

ESTUDO DO ALELO G DO GENE DA ALPHA_{s1}-CASEÍNA EM UMA POPULAÇÃO DE CABRAS LEITEIRAS

Soraya Marini¹
 Maria Amélia Menck Soares^{2*}
 Marcelo Teixeira Rodrigues³
 Débora Sommer⁴
 Ana Carolina de Sousa⁴
 Vickeline Namba⁴
 Eliane Gasparino⁵
 Luis Daniel Giusti Bruno⁵

MARINI¹, S; SOARES², M. A. M; RODRIGUES³, M. T; SOMMER⁴, D; GASPARINO⁵, E; BRUNO⁵, L. D. G; SOUZA⁴, A. C; NAMBA⁴, V. Estudo do alelo G do gene da alpha_{s1}-caseína em uma população de cabras leiteiras. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar*, Umuarama, v. 10, n. 2, p. 105-110, jul./dez. 2007.

RESUMO: Devido ao diminuído potencial alergênico do leite de cabra, em relação ao leite de vaca, as proteínas do primeiro têm sido investigadas e mostram um amplo polimorfismos da α_{s1} -caseína, variando de produção nula até 7 g/L. No locus gênico da α_{s1} -caseína já foram encontrados 18 alelos, sendo o alelo G relacionado a baixos níveis de α_{s1} -caseína (0,6 g/L), decorrente de uma transição G→A (guanina por adenina) no sítio doador de *splice* do intron 4, levando à perda do exon 4 durante o processamento do RNA mensageiro. No Brasil existem poucos relatos de estudos sobre o polimorfismo genético desta proteína. Assim, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para detecção do alelo G do gene da α_{s1} -caseína e verificar sua existência em um grupo de animais caprinos. Para isto, leucócitos foram utilizados para isolamento de DNA com o reagente CTAB e um par de *primer*, desenhado com base na sequência do *GenBank* (AJ504710), possibilitou a amplificação da região gênica de interesse, gerando produtos de PCR com tamanho de 550 pb. Após a digestão com a enzima *Acil*, foram observados dois fragmentos com tamanhos de 308 e 242 pb, indicando a presença da guanina no sítio doador de *splice*. Alguns animais, suspeitos de portarem o alelo G, tiveram amostras de DNA sequenciadas. Os resultados mostraram inexistência da transição de base e, conseqüentemente, a inexistência do alelo G nos 80 animais estudados, indicando a necessidade de investigação de um número maior de animais, por se tratar de um alelo raro.

PALAVRAS-CHAVE: *Capra Hircus*. *CSN1S1*. Polimorfismo.

STUDY ON THE G ALLELE OF THE ALPHA_{s1}-CASEIN GENE IN DAIRY GOATS

ABSTRACT: Due to the diminished allergenic potential of the goat milk in relation to dairy milk, the proteins of the former have been studied and show an extensive polymorphism of alpha s1-casein, ranging its production from 0 to 7 g/L. In the genic locus of the alpha s1-casein, 18 alleles were found, the G allele related to low levels of alpha s1-casein (0,6 g/L), resulting from a G→A (guanine for adenine) transition of splice of intron 4 in the donor site, taking the loss of exon 4 during the processing of the RNA messenger. There are few reports on studies related to genetic polymorphisms of this particular protein in Brazil. Therefore, this study aims to establish a protocol for the detection of the G allele of the alpha s1-Casein gene and to verify its existence in a herd of goats. Thus, leucocytes were used to isolate the DNA with the reagent CTBA and a pair of primer, drawn based on the sequence of the *GenBank* (AJ504710), enabled the amplification of the genic region of interest, generating PCR with the size of 550 pb as a result. After the acyl-enzyme digestion, two fragments, 308 and 242 pb, were observe indicating the presence of the guanine in the donator site of the splice. Some results showed the absence of basic transition and consequently, the absence of the G allele in all of the 80 animals studied, indicating that further investigation on a larger number of animals is needed as it refers to a rare allele.

KEYWORDS: *Capra Hircus*. *CSN1S1*. Polymorphism.

ESTUDIO DEL ALELO G DEL GEN DE LA ALPHA_{s1}-CASEÍNA EN UNA POBLACIÓN DE CABRAS LECHERAS.

RESUMEN: Debido al disminuido potencial alergénico de la leche de cabra, en relación a la leche de vaca, las proteínas del primero vienen siendo investigadas y muestran un amplio polimorfismos de la α_{s1} -caseína, variando de producción nula hasta

¹ Especialista em biotecnologia (Unioeste), Cascavel - PR Brasil.

² Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste. Centro de Ciências Biológicas. Cascavel – PR, Brasil.

*Autor correspondente: masoares@certto.com.br

³ Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Zootecnia Viçosa – MG, Brasil.

⁴ Acadêmica de Ciências biológicas (Unioeste) Cascavel – PR, Brasil.

⁵ Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Departamento de Zootecnia - Maringá – PR, Brasil.

7 g/L. En el *locus* génico de la α_{s1} -caseína ya fueron encontrados 18 alelos, siendo el alelo G relacionado a bajos niveles de α_{s1} -caseína (0,6 g/L), decurrente de una transición G→A (guanina por adenina) en el lugar donante de *splice* del intron 4, llevando a la pérdida del exón 4 durante el procesamiento del RNA mensajero. En Brasil hay pocos relatos de estudios sobre el polimorfismo genético de esta proteína. Así, esta investigación tuvo como objetivo establecer un protocolo para detección del alelo G del gen de la α_{s1} -caseína y verificar su existencia en un grupo de animales caprinos. Para esto, leucocitos fueron utilizados para aislamiento de DNA con el reactivo CTAB y un par de *primer*; diseñado con base en la secuencia del *GenBank* (AJ504710), posibilitó la ampliación de la región génica de interés, generando productos de PCR con tamaño de 550pb. Tras la digestión con la enzima *AclI*, fueron observados dos fragmentos con tamaños de 308 y 242pb, indicando la presencia de guanina en el lugar donante de *splice*. Algunos animales, sospechosos de portaren el alelo G, tuvieron muestras de DNA secuenciadas. Los resultados mostraron inexistencia de la transición de base y, consecuentemente, la inexistencia del alelo G en los 80 animales estudiados, indicando la necesidad de investigación de un número mayor de animales, por tratarse de un alelo raro.

PALABRAS CLAVE: *Capra Hircus*. *CSN1S1*. Polimorfismo.

Introdução

A proteína contida no leite é uma variável entre as diferentes raças de caprinos e está geneticamente relacionada ao locus da α_{s1} -caseína, que exhibe um alto grau de polimorfismo. As caseínas são as proteínas predominantes no leite de quase todas as espécies de mamíferos e constituem um grupo heterogêneo de fosfoproteínas. Os tipos de mutação relatados, que ocasionam esse alto grau de polimorfismo, são substituição ou deleção de um único nucleotídeo, ou grande deleção ou inserção de nucleotídeos (MARTIN, 1993).

Embora não seja a única fonte alergênica do leite, alguns neonatos apresentam alergias a níveis elevados desse tipo de proteína. Dessa forma, torna-se necessária a substituição do leite por um que apresente níveis inferiores, ou até praticamente nulos, dessa proteína em sua composição. Sendo assim, muitos especialistas recomendam o leite de cabra, ao invés do leite de vaca, isto porque o leite de cabra possui um teor inferior de caseína, reduzindo, assim, o potencial alergênico deste produto (BRANDÃO et al., 2006).

As possibilidades de se detectar ao nascer o genótipo dos animais, quanto ao gene da α_{s1} -caseína, pode fazer com que os produtores possam optar pela criação de animais com baixo teor de α_{s1} -caseína, para o desenvolvimento de um produto com propriedades nutracêuticas ou, alto teor, quando o interesse for a produção de queijo ou outros derivados. Assim, por razões econômicas e com objetivo de melhorar a eficiência de programas de seleção, os efeitos desse complexo polimorfismo têm sido estudados.

Estudos realizados anteriormente pelo mesmo grupo de pesquisa (MOGNOL, 2004; RUBIO et al., 2004; SANTOS et al., 2004), mostraram que, nos animais caprinos em estudo, há ocorrência dos alelos E, F e O. Entretanto, nenhum protocolo para identificar os demais alelos e verificar suas ocorrências no rebanho em estudo foi estabelecido (dezoito alelos no total).

Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para detecção do alelo G do gene da α_{s1} -caseína e verificar se o mesmo pode estar ocorrendo no rebanho caprino pertencente ao Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa – MG.

Revisão de Literatura

A produção mundial de leite de cabra, segundo dados estatísticos oficiais, é estimada em torno de 8.780 mil toneladas, sendo 129 mil produzidas no Brasil, colocando-o em 18º lugar na produção mundial, embora seja o Nordeste Brasileiro o maior detentor desta produção, contribuindo com cerca de 90% (FERREIRA; TRIGUEIRO, 1998).

Entretanto, esta produção é muito maior do que os dados estatísticos apresentam, por causa da grande quantidade de famílias que produzem somente para o seu consumo, em suas propriedades. Nos últimos 20 anos houve um grande aumento no número de cabras (FAO, 2001), isso porque houve também um aumento na demanda do leite de cabra, basicamente em três aspectos: consumo de leite (no lar), interesse por produtos feitos com leite de cabra, especialmente queijos e iogurtes e também ao fato de pessoas com alergia ao leite de vaca estarem procurando uma alternativa, que seria o consumo de leite e derivados de cabra (HAENLEIN, 2004).

As proteínas do leite compreendem duas frações principais: caseínas e as proteínas do soro, que estão em solução (DAVIAN et al. 2000). As caseínas podem ser separadas das proteínas do soro, principalmente, por dois processos: precipitação no pH isoelétrico (pH 4,6; 20°C) e coagulação pela ação da enzima quimosina-pepsina (coalho comercial), no processamento industrial de fabricação de queijos (WONG et al., 1996).

Leite de vaca e de cabra contém proporções similares de proteínas como κ -caseína (10 - 24%) e α_{s2} caseína (5 - 19%). Contudo, o leite de cabra contém níveis elevados, se comparado ao leite de vaca, de β -caseína (42 - 64% *versus* 34 - 41%) e baixos níveis de α_{s1} -caseína (0 - 26% *versus* 36 - 40%) (WALSTRA; JENNES, 1984; LAW; TZIBOULA, 1992).

As caseínas são fosfoproteínas que, em sua forma natural, apresentam-se agregadas, compondo as micelas que apresentam as caseínas α_{s1} , α_{s2} , β , em sua parte central, e a caseína κ , que se distribui, em parte, no corpo da micela e, em parte, na superfície, conferindo-lhe estabilidade físico-química (RASMUSSEN et al., 1999). A proporção das caseínas nas micelas é relativamente constante, 37% (α_{s1}), 37% (α_{s2}), 13% ($\beta+\delta$) 13% (κ -caseína), mas a distribuição das caseínas nas micelas não é uniforme, e compreende uma parte hidrofóbica central e uma camada hidrofílica periférica

(FOX; SWEENEY 1998).

As micelas são agregados levemente esféricos, em geral entre 40 e 300 nm de diâmetro, bastante volumosas, contendo mais água ou, mais precisamente, uma solução similar a “soro do leite”. Elas contêm, essencialmente, quatro tipos de moléculas de caseína em uma proporção de aproximadamente 4 : 1 : 4 : 1,3 de α_{s1} : α_{s2} : ($\beta+\delta$) : κ respectivamente, e aproximadamente 7% de matéria seca das micelas consiste de material inorgânico, predominantemente cálcio e fosfato (SCHIMIDT, 1982).

As caseínas são as proteínas predominantes no leite de quase todas as espécies de mamíferos (JENNES; HOLT, 1987), mas a concentração da caseína total no leite varia dependendo da espécie, como por exemplo, os primatas, que apresentam os valores mais baixos, como o leite humano, com 4,6 g/L e roedores, que apresentam os valores mais elevados como 11,5 g/L (JENNES, 1974; SGARBIERI, 2005). Estas fosfoproteínas apresentam função biológica de fornecer, à progênie, fonte de fosfato e cálcio para processos de mineralização de tecidos calcificados, bem como aminoácidos e peptídeos biologicamente ativos (FIAT et al., 1993).

Nessas duas últimas décadas, o cDNA e seqüências genômicas de genes das caseínas tem sido determinados. Evolutivamente, são compostos por três ou quatro genes (dependendo da espécie): α_{s1} -caseína, β -caseína, α_{s2} -caseína e κ -caseína (RIJNKELS, 2002).

As α_s e β - caseínas são insolúveis nos íons cálcio presentes no leite, assim como a α_{s1} , as α_{s2} - caseínas são peptídeos altamente fosforilados, enquanto que a κ -caseína é insensível ao cálcio e, assim, mantém um modelo de estabilidade e integridade da estrutura micelar (RAMUSSEN; JOHNSEN, 1999; RIJNKELS, 2002).

Estudos realizados com frações de proteína do leite de cabra, têm demonstrado o extensivo polimorfismo qualitativo da α_{s1} - caseína, associado com a variação quantitativa (BOULANGER et al., 1984; GROSCLAUDE et al., 1987).

O gene da α_{s1} - caseína de cabra representa um excelente modelo para demonstração de que a grande parte da variabilidade observada na α_{s1} - caseína, presente no leite de cabra, se deve à presença de alelos autossomais no *locus* estrutural α_{s1} - caseína (*CSN1S1*). Assim, 18 alelos foram identificados e são associados com diferentes níveis de expressão de α_{s1} - caseína no leite, sendo estes níveis designados “alto”, “médio”, “baixo” e nulo (CHINESE et al., 1997; MARTIN, 1997). Alelos A, B1, B2, B3, B4, C e M (3,6 g/L) H (4,2 g/L) e L (3,6 g/L) são relacionados com a elevada presença de α_{s1} - caseína; alelos I (1,7 g/L) e E (1,6 g/L) são de níveis intermediários; alelos D, F e G (0,6 g/L) estão relacionados a baixos níveis desta proteína no leite (CHINESE et al., 1997; MARTIN et al., 1999; BEVILACQUA et al., 2002). Os alelos nulos, três no total, estão associados à ausência de α_{s1} - caseína no leite. O alelo O₁ é caracterizado por uma grande deleção, enquanto que o alelo O₂ por uma grande inserção (LEROUX; MARTIN apud NEVEU et al. 2002). Não foram encontradas informações na literatura a respeito da alteração gênica que caracteriza o alelo O₃.

É importante ressaltar que não há somente os efeitos quantitativos, mas também os efeitos qualitativos da α_{s1} - caseína. Altos níveis de α_{s1} - caseína tem sido associados a elevado nível de proteína total e micelas menores, contendo menos cálcio. Sendo assim, apresentam melhor potencial na fabricação de queijos e coalho firme (CLARK; SHERBON, 2000). Baixos níveis de proteína estão associados a baixos conteúdos de gordura e a mais intensa lipólise, para dar um sabor mais forte (BARBIERI et al., 1995). Além disso, o leite com baixo teor de caseínas é uma importante opção, quando o indivíduo apresenta alergia se exposto demasiadamente a este tipo de proteína.

Os alelos que conferem altos níveis de caseína no leite parecem estar presentes predominantemente em raças localizadas na área do Mediterrâneo (Itália, Albânia e Grécia) e África, enquanto que os alelos de nível intermediário aparecem em maior freqüência na França e Espanha. As raças Suíças têm uma alta freqüência de alelos defectivos F, E e O. As raças Alpina, Saanen e Toggenburg apresentam todos estes alelos, por toda parte do mundo (ENNE et al., 1997).

O alelo G, relacionado a baixos níveis de alfa s1-caseína (0,6 g/L) é decorrente de uma transição G – A (substituição de guanina por adenina) no sítio doador de *splice* do *intron 4*. Esta substituição leva à perda do *exon 4* durante o processamento do RNA mensageiro, evento conhecido como *exon skipping* (MARTIN; LEROUX, 1994).

Material e Métodos

Para a caracterização das variantes genéticas, foram utilizadas 80 cabras leiteiras, das raças Saanen e Alpina, com dados sobre teores de proteína no leite, alojadas no Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa – MG.

Foram coletados, da circulação periférica, aproximadamente 10,0 mL de sangue de cada animal, em tubos *vacutainer* heparinizados e estéreis. A separação dos leucócitos foi efetuada por centrifugação a 2.500g por 10 minutos. Uma fração deste material, composto apenas por leucócitos, foi diluído em 1,0 mL de NET 100 (NaCl 100 mM, EDTA 100 mM pH 8,0, Tris-Cl 10 mM pH 8,0) e estocado a -20°C. A outra fração foi utilizada para a extração do DNA.

A extração do DNA genômico, a partir das células sanguíneas brancas, foi realizada por purificação com CTAB¹ (hexadeciltrimetilamonio), após tratamento com proteinase K. Alíquotas de DNA, para uso rotineiro, foram diluídas em água ultra-pura, autoclavada, a aproximadamente 50 ng/ μ L, e mantidas a 4°C.

Dois *primers*, desenhados com base na seqüência do gene da α_{s1} -caseína caprina, disponível no *GenBank* (nº de acesso AJ504710), foram utilizados para amplificar a região gênica de interesse, sendo o *primer* direto 5'GGCCTGATAAAGAAGGAACCA 3' (CnG-D), com anelamento no final do *intron 3* e o *primer* reverso 5'CTCTACAATATTCTGGATGTGT3' (CnG-R), com anelamento no final do *intron 4*.

O sistema de amplificação continha, além dos *primers* e do DNA genômico, dNTPs, *Taq* DNA polimerase¹,

¹ Across-Organics, New Jersey, USA

MgCl₂, Tris-HCl, KCl, e água ultra-pura, em um volume final de 20 µL. O programa de amplificação utilizado no termociclador² constou de etapas que compreenderam, além da etapa inicial de desnaturação do DNA genômico, a 94°C, por 4 minutos, 30 ciclos de desnaturação da fita molde a 94°C, anelamento dos *primers* a 64°C e extensão da fita a 72°C pela DNA polimerase. Após a amplificação, o DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, o que permitiu verificar se cada fragmento de DNA foi suficiente e especificamente amplificado.

Os fragmentos de DNA que foram adequadamente amplificados foram clivados com 4 unidades da enzima de restrição *AciI*³ para detecção do polimorfismo. A escolha desta enzima foi realizada com o auxílio do programa *Restrictionmapper*. O resultado da digestão foi avaliado em gel de poliácridamida 5%.

Alguns animais tiveram amostras de DNA da região sob investigação, submetidas ao seqüenciamento automático. Para este fim, os fragmentos obtidos por PCR foram purificados⁴ e seqüenciados⁵ segundo a técnica de terminação de cadeia descrita por SANGER et al., (1977), usando-se o kit de seqüenciamento Big Dye Terminator⁶. As seqüências geradas foram comparadas com a seqüência depositada no *GenBank*, utilizando-se o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997).

Resultados e Discussão

Os *primers* desenhados permitiram a amplificação de um fragmento de PCR com tamanho de 550 pares de bases (pb), correspondendo ao tamanho esperado, conforme cálculos baseados na seqüência gênica AJ504710 (Figura 01).

```
5864...ggcctgataaagaaggaacccaatatggtgtct
ccttcagatTTTTAAATAAAATcATAAAactgaaactaat
tatctcttattttacctaagaaatattttgggtttacctaa
ataaatggagaattgtgttcaaatggaaaaacattctcct
TTTTgactgtgttttcaacttttacaattcacatttaaat
tcctacaggaagtcctcaatgaaaatttactcagggtttgt
tgTgGcgGtaagtattatctacttcttcttcaatgacaaa
tgtatTTTTctggaaaaatcaacttaatttttattataaa
atatttttcaacttggtcaaatTTTTtcttcaatttactca
cccagcaaccataaataatattgaaattatataatgcaaaa
tattaaaaagctgctttaaataatctgtacctataaca
ttgactctttgtaaaacacttatgtctgtcttgtgcataa
tctatgtaaattttataatttccattctcattatgatgga
atgttctcttatctctacaatattctggatgtgtt...64
13
```

Figura. 01 – Fragmento com 550 pb do gene *CSN1S1* de caprinos (*GenBank*: AJ504710). Os *primers* direto e reverso estão sublinhados. *Exon 4* em negrito. A base substituída no alelo G (G por A) encontra-se em caixa alta e sublinhada.

Foram submetidos à clivagem com a enzima de restrição *AciI* 80 fragmentos de DNA, correspondendo ao mesmo número

de animais que tiveram o material genético adequadamente amplificado.

Foram submetidos à clivagem com a enzima de restrição *AciI* 80 fragmentos de DNA, correspondendo ao mesmo número de animais que tiveram o material genético adequadamente amplificado.

Em todas as amostras, foram observados dois fragmentos com tamanhos de 308 e 242 pares de bases (Figura 02), correspondendo ao corte pela enzima de restrição, indicando a presença da base G no local sob investigação. A substituição de base (G por A) no sítio doador de *splice* do *exon 4* (MARTIN; LEROUX, 1994), característico do alelo G, leva à perda do sítio de restrição da enzima, uma vez que esta reconhece a seqüência C/CGC.

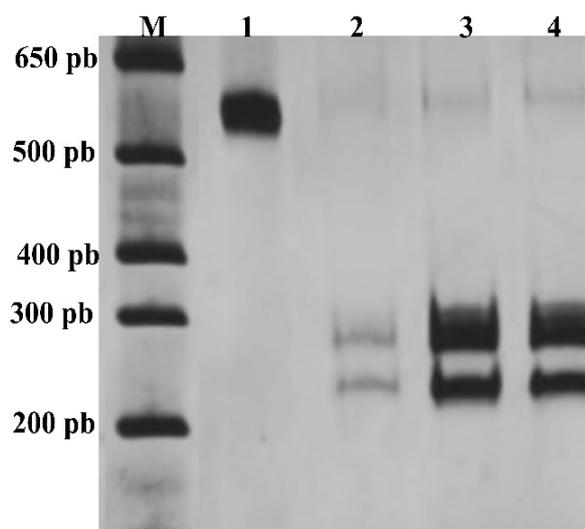


Figura. 02 – Imagem em gel de poliácridamida 5%. M = Marcador de peso molecular; canaleta 1 = fragmento não digerido; canaletas 2, 3 e 4 = fragmentos digeridos (fragmento sem substituição de base).

Estudos da região gênica sob investigação mostraram que a base G estava presente nos fragmentos dos dois animais utilizados para sequenciamento, visto que estes animais foram enquadrados como suspeitos, por não apresentarem as variações mais frequentes no gene sob investigação, característicos dos alelos E e F (respectivamente, média e baixa produção de α_{s1} -caseína no leite), e também não apresentavam as combinações gênicas para os alelos “altos”, assim denominados por produzirem alta quantidade desta proteína no leite. Estes animais podem ser portadores de algum outro alelo raro, o que será verificado por estudos posteriores.

Com a ocorrência da transição (G por A), observada no alelo G, 13 resíduos de aminoácidos são deletados, uma vez que, com esta substituição, o sítio doador de *splice* do intron 4 passa a não ser reconhecido e o *exon 4* é removido juntamente com o intron, ocasionando a perda desses

¹ Invitrogen, São Paulo-SP.

³ Eppendorf AG, Hamburg – Germany.

⁴ BioLabs – New England.

⁵ Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System – PROMEGA – Madison, WI, USA.

⁶ MegaBACE 1000 Amersham Life Science – USA.

⁷ DYEnamic ET Dye Terminator Kit – GE Healthcare, USA.

aminoácidos, modificando a proteína madura (MARTIN; LEROUX, 1994). Estudos comparativos, realizados com microscopia eletrônica do epitélio da glândula mamária de cabras em lactação, sugerem uma disfunção nos mecanismos secretórios em animais homocigotos para os alelos O, F e G e, em menor extensão, para os portadores do alelo E (NEVEU et al., 2002), o que pode explicar o baixo conteúdo desta proteína no leite dos portadores do alelo G.

Grosclaude et al. (1994) determinaram uma frequência dos alelos D, O e G juntos, em uma população de cabras na França, de 0,05 para a raça Alpina e 0,03 para a raça Saanen, demonstrando, assim, que o alelo em estudo (G) é bastante raro nas populações analisadas. Os mesmos pesquisadores analisaram uma população de 70 animais da raça Saanen na Itália, sendo que neste grupo de animais não foi verificada a presença do alelo G.

Estes achados apoiam os raros trabalhos que afirmam que este alelo apresenta frequência extremamente baixa em caprinos leiteiros, sem descartar a possibilidade de inexistência do mesmo no rebanho de onde estes animais foram retirados. Para uma análise mais conclusiva, um número maior de animais necessita ser investigado.

Conclusões

O protocolo desenvolvido e apresentado em Material e Métodos possibilita a fácil identificação do alelo G do gene da α_{s1} -caseína em caprinos.

Dentre os fragmentos de DNA avaliados, provenientes dos 80 animais caprinos investigados, não foram encontrados animais homocigotos ou heterocigotos para o alelo G do gene da α_{s1} -caseína (CSN1S1).

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À coordenadora local do GENOPAR, professora Clarice Aoki Osaku (Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste), pela gentil disponibilização de alguns equipamentos.

Referências

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A. It gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BARBIERI, M. E. et al. Influence du locus de la caséine α_{s1} sur les performances laitiers et les paramètres génétiques des chèvres de race Alpine. **Genet. Sel. Evol.** v. 27, n. 5, p. 437-450, 1995.

BEVILACQUA, C. et al. Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new α_{s1} -casein variant found in the goat species. **Eur. J. Biochem.** v. 269, n. 4, p. 1293-1303, 2002.

BOULANGER, A.; GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M. F. Polymorphism des caséines α_{s1} et α_{s2} de la chèvre (*Capra*

hircus). **Genetics Selection Evolution**, v. 16, n. 2, p. 157-176, 1984.

BRANDÃO, S. C. C.; MATEDI, M. A. L.; CARDOSO, M. L. O. Alergia e intolerância ao leite de vaca. **Departamento de Tecnologia de Alimentos** – Universidade Federal de Viçosa – MG, 2006.

CLARK, S.; SHERBON, J. W. Genetic variants of α_{s1} -CN in goat milk: breed distribution and association with milk composition and coagulation properties. **Small Ruminant Research**, v. 38, n. 2, p. 135-143, 2000.

CHINESE L.; FERRANT, P.; GARRO, G.; MAURIELLE, R.; ADDEO, F. Occurrence of three novel α_{s1} -casein variants in goat milk. Seminar on Milk protein polymorphism, Palmerston North, New Zealand. **Proceedings...** p. 259-267, 1997.

DAVIAN, C. et al. Rennet coagulation of skin milk and curd drainage: Effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. **Le Lait. France**, v. 80, n. 4, p. 397-415, 2000.

ENNE, G. et al. Gene frequencies of caprine α_{s1} caseína polymorphism in dairy goat. In Milk protein polymorphism, proceedings of the IDF Seminar, Palmerston North, New Zealand, IDF S.I. 9702 Brussels: IDF, Feb. p. 275-279, 1997.

FAO. **Dados estatísticos**. Disponível em: <<http://www.fao.org/countryfiles/index.asp>>. Acesso em: 15 jul. 2006.

FERREIRA, M. C. C.; TRIGUEIRO, I. N. S. Produção de leite de cabras puras no Curimataú paraibano durante a lactação. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 18, n. 2, maio/jul. 1998.

FIAT, A-M. et al. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 76, n.1, p. 301-310, 1993.

FOX, P. F.; M. C. SWEENEY, P. L. H. **Milk proteins. In Dairy Chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic, p. 147-238, 1998.

GROSCLAUDE, F. et al. A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat α_{s1} -casein. **Genetics Selection Evolution**, v. 19, n. 4, p. 399-412, 1987.

_____. Du gene au fromage: le polymorphisme de la caséine α_{s1} caprine, ses effets, son evolution. **Productions Animales**, France, v. 7, n. 3, p. 19, 1994.

HAENLEIN, G. F.W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research** Elsevier B. V. Amsterdã, v. 51, n. 2, p. 155-163, 2004.

JENNES R. The composition of milk. In: Larson BL, Smith VR editors. Lactation; **A comprehensive Treatise**, New

- York: Academic Press, p. 3-107, 1974. v. 3.
- JENNES, R.; HOLT, C. Casein and lactose concentrations in milk of 31 species are negatively correlated. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 43, n. 9, p. 1015-1018, 1987.
- LAW, A. J. R.; TZIBOULA, A. Quantitative fractionation of caprine casein by cation-exchange HPLC. **Milchwissenschaft**, v. 47, n. 9, p. 558-562, 1992.
- MARTIN, P.; LEROUX C. Characterization of a further α_{s1} -casein variant generated by exon-skipping, 24th ISAG Conference, Prague, **Abstract ...** p. 88, 1994.
- MARTIN, P. Polymorphisme génétique des lactoprotéines caprines. **Le Lait**, v. 73, n. 5-6, p. 511-532, 1993.
- _____. **La composition protéique du lait de chèvre: ses particularités.** Actes du colloque: Le lait de chèvre, un atout pour la santé. INRA Editions, France n. 81, p. 27-50, 1997.
- MARTIN, P.; BOUSQUET, M. O.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of caseins: a tool to investigate casein micelle organization. **International Dairy Journal** Alberta University, Canadá, v. 9, n. 3-6, p. 163-171, 1999.
- MOGNOL, G. P. **Detecção do alelo F do gene da α_{s1} -caseína em cabras leiteiras das raças Saanen e Alpina.** 2004. f. Monografia (Conclusão de curso em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2004.
- NATIONAL Center for Biotechnology Information- NCBI. *GenBank*. [2001]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 15 out. 2005.
- NEVEU, C. et al. Is the apocrine milk secretion process observed in the goat species rooted in the perturbation of the intracellular transport mechanism induced by defective alleles at the α_{s1} -Cn locus? **Reprod. Nutr. Dev.** v. 42, p. 163-172, 2002.
- RASMUSSEN, L. K.; JOHNSEN, A. et al. Disulphide-linked caseins and casein micelles. **International Dairy Journal**. Canadá, v. 9, n. 3-6, p. 215-218, 1999.
- RESTRICTION MAPPER. Disponível em: <<http://www.restrictionmapper.org/>>. Acesso em: 05 mar. 2006.
- RIJNKELS, M. Multispecies Comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia Springer**, v. 7, n. 3, p. 327-345, 2002.
- RUBIO, F. et al. Investigação da ocorrência do alelo "o" do gene da alfa₁-caseína em cabras leiteiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50., 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: [s.n.], 2004.
- SCHIMIDT, D. G. Association of caseins and casein micelle structure, In P. F. Fox. London: Applied Science Publishers, 1982. p. 61-86.
- SGARBIEIRI, V. C. Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Braz. J. Food Technol.** Campinas, v. 8, n.1, p. 43-56, jan./mar. 2005.
- SANGER, F. et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, v.12, p. 5463-5467, 1977.
- SANTOS, D. S. F. et al. Detecção do alelo E da alpha s1-caseína em cabras leiteiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50., 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: [s.n.], 2004.
- WALSTRA, P.; JENNES, R. **Dairy chemistry and physics.** New York: Wiley, 1984.
- WEBCUTTER **Enzimas de clivagem.** Disponível em: <<http://www.firstmarket.com/firstmarket/cutter/>>. Acesso em: 05 mar. 2006.
- WONG, D. W. S.; CAMIRANT, W. M.; PAVLATH, A. E. Structures and functionalities of milk proteins. **Crit Rev Food Sci Nutr.** v. 36, n. 8, p. 807-844, 1996.
- YEASTGENOME. **Desenho de primers.** Disponível em: <<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer/>>. Acesso em: 13 nov. 2005.

Recebido em: 29/12/2006

Aceito em: 29/05/2008