

prolina, o que determina a perda de um grupo fosfato na posição 12 da cadeia proteica. Uma outra substituição, na posição 68, de uma serina por uma asparagina, causa o desaparecimento dos grupos fosfatos nos resíduos fosforilados de serina 64 e 66 na variante D; nesta variante não existe evidência de fosforilação na serina 41. Contudo, uma análise genética permanece por fazer, uma vez que os polimorfismos foram determinados a partir da análise electroforética de proteínas, não sendo ainda conhecida, ao contrário do que acontece em caprinos, qualquer correlação entre estes polimorfismos e caracteres de produção. A análise efectuada na porção homóloga ovina dos exões 10 e 11 da α_1 -CN caprina (uma vez que a sequência ovina não se encontra publicada) não nos permitiu encontrar polimorfismos conformacionais. Esta região revelou-se monomórfica registando-se apenas um padrão de electroforese. Uma possível explicação para este facto reside na observação de que as variantes ao nível proteico conhecidas na α_1 -CN ovina serem resultado de mutações que ocorrem exteriormente à região estudada ou a mecanismos pós translacionais.

β -CN

A variante B da β caseína está associada, em bovinos, a teores proteicos elevados no leite e consequentemente melhor aptidão para a fabricação do queijo (Grosclaude, 1988). Em ovinos e caprinos (Dall'Ólio *et al*, 1989) foram determinadas quatro variantes baseadas na análise electroforética da β caseína do leite não tendo sido realizado qualquer estudo de correlação entre estas variantes proteicas e caracteres de produção. Será interessante no futuro verificar se o polimorfismo conformacional detectado nos caprinos de raça Algarvia possui correspondência com as variantes proteicas referidas. Dada a importância da β -CN na fracção proteica do leite será ainda importante alargar este estudo a outras sequências nucleotídicas.

3. Correlações entre polimorfismos e caracteres de produção.

Neste estudo foram utilizados dados de contrastes de rendimento leiteiro correspondentes ao período de 1994, 1995 e 1996. Foram estudados os efeitos ambientais fixos que influem significativamente na produção de leite (número de partos, data do contraste, idade do animal, estação do ano) com o objectivo de serem normalizados e corrigidos de forma a poderem ser utilizados na análise estatística posterior. Estes resultados estão de

acordo com os obtidos em outras raças de cabra em que de igual modo estes factores parecem influenciar significativamente a produção (Munoz *et al.*, 1992).

Os sistemas de exploração de pequenos ruminantes em zonas áridas ou semiáridas, como é o caso do Algarve caracterizam-se por uma grande diversidade ambiental e tamanho de rebanhos pequeno. Além disso, os sistemas de reprodução utilizados não permitem obter facilmente dados de natureza genealógica ao contrário do que acontece em bovinos, onde é frequente o sistema de inseminação artificial. O facto de não ter sido possível a obtenção de dados de natureza genealógica, não influencia grandemente os resultados, uma vez que os animais analisados neste estudo, por serem oriundos de uma grande número de explorações, não possuem graus de parentesco elevados. Por outro lado, e em termos de efeitos ambientais são animais submetidos a maneios muito semelhantes uma vez que foram adquiridos quando jovens e criados na mesma exploração.

3.1. Polimorfismo de restrição na hormona de crescimento (GH-*PstI*)

Estudos recentes efectuados em bovinos sugerem uma possível associação entre RFLPs no gene codificante para a GH e parâmetros produtivos (Rocha. *et al.*, 1992; Zhang. *et al.*, 1993; Lucy *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Sneyers *et al.*, 1994). Em pequenos ruminantes nunca foi efectuado um estudo deste tipo.

As diferenças de intensidades nas bandas referidas no polimorfismo de restrição GH *PstI* permitiriam agrupar teoricamente os animais em seis classes genotípicas (AA bb CC, AAB b Cc, AaB b CC, AaB b Cc, B b CC e B b Cc). Contudo, os animais ficariam subdivididos em grupos muito pequenos, o que tornaria a análise estatística pouco fiável. Optou-se assim por dividir os animais em apenas duas classes genotípicas ABC e BC considerando somente a presença de duas ou de três bandas e desprezando as diferenças de intensidades observadas.

O padrão electroforético ABC pode ser relacionado com um decréscimo no teor proteico do leite com um nível de significância $p < 0.15$. O padrão ABC é ainda inferior ao padrão BC ($p < 0.08$). O polimorfismo de restrição GH-*PstI* parece apresentar assim relação com o teor proteico do leite. Contudo a quantidade de leite produzida e o teor butiroso não parecem ser afectados por este RFLP (Tabela 16; *IV. Resultados*).

3.2. Polimorfismos conformacionais em proteínas do leite

O facto de os genes codificantes para as caseínas do leite se encontrarem num *cluster* autossómico, tornaria lógica uma análise estatística considerando os haplotipos resultantes das diferentes combinações e não os genótipos relativos a cada um dos genes separadamente. Contudo, isso levaria a uma subdivisão em haplotipos com um número de animais muito reduzido o que tornaria a análise estatística pouco fiável. Em termos de trabalho futuro importa alargar este tipo de estudo a um maior número de animais possibilitando desta forma um estudo mais aprofundado sobre as possíveis associações entre estes haplotipos e caracteres de produção. Por outro lado foram determinados genótipos com frequência muito rara (BC em α_1 -CN exão 9, 0.015; BB em α_1 -CN exão 10-11, 0.015 e ABC em β -CN exão 7, 0.015). Pelo mesmo motivo, estes genótipos não foram considerados na análise estatística efectuada.

Os polimorfismos conformacionais obtidos no gene codificante para a α_1 -CN (exão 9) caprina estão relacionados com a quantidade de leite produzido, o teor butiroso e o teor proteico (Tabela 17; IV. *Resultados*). O padrão electroforético AB é significativamente superior ao padrão electroforético ABC na quantidade de leite produzido ($p < 0.00001$), teor butiroso ($p < 0.005$) e teor proteico ($p < 0.00001$). No que diz respeito aos exões 10 e 11 os polimorfismos conformacionais obtidos possuem igualmente relação com a quantidade de leite produzido, teor butiroso e teor proteico (Tabela 18; IV. *Resultados*). O padrão electroforético AA é significativamente superior ao padrão electroforético AB na quantidade de leite produzido ($p < 0.00001$), teor butiroso ($p < 0.005$) e teor proteico ($p < 0.00001$).

Em relação à α -Lactoalbumina os polimorfismos conformacionais obtidos não possuem relação com a quantidade de leite produzido e teor proteico (Tabela 19; IV. *Resultados*). No entanto o padrão electroforético AB apresenta-se significativamente superior ao padrão electroforético A ($p < 0.1098$), em relação ao teor butiroso.

No que diz respeito à β -CN os polimorfismos conformacionais obtidos não possuem relação com o teor butiroso e o teor proteico (Tabela 20; IV *Resultados*). Contudo o padrão electroforético AAC é significativamente inferior ($p < 0.08$) ao padrão ABC, em relação à quantidade de leite produzido.

No casos referidos da α -La e β -CN existe uma tendência com níveis de significância $p < 0.1$ e $p < 0.08$ respectivamente. Será desta forma indispensável alargar este estudo a um maior número de animais no sentido de averiguar a exactidão desta possível relação.

VI. Conclusões e Perspectivas

As investigações realizadas sobre polimorfismos genéticos e sua correspondência com caracteres produtivos tais como a aptidão leiteira, têm sido efectuadas fundamentalmente em bovinos, existindo poucos estudos deste tipo em pequenos ruminantes. No final deste estudo, que teve como objectivos identificar polimorfismos em sequências alvo e estudar a sua associação com caracteres de produção (produção de leite, teor butíroso e teor proteico) podem-se resumir os resultados alcançados na seguinte tabela:

<i>Profile</i> Obtido	Caracter de produção	Efeito do <i>profile</i>	Frequência do(s) <i>Profile(s)</i>
RFLP GH- <i>Pst</i> I: ABC	Teor proteico	Desfavorável	0.38
Contraste ABC vs BC	Teor proteico	Desfavorável	0.38 vs 0.62
Sscp α_{S1} -Cn (exão 9): AB	Produção de leite Teor Butíroso Teor Proteico	Favorável Favorável Favorável	0.588
ABC	Produção de leite Teor Butíroso Teor Proteico	Desfavorável Desfavorável Desfavorável	0.397
Contraste AB vs ABC	Produção de leite, Teor Butíroso e Proteico	Favorável	0.588 vs 0.397
Sscp α_{S1} -Cn (exão 10): AA	Produção de leite Teor Butíroso Teor Proteico	Favorável Favorável Favorável	0.588
AB	Produção de leite Teor Butíroso Teor Proteico	Desfavorável Desfavorável Desfavorável	0.397
Contraste AA vs AB	Produção de leite, Teor Butíroso e Proteico	Favorável	0.588 vs 0.397
Sscp α -La (exão 1):			
Contraste A vs AB	Teor Butíroso	Desfavorável	0.64 vs 0.36
Sscp β -Cn (exão 7): ABC	Produção de leite	Favorável	0.895
Contraste ABC vs AAC	Produção de leite	Favorável	0.09 vs 0.895

Se bem que existam relações entre os polimorfismos identificados e caracteres de produção, nomeadamente no caso da α_{S1} -Cn, será necessário recorrer a um maior número de animais. O recurso a um maior número de animais permitirá agrupá-los segundo haplotipos e estudar os efeitos destes sobre os caracteres de produção. Será igualmente importante

averiguar acerca das consequências indesejáveis de uma eventual selecção em favor de um determinado alelo. Este tipo de dados poderá então ser introduzido com sucesso nos esquemas de selecção e melhoramento genético.

O presente estudo permitiu aplicar com sucesso um método recente de detecção de polimorfismos (SSCP) pela primeira vez utilizado em ovinos e caprinos neste tipo de estudos. A extensão desta abordagem a outras sequências codificantes para proteínas importantes no controlo da lactação, no crescimento e nas propriedades do leite e dos seus derivados permitirá eventualmente detectar novos polimorfismos e sua associação com caracteres de interesse.

Ao nível molecular é fundamental proceder à sequenciação dos fragmentos obtidos a fim de determinar os locais exactos das mutações e a natureza da variabilidade nucleotídica. Uma vez confirmada a associação entre marcadores genéticos e caracteres de produção, dever-se-á desenvolver um procedimento rápido, sensível e inócuo de identificação dos genótipos de interesse baseados na amplificação *in vitro* (PCR) tais como CFLP e AFLP.

Este estudo permitiu desta forma detectar polimorfismos em raças com reconhecida aptidão produtiva e estabelecer algumas relações entre esta variabilidade e caracteres produtivos (produção de leite, teor proteico e butiroso). O alargamento deste tipo de estudos a outros exões dos genes codificantes para as lactoproteínas e hormonas do eixo somatotrópico com importância reconhecida na lactação, poderá fornecer dados para uma caracterização genética destas raças em termos aptidão produtiva. A raça caprina algarvia possui além duma forte aptidão leiteira, uma aptidão elevada para a produção de carne, em virtude dos seus elevados índices de fertilidade, prolificidade e fecundidade. Desta forma, a identificação dos polimorfismos em genes codificantes para reguladores de crescimento e sua correlação com parâmetros de crescimento, poderá ser igualmente objecto de um estudo futuro.

Finalmente parece-nos importante alargar este tipo de estudos a outras raças autóctones portuguesas, muitas delas actualmente em extinção tais como a caprina Serrana e Charnequeira e ovinas Merino da Beira Baixa, Churra Algarvia e Churra da Terra Quente.

VII. Referências

- Adams T.E., Baker L., Fiddes R.J. & Brandon M.R. 1990. The sheep growth hormone receptor: molecular cloning and ontogeny of messenger RNA expression in the liver. *Molecular Cellular Endocrinology*. 73: 135-145.
- Adams L. J. & Maddox J.F.. 1994. A dinucleotide repeat polymorphism in the ovine insulin-like growth factor-I gene 5' flanking region. *Animal Genetics*. 25. 61.
- Addeo F., Mauriello R. & DiLuccia, A. 1988. A gel electrophoretic study of caprine casein. *J. Dairy Research*. 55:413-421.
- Aleandri R., Buttazzoni G. , Schneider J. C. , Caroli A. & Davoli R.. 1990. The effect of milk protein polymorphisms on milk components and cheese producing ability. *Journal of Dairy Science* 73: 241-255.
- Alexander L. J., Stewart A. F., McKinlay A. G., Kape-linskaya T. V., Tkach T. M. & Gorodetsky S. 1988. Isolation and characterization of the bovine K casein gene. *Eur J Biochem* 178: 395-401
- Alexander L .J., Hayes G., Bawden W., Stewart A F & MacKinlay, A G. 1992 Complete nucleotide sequence of the bovine β lactoglobulin gene. *Animal Biotechnology* :1-10
- Arave C. W., Gillet T.A., Price D.A. & Matthews D. H.. 1973. Polymorphisms in caseins of sheep milk. *Journal of Animal Science* 36: 241-4.
- Bachman K. C , Elvinger F. & Head H H. 1993. Somatotropine, montée laiteuse et production laitière. *In Biologie de la lactation*. J Martin et L Houdebine, INSERM/INRA eds Paris, Versailles pp. 221-258.
- Barsh G., Seeburg P. & Gelinás R.. 1983. The human growth hormone gene family: structure and evolution of the chromosomal locus. *Nucleic Acid Research*. 11. 3939-3958.
- Barta A., Richards R., Baxter J.B. & Shine J..1981. Primary structure and evolution of rat growth hormone gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78: 4867-4871.
- Bauman D E, Eppard P J, Degeeter M J. & G M Lanza. 1985. Response of high producing dairy cows to long term treatment with pituitary and recombinant growth hormone. *Journal of Dairy Science* .68: 1352-1362.
- Baumann G. 1991. Growth hormone binding proteins. Biochemical characterisation and assays. *Acta Endocrinologica*. 124: 16-21.

- Baumbach W.R., Hornet D.L. & Logan J.S. 1989. The growth hormone-binding protein in rat serum is an alternative spliced form of the rat growth hormone receptor. *Genes and Development* 3: 1199-1205.
- Beckmann J S & Soller M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. and appl. Genetics*. 67:35-43
- Beier D R. 1993. Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for genetic mapping. *Mammalian Genome* 4: 627-631.
- Bleck G B & R Bremel. 1993. Correlation of the α -Lactalbumin (+15) polymorphism to Milk Production and Milk Composition of Holsteins. *Journal of Dairy Science* 76: 2292-2298.
- Boisnard M & G Petrissant. 1985. Complete sequence of ovine alpha s_2 -casein messenger RNA. *Biochimie* 67: 1043-1051.
- Bonsing J & MacKinlay., A G. 1987. Recent studies on nucleotide sequences encoding the casein's. *Journal of Dairy Research* 5: 447-461
- Bonsing J., Ring J M., Stewart A F & MacKinlay A G. 1988. Complete nucleotide sequence of the bovine β casein gene. *Aust J Biol Sci* 41
- Boulanger A., Grosclaude F & Mahé M F. 1984. Polymorphisme des caséines αs_1 et αs_2 de la chèvre. (*Capra hircus*). *Génét Sél Evol* 1: 157-175
- Bouniol C. 1993. Sequence of the goat αs_2 casein encoding cDNA. *Gene* 12: 235-236.
- Bouniol C., Bngnon G., Mahe M F & Printz C. 1993. Characterization of goat allelic αs_2 -casein A and B. Another evidence of the phosphorylation code of caseins. *Protein Seq Data Anal* 5: 213-218.
- Bouniol C., G Brignon., M F Mahé & C Printz. 1994. Biochemical and genetic analysis of variant C of caprine αs_2 -casein (*Capra hircus*). *Animal Genetics* 25: 173-177.
- Breier B H., D Gluckman & Bass J J. 1988. The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status and estradiol-1,7 β on hepatic high and low affinity somatotrophic binding sites. *J. Endocrinol.* 116:169-177.
- Breir B. H. & Gluckman. 1991. The regulation of postnatal growth: nutritional influences on endocrine pathways and function of the somatotrophic axis. *Livestock Production Science*. 27: 77-94.
- Brew K., Castellino F J., Vanaman J C & Hill R L. 1970. The complete amino acid sequence of bovine α lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 245: 4570-4582

- Brignon G., Mahé M F., Grosclaude F & Ribadeau Dumas B. 1989. Sequence of caprine αs_1 casein and characterisation of those of its genetic variants which are synthesised at a high level., αs_1 Cn A, B and C. *Protein Seq. Data Ana.l* : 181-188.
- Brignon G., Mahe M F., Ribadeau Dumas B., Mercier J C & Grosclaude F. 1990. Two of the three genetic variants of goat αs_1 casein which are synthesised at a reduced level have an internal deletion possibly due to altered RNA splicing. *Eur. J. Biochem.* 193: 237-241
- Burnside J., Liou S., Zhong C. & Cogburn L.A. 1992. Abnormal growth hormone receptor gene expression in the sex-linked dwarf chicken. *General and Comparative Endocrinology* 88: 20-28.
- Byrne C R., Wilson B W & Ward K A. 1987. The isolation and characterisation of the ovine growth hormone gene. *Aust. J. Biol. Sci.* 40:459-468
- Campbell, PG & Baumrucker C R. 1986. Characterisation of insulin-like growth factor-I/somatomedine C receptors in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science.* 69 (suppl. 1): 163 (Abstr.).
- Chianese L., Mauriello R. Moio R. Intorcia N. & Addeo F.. 1992. Determination of ovine casein heterogeneity using gel electrophoresis and immunochemical techniques. *Journal of Dairy Research.* 59: 39-47.
- Chikuni K., Tabata T. Monma M. & Saito M. 1993. Direct sequencing of the promotor region of Growth Hormone Gene from *Atrtiodyctyla*. *Anim. Sci. Technol.* 65: 120-124.
- Ciafarone N., Addeo F. 1984. Composizione della caseina e proprietà del latte di capria. *Vergaro.* 11: 17-24.
- Cowan C M., Dentine M R., Ax R L & Schuler L A. 1989. Restriction fragment length polymorphism associated with growth hormone and prolactin genes in Holstein bulls: evidence for a novel growth hormone allele. *Animal Genetics.* 20:157-165.
- Dagleish, D.G. 1992. Bovine milk protein properties and the manufacturing quality of milk. *Livestock Production Science,* 35:75-93.
- Dall'Olio M & J Gellin. 1989 Affinity chromatography of ovine casein. *Animal Genetics:*20:108.
- Dall'Olio S., Davoli R & Russo V. 1989 Una nuova variante di β caseina caprina. *Sci Tec Latt Caseana* 40: 24-28

- Damiani G., Ferreti L., Rognoni G. & Sgaramella V.. 1989. RFLPs of the ovine κ casein gene. *Animal Genetics*, 20 (Suppl. 1), 97.
- Damjan G. & Dean M..1993. Optimization of the Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Human Mutation*. 2: 404-414.
- Daughaday W.H.. 1981. Growth hormone and the somatomedins. *In: Endocrine control of growth. Elsevier Eds.*, New York.
- Davis SR., Gluckman PD., Hart C & Henderson H. 1987. Effects of injecting growth hormone or thyroxine on milk production and blood plasma concentrations of insuline-like growth factors I and II in dairy cows. *J. Endocrinol.* 114: 17-24.
- DeNoto F M., Moore D D & Goodman H M. 1981. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 9:3719-3730.
- Devor D. 1988. The relative efficiency of restriction enzymes: an update. *American Journal of Human Genetics.* 42: 179-82.
- Di Gregorio P., Rando A. & Masina P..1991. DNA polymorphism at the casein loci in sheep. *Animal Genetics.* 22: 21-30.
- Di Lucia A., Mauriello R., Chiamese L., Moio L. & Addeo F.. 1990. k-Casein polymorphism in caprine milk. *Sci Tec Latt Casearia* 41:305-314.
- Di Stasio L. & Merlin P.. 1979. A new κ -casein variant in cattle. *Proc XVIth International Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism*, Leningrad II, 97-100
- Di Stasio L.. 1983. New phenotypes of α s-casein in sheep. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics.* 14:229-32.
- Donnely W.J., McNeill G.P., Buchheim W. & McGann T.C.A. 1984. A comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles. *Biochim. Biophys. Acta* 789:136-143.
- Ebner K.E. & Brodbeck U. 1968. Biological role of α -lactalbumin: a review. *J Dairy Sci* 51: 317322
- Eigel W. N., Butler J. E., Ernstrom C. A., Farrell H. M., Harwalkar V. R., Jenness R. & Whitney R.. 1984. Nomenclature of proteins of Cow's milk: Fifth Revision. *Journal of Dairy Science.* 67: 1599-1631.

- Eppard P. J., Bauman D. E., Bitan J., Wood D., Akers R. M. & W. House. 1985. Effects of dose of bovine growth hormone on milk composition: α -Lactalbumin, fatty acids and mineral elements. *Journal of Dairy Science*. 68: 3047-3056.
- Fan E., Levin D.B., Glickman B.W. & Logan D..1993. Limitations in the use of SSCp analysis. *Mutation Research*. 288: 85-92.
- Ferranti P., Malorni A., Nitti G., Laezza P., Pizzano R., Chianese L. & Addeo F.. 1995. Primary structure of ovine α _{s1}-caseins. Localization of phosphorylation sites and characterization of genetic variants A, C e D. *Journal of Dairy Research*. 62: 281-296.
- Folch J., Coll A. & Sanchez A.. 1994. Complete sequence of the caprine beta-lactoglobulin gene. *Journal of Dairy Science*. 77: 3493-3497.
- Gaye P., Hue-Delahaie D., Mercier J. C., Soulier S. & Vilotte J. L.. 1987. Complete nucleotide sequence of ovine alpha-lactalbumin mRNA. *Biochimie* 69: 601-608.
- Glimm P. D., Baracos V. E. & Kennelly J.. 1990. Molecular evidence for the presence of growth hormone receptor in the bovine mammary gland. *J. Endocrinol.* 126:R5-R8.
- Godowski P. J. & Leung D. W.. 1989. Characterisation of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with laron-type dwarfism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 8083-7.
- Gootwine E., Sise J. A., Penty J.M. & Montgomery G. W.,. 1993. The duplicated gene copy of the ovine growth hormone contains a PvuII polymorphism in the second intron. *Animal Genetics* 24:319-321
- Gordon D. F., Quick D. P. , Erwin C. R., Donelson J. E. & Maurer R. A.. 1983. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. *Mol. Cell Endocrinol.* 33: 81-95.
- Groenen M. A. M., Dijkhof R., van der Poel J. J., van Diggelen R. & Verstege E.. 1992. Multiple octamer binding sites in the promoter region of the bovine α _{s2} casein gene. *Nucleic Acids Res.* 20: 4311-4318.
- Groenen M A M., Dijkhof R., Verstege E. & van der Poel J J. 1993. The complete sequence of the gene encoding bovine α _{s2} casein. *Gene* 12:187-193
- Groenen., M.A:M. & van der Poel J.J.. 1994. Regulation of expression of milk protein genes. A review. *Livestock Production Science* 38: 61-78.
- Grompe M. 1993. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genetics*. 5: 111-117.

- Grosclaude F., Joudner P. & Mahé M. F.. 1978. Polymorphisme de la caséine α_2 bovine: étroite liaison du locus α_2 -Cn avec les loci α_1 -Cn, β Cn et κ -Cn; mise en évidence d'une délétion dans le variant α_2 -CnD. *An. Génét Sél Anim* 1: 313-327
- Grosclaude F., Mahé M. F., Bngnon G., Di Stasio L. & Jeunet R.. 1987. A Mendelian polymorphism underlying quantitative variation of goat α_1 -casein. *Génét Sel Evol* 1: 399-412
- Grousclaude F.. 1988. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relations avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait. *INRA Production Animale* 1: 5-17.
- Hall L., Emery D. C., Davies M. S., Parker D. & Craig R. K.. 1987. Organization and sequence of the human α -lactalbumin gene. *Biochem. J.* 242: 735-742.
- Hallerman E. M., Nave A., Kashi Y., Holzer Z., Soller M. & J.S. Beckmann. 1987. Restriction fragment length polymorphisms in dairy and beef cattle at the growth hormone and prolactin loci. *Animal Genetics.* 18: 213-222.
- Harris S., Anderson A.S., Archibald A.L. & Clark A.J.. 1988. Complete nucleotide sequence of the ovine β -lactoglobulin gene. *Nucl. Acids. Res.* 16: 10379-10380.
- Hauser S. D., McGrath M. F., Collier R.J. & Krivi G.G. 1990. Cloning and in vivo expression of bovine growth hormone receptor messenger RNA. *Mol Cell Endocrinol.* 72: 187-200.
- Hayashi K. & D.W. Yandell. 1993. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum. Mutat.* 2: 338- 346.
- Heil, F. & Dumont J.P.. 1993. Caractéristiques organoleptiques de fromages de chèvre fabriqués à partir de laits contenant des variants génétiques différents de la caséine α_1 . *Lait.* 73:559-565.
- Hoj S. 1993. Possible Association of Growth Hormone Gene Polymorphism with Growth Hormone Release in Calves from Lines Selected for High and Low Milk Fat Yield. *Acta Agric. Scand.* 43: 129-135.
- Iwanana H., Yoshimoto K. & Itakara M.. 1992. Detection of point mutations by Sscp of PCR-amplified DNA after endonuclease digestion. *Biotechniques* 12:64
- King J. W. B.. 1967 The caseins of sheep's milk. In Polymorphismes Biochimiques des Animaux, pp 427-431. Paris. INRA. (*European Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphisms*, 10. 1966).

- Kioka N., Manabe E., Abe M., Hashi H., Yato M., Okuno M., Yamano Y., Sakai H., Komano T., Utsumi K. & Iritani A.. 1989. Cloning and Sequencing of Goat Growth Hormone Gene. *Agric. Biol. Chem.* 53: 1583-1587
- Kirkpatrick B W.. 1992a). Detection of a three- allele single strand polymorphism (SSCP) in the fourth intron of the bovine growth hormone gene. *Animal Genetics* 23: 179-80.
- Kirkpatrick B W.. 1992b). Identification of a conserved microsatellite site in the porcine and bovine insulin growth factor-I gene 5' flank. *Animal Genetics* 23:543-548.
- Kirkpatrick B. W. 1993. Diallelic single strand conformation polymorphism in the bovine insulin -like growth factor-1 third intron. *Animal Genetics* 24:144.
- Kirkpatrick B. W., Huff B. M. & Casas-Carrilo E. 1993. Double-strand DNA conformation polymorphism as a source of highly polymorphic genetic markers. *Animal Genetics* 24:155-61.
- Kirkpatrick B. W. & Hart G. L.. 1994. Conformation polymorphisms and targeted marker development. *Animal Genetics.* 25: 77-82.
- Koczan D., Hobom G., Seyfert H.M.. 1991. Genomic organization of the bovine α_1 -casein gene. *NucleicAcids Res* 1: 5591-5596
- Lien S. & Rogne S.. 1993. Bovine casein haplotypes: number, frequencies and applicability as genetic markers. *Animal Genetics.* 24: 373-376.
- Lee B.K., Lin G.F., Crooker B. A., Murtau G.H., Hansen L.B. & Chester-Jones H.. 1993. Associations of somatotropin (bST) gene polymorphism with selection for milk yield in Holstein cows. *J Anim Sci* 71:149.
- Lemal D., Renaville R. Claes V., Ruelle L., Fabry J., Burny A., Underwood L.E. & Ketelslegers J.M..1989. Effect of pituitary somatotropin injections on plasma insulin-like growth factor I and somatotropin profiles in growing heifers. *Journal of Animal Science* 67: 2715-2723.
- Leroux C., Martin P., Mahe M. F., Leveziel H. & Mercier J. C.. 1990. Restriction fragment length polymorphism identification of goat α_1 -casein alleles. A potential tool in selection of individuals carrying alleles associated with a high level protein synthesis. *Animal Genetics* 2: 341 -351
- Leroux C., Mazure N. & Martin P.. 1992. Mutations Away from Splice Site Recognition Sequences Might *cis*-Modulate Alternative Splicing of Goat α_1 -Casein transcripts. *The Journal of Biological Chemistry.* 267: 6147-6157.

- Leroux C., Amigues Y., Jansa M. & Martin P.. 1993. Polymerase chain reaction (PCR) based RFLP genotyping of goat α _{s1}-casein. *In: Biology of lactation in farm animals* (Enright WG, Petitclerc D and Politiek RD, eds), Elsevier Amsterdam,. 193-194
- Leveziel H., Metenier L. & Guerin G.. 1991. Restriction fragment length polymorphisms of ovine casein genes: close linkage between the α _{s1}, α _{s2}, β and κ casein loci. *Animal Genetics* 22: 1-10.
- Luck M., Ngsee J. Rottman F. & Smith M.. 1986. Synthesis of bovine prolactin in *Escherichia coli*. *DNA* 5: 21-35.
- Lucy M. C., Hauser S. D., Eppard P. J., Krivi G. G., Clark J. H., Bauman D. E. & Collier R. J.. 1993. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. *Domest. Anim. Endocrinol.* 10: 325-333.
- MacRae J. C. & Lobleby G. E. .1991. Physiological and metabolic implications of conventional and novel methods for the manipulation of growth and production. *Livest Prod Sci.* 27: 43-59.
- MacDowell G.H., Hart I. C. & Kirby A. C.. 1987. Local intra-arterial infusion of growth hormone into the mammary glands of sheep and goats: effects on milk yield and composition, plasma hormones and metabolites. *Austr. J. Bio. Sci.* 40: 181- 189.
- Maes E.,Priels J. P., Dolmans M. & Leonis J.. 1976. Identification of two genetic variants of goat α lactalbumin. *Arch Int Physiol Biochim* 8: 641-642
- Mahé M. F. & Grosclaude F.. 1989. α s1-Cn⁰, another allele associated with a decreased synthesis rate at the caprine α _{s1}-casein locus. *Genet Sel Evol* 21:127-129.
- Mahé M. F. & Grosclaude F.. 1993. Polymorphism of β casein in the creole goat of Guadeloupe: evidence for a null allele. *Génét Sél Evol* 25: 403-408.
- Manfredi E., Barbieri M. E., Bouillon J., Piacère A, Mahé M F, Grosclaude F. & Ricordeau. G. 1993. Effects des variants de la caséine α _{s1} sur les performances laitières de chèvres. *Lait.* 73:567-572.
- Mao F. C., Bremel R. D. & Dentine M. R.. 1991. Serum concentrations of the milk proteins α Lactoalbumina e β Lactoglobulina in pregnancy and lactation: correlation's with milk and fat yields in dairy cattle. 1991. *J Dairy Sci* 74: 2952.
- Martin P..1993. Polymorphism génétique des lactoprotéines caprines. *Lait* 73:511-532.
- Martin P. & Grosclaude F.. 1993. Improvement of milk protein quality by gene technology. *Livest Prod Sci* 3: 95-115

- Mathews S. L.. 1991. Molecular Biology of growth hormone receptors. *TEM*. 2: 176-180.
- Mercier J.C. & Gaye P., Soulier S., Hue-Delahaie D. & Vilotte J.L. 1985. Construction and identification of recombinant plasmids carrying cDNAs coding for ovine α_{s1} -, α_{s2} -, β -, κ - and β -lactoglobulin. Nucleotide sequence of α_{s1} - casein cDNA. *Biochimie* 67: 959-971.
- Mercier J. & Vilotte J. 1993. Structure and Function of Milk Protein Genes. *Journal of Dairy Science* 76: 3079-3098.
- Mercier J.C.& Grosclaude F. 1993. Génétique moléculaire des protéines du lait et de leurs gènes. *In* Biologie de la lactation. J Martinet et L Houdebine, INSERM/INRA eds. Paris, Versailles pp. 491-515.
- Miller W. & Eberhardt. 1983. Structure and evolution of the growth hormone family. *Endocrine Reviews*. 4: 97-130.
- Miranda G , Anglade P., Mahe M. F. & Emardt G . 1993. Biochemical characterization of the bovine genetic κ casein C and E variants. *Animal Genetics* 2: 27-31
- Mohabeer A Hiti A L & Martin W. J.. 1991. Non radioactive single strand conformation polymorphism (SSCP) using the Pharmacia "PhastSystem". *Nuclei Acids Res.* 19: 3154.
- Montgomery G.W., Sise J.A., Penty J.M., Tou H.M. & Hill D. F.. 1992. Sheep linkage mapping: restriction fragment length polymorphism detection with heterologous probes. *Animal Genetics*. 23: 411- 416.
- Montgomery G. W., Penty J. M., Henry H. M., Sise J. A., Lord E. A., Dodds K. G. & Hill D. F.. 1995. Sheep linkage mapping: RFLPs markers for comparative mapping studies. *Animal Genetics*. 26: 249-259
- Moody D.E., Pomp D., Barendse W., Womack J.E.. 1995. Assignment of the growth hormone receptor gene to bovine chromosome 20 using linkage analysis and somatic cell mapping. *Animal Genetics* 26: 341-343.
- Moore D., Conkling M. & Goodman H.. 1982. Human growth hormone: a multigene family. *Cell*. 29: 285-286.
- Munoz A., Hernández D., Jurado J. & serradilla J.. 1992. Aplicacion de un modelo animal para la valoracion genetica de reproductores de ganado caprino. *Terra arida*. 11: 111-120.

- Neibergs H. L., Dietz A. B. & Womack J. E.. 1993. Single strand conformation polymorphisms (SSCP's). detected in five bovine genes. 1993. *Animal Genetics* 24:81-4.
- Neibergs H. L., Ryan A. M., Womack J. E., Spooner R. L & Williams J.L. 1994. Polymorphism analysis of the prion gene in BSE-affected and unaffected cattle. *Animal Genetics* 25: 313-317
- Niall H., Hogan R., Sauer I., Rosenblum Y. & Greenwood F.. 1971. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene duplication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 68: 866-869.
- Orian J.M., O'Mahoney J. V. & Brandon M. R.. 1988. Cloning and sequencing of the ovine growth hormone gene. *Nuclei Acids Resear..* 16: 9046.
- Orita M., Suzuki Y., Sekiya T. & Hayashi K.. 1989. Rapid and Sensitive Detection of Point Mutations and DNA Polymorphisms using the Polymerase Chain Reaction. *Genomics.* 5: 874-879.
- Pander B. L. & Hill W.G.. 1993. Genetic evaluation yield from test day records on incomplete lactation. *Livestock Production Science.* 37: 23-36.
- Papiz M. Z., Savyer L., Eliopoulos E. E., Nort A. C. T., Findlay J. B. C. , Sivaprasadarao R., Jones T. A., Newcorner M. E. & Kraulis P. J.. 1986. The structure of β lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature* 32: 383-385
- Parsons Y. M., Cooper D. W., Piper L. & Adams T. E.. 1992. RFLPs at the ovine locus for growth hormone. *Animal Genetics* 23:571
- Prokop, C. M. 1990. Information on RFLPs and VNTRs in farm animals. *In Genome Analysis in Domestic Animals* (Gelderman H & Ellendorff F, eds), Verlag VCH, Weinheim, Federal Republic of Germany pp 147-156
- Prosser C. G., Fleet I. R., Corps A. N., Heap R. B. & Froesch E. R.. 1990. Increase in milk secretion and mammary blood flow by intra-arterial infusion of insulin-like growth factor-I into the mamary gland of the goat. *J. Endocrinol.* 126: 437-443.
- Provot C., Persuy M. A.& Mercier J. C.. 1995. Complete sequence of the ovine β -casein-encoding gene and interspecies comparison. *Gene* 154:259-263
- Ptak E. & Schaeffer L. R.. 1993. Use of test day yields for genetic evaluation of dairy sires and cows. *Livest. Prod. Sci.* 34: 23.
- Remeuf F.. 1989. Étude des relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. *Lait.* 69: 499-518.

- Remeuf F.. 1993. Influence du polymorphisme génétique de la caséine α_1 caprine sur les caractéristiques physico-chimiques et technologiques du lait. *Lait*. 73:549-557.
- Renaville R., Sneyers M., Devolder A., Massart S., Burny A. & Portetelle D.. 1992. Régulation endocrinienne et manipulation de la croissance bovine. *Cahiers Agricultures*. 1: 89-94.
- Renaville R., Sneyers M., Devolder A., Massart S., Burny A. & Portetelle D. 1994. Rôle des somatomédines/insulin-like growth factors dans la croissance pondérale foetale. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*. 29:355-367.
- Renaville R., Massart S., Shojae D., Brandi A., Devolder A., Sneyers M., Falaki M., Burny A. & Portetelle D.. 1995. Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor-I and their plasma binding proteins in different cattle breeds. *Zootecnica e Nutrizione Animale*. 2:75-84.
- Roberts B .T., Ditullio P., Vitale J., Hehir K. & Gordon K.. Cloning of the goat beta casein gene and expression in transgenic mice. EMBL n° M90559.
- Rocha J.L., Baker J.F., Womack J.E., Sanders J.O., Taylor J.F..1992. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. *J Anim Sci*. 70: 3360-3370.
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T.. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd Edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, USA.
- Schumm J. W., Knowlton R. G., Braman J. C., Barker D. F., Botstein D., Akots G., Brown V. A., Gravius T. C., Helms C., Hsiao K., Rediker K., Thurston J. G. & Donis-Keller H.. 1988. Identification of more than 500 RFLPs by screening random genomic clones. *A. Journal of Human Genetics* 42: 143-159.
- Sejrsen K., Foldager J., Sorenson M. T., Akers R. M. & Bauman D. E.. 1986. Effect of exogenous bovine somatotropin on pubertal mammary development in heifers. *Journal of Dairy Science*. 69:1528-1535.
- Serradilha J.M., Diaz-Carrillo E., Munoz-Serrano A. & Alonso-Moraga A.. 1992. Variacion cuantitativa de las caseinas de la leche de cabra. Posibilidades de seleccion para aumentar el rendimiento en queso. ITEA. 88A: 13-22.
- Sheffield V., Beck J., Kwitek A., Sandstrom D.& Stone E.. 1993. The sensitivity of Single-Strand Conformation Polymorphism for the detection of Single Base Substitutions. *Genomics*. 16: 325-332.

- Sneyers M., Renaville R., Devolder A., Massart S., Burny A. & Portetelle D., 1992. Variability in the bovine GH receptor amino acid sequence. *J. Endocrinol. Invest.* 15: 54-58.
- Sneyers M., Renaville R., Falaki M., Massart S., Devolder A., Boonen F., Marchand E., Brandi A., Burny A. & Portetelle D., 1994. *Taq I* restriction Fragment Length Polymorphisms for growth Hormone in Bovine Breeds and their association with Quantitative Traits. *Growth Regulation*: 4.
- Sobral M., Antero C., Borrego J. & Domingos A. Animal Genetic Resources. Indigenous Breeds: sheep and goats. Direcção Geral de Pecuária. Lisbon, 1987.
- Southern E. M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. mol Biol.* 98: 503-517.
- Thompson M. P., Kiddy C. A., Pepper L. & Zittle C. A., 1962. Variations in the α_1 casein fraction of individual cow's milk. *Nature.* 19: 1001-1002
- Threadgill D. W. & Womack J. E., 1990. Genomic analysis of the major bovine casein genes. *Nucleic Acids Res.* 1: 6935-6942
- Valinsky A., Shani K. & Gootwine E., 1990. Restriction fragment length polymorphism in sheep at the growth hormone gene is the result of variation in gene number. *Animal Biotechnology* 1: 135-144
- Vilotte J. L., Soulier S., Mercier J. C., Gaye P., HueDelahaie D. & Furet J. P., 1987. Complete nucleotide sequence of bovine α lactalbumin gene. Comparison with its rat counterpart. *Biochimie* 6: 609-620
- Vilotte J. L., Soulier S., Printz C. & Mercier J. C., 1991. Complete nucleotide sequence of goat alpha-lactalbumin-encoding gene: Comparison with its bovine counterpart and evidence of alpha-lactalbumin-related sequences in the goat genome. *Gene* 98: 271-276.
- West J. W., Bondari K. & Johnson J. C., 1990. Effects of bovine somatotropin on milk yield and composition body weight and condition score of Holstein and Jersey cows. *J Dairy Sci.* 73: 1062-68.
- Woychick R.P., Camper R.H., Horowitz S., Goodwin E.C. & Rottman F.M., 1982. Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. *Nucleic Acids Res.* 10:7197-7209.
- Yap E. P. & Macgee J. O., 1992. Nonisotopic Sscp detection in PCR products by ethidium bromide staining. *Trends Genetics.* 8:49.

- Yato M., Yamano Y., Oyabayashi K., Okuno M., Kioka N., Manabe E., Hashi H., Sakai H., Komano T., Utsumi K. & Iritani A.. 1988. Nucleotide sequence of the growth hormone gene cDNA from goat *Capra hircus* L.Tokara. *Nucleic Acids Research* 1: 3574.
- Yoshiaki Y., Masaki A., Mikawa S., Kioka N. Manabe E. Sakai H. Komano U. & Iritani A.,1991. Structural Analysis of repetitive DNA squences in the goat Growth hormone gene region. *Agri. Biol. Chem.*55: 633-639.
- Yu-Lee L. & Rosen J.. 1986. The rat casein multigene family. I. Fine structure of the γ casein gene. *J Biol Chem* 25: 10794-10804.
- Zhang, H.M., Brown D. R., DeNise S.K & Ax R.L.. 1993. Polymerase Chain Reaction-RFLP analysis of the bovine somatotropine gene. *J. Animal Science* 71:2272.

