



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

NATALIA BIANCA CAIRES MEDEIROS

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES CSN1S1 E CSN3
EM FÊMEAS BUBALINAS DE PADRÃO RACIAL MURRAH**

**PARAUAPEBAS
2020**

NATALIA BIANCA CAIRES MEDEIROS

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES CSN1S1 E CSN3
EM FÊMEAS BUBALINAS DE PADRÃO RACIAL MURRAH**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Produção Animal na Amazônia: área de concentração Tecnologia na Produção Animal, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dr^a. Marília Danyelle Nunes Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Raylon Pereira Maciel

**PARAUPEBAS
2020**

Medeiros, Natalia Bianca Caires

Estudo de polimorfismos nos genes CSN1S1 e CSN3 em fêmeas bubalinas de padrão racial Murrah / Natalia Bianca Caires Medeiros - Parauapebas, 2020.

47 f.:Il.

Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Produção Animal) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus de Parauapebas, 2020.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Danyelle Nunes Rodrigues.

1. Búfalo 2. Leite 3. Sequenciamento 4. SNP 5. Variantes genéticas I. Rodrigues, Marília Danyelle Nunes (orient.) II. Título.

CDD – 636.292

Ficha elaborada pelo bibliotecário Marcos Edilson C. Martinho (CRB-2-1450)

NATALIA BIANCA CAIRES MEDEIROS

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES CSN1S1 E CSN3
EM FÊMEAS BUBALINAS DE PADRÃO RACIAL MURRAH**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Produção Animal na Amazônia: área de concentração Tecnologia na Produção Animal, para obtenção do título de Mestre.

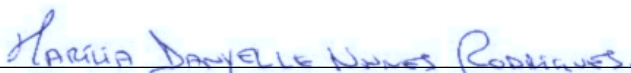
Orientadora: Prof. Dr. Marília Danyelle Nunes Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Raylon Pereira Maciel

05 de março de 2020

Data da Aprovação

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr^a Marília Danyelle N. Rodrigues – Orientadora
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



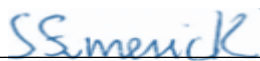
Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy – 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



Prof. Dr. Rommel Thiago Jucá Ramos – 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ



Prof. Dr. Cristian Faturi – 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



Prof. Dr. Lucas Luz Emerick – Suplente
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à DEUS, quem me abençoa e me guarda todos os dias, me permitindo realizar dos mais simples, aos meus maiores sonhos, da melhor forma possível, e principalmente me concedendo o direito de viver com dignidade, paz e luz.

Agradeço aos amores da minha vida, Sandra Mara Medeiros, Genesio Medeiros, Jheniffer Medeiros, Jhoni Willian Medeiros, Luciene Medeiros, Wellington Medeiros, “primaiada” toda, por infinitamente tudo, cada ralhada, e muitas vezes acobertamento e defesa.

À minha Universidade (UFRA) a qual me ajudou a construir não apenas a minha vida acadêmica, mas me ensinou muito sobre caráter e a importância de sempre tentarmos fazer o bem, por meio de meus professores, em especial a meus primeiros orientadores Ayres e Leonardo Vaz, que logo no meu primeiro semestre, me apadrinharam e me estimularam a ter o gosto da escrita;

Posteriormente a professora Andrea Siqueira, minha primeira mãe “torta”, com quem desenvolvi inúmeras qualidades, e quem sempre me dizia “minha filha você precisa escrever menos poético”; Ao professor Perlon, meu primeiro orientador de monitoria, quem fez eu caminhar cerca de 20 dias toda a área da Ufra com um GPS e um bloquinho para confeccionar meu primeiro mapa, e quem sempre me ajudava na graduação quando ninguém mais podia resolver; Ao meu casal favorito de todos os tempos Profs Ricardo Shigueru e Daiane de Cinque, excepcionais em todos os sentidos, serei eternamente grata por tudo que fizeram por mim, e principalmente pela amizade; Ao professor Marcos Rodrigues, minha inspiração no ambiente estatístico R; A professora Marília Nunes, por lapidar meu conhecimento em diversas competências e me estimular a fazer coisas as quais sem seu estímulo provavelmente nunca teria feito e por ser minha atual mãe torta, e orientadora acadêmica, moral e sentimental. Aos professores Rafael, Rennan, Raylon, Daiany, Janaína, Vicente, Ernestina, Kaliandra e Lucas por toda a dedicação com a qual lecionam; Ao professor Igor Hamoy pelas oportunidades em seu laboratório, e por todo o ensinamento direto e indireto.

À minha banca de qualificação e defesa, os professores Marília Nunes, Igor Hamoy, Raylon Maciel, Rafael Mezzomo, Lucas Emerick, Cristian Faturi e Rommel Ramos, muito obrigada por todas as considerações, e por me ajudar com o tempo tão reduzido. Ao corpo docente e discente do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal na Amazônia.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica na Amazônia (Procad - Amazônia) /Capes-UFPA/UFRA, por meio do projeto intitulado “Intensificação da produção de animais ruminantes de forma sustentável no Norte do Brasil” que através do professor Rafael Mezzomo, tive a oportunidade de ser e ter parte da minha dissertação financiada por esse importante programa de incentivo acadêmico. Gratidão.

Aos amigos Suellen, Rairiana, Sayumi, Sávio, André Sá, Andreza, Geovanna, Beatriz, Marcela Amaral, Elson, Geicy, Leandro, Tattiele, Carolina Pachón, Wanderson, Filho, Anilton, Julian, Andre, Nayane, Samique, Viviane, Vitória, Pedro, Beatriz Acosta, Gislayne, Romulo, Rodolfo, Jhones, Elaine, Marinalva, Romero, Patricia, Elias da Contruforte, Marcelo Parceirinho, e ainda, como neste momento me falha a memória, muito obrigada a todos que me ajudaram de alguma forma, e que conviveu comigo nesses últimos 6 anos.

Muita LUZ!

*“Estou fascinado com a ideia de que a **genética** é digital.
Um gene é uma longa sequência de letras codificadas,
como informações do computador.
A biologia moderna está se tornando muito mais
um ramo da tecnologia da informação.”*

(Richard Dawkins)

RESUMO

As características do leite, são controladas por vários genes, com destaque para os quatro genes da caseína, CSN1S1; CSN1S2; CSN2 e CSN3, que são responsáveis por codificar as quatro frações da referida proteína, são elas, a α -caseína que inclui α (S1) e α (S2), β e κ -caseína. O estudo de variantes genéticas nesses genes, buscam investigar alelos, inserções ou deleções, que possam refletir diretamente em características produtivas, indicando diferenças na qualidade, composição e rendimento do leite. Dessa forma, o objetivo desse estudo é investigar a ocorrência de polimorfismos nos genes CSN1S1 e CSN3, em fêmeas bubalinas de padrão racial Murrah. Os genes CSN1S1 e CSN3, foram analisados em 41 búfalas da raça Murrah em lactação, por meio do sequenciamento de nucleotídeos. Os pares de primers amplificaram fragmentos de 313 pares de base (pb) para o gene CSN1S1, e 350 pb para o gene CSN3. Um SNP foi encontrado no fragmento amplificado para o gene CSN1S1, localizado no nucleotídeo de número 2.123 da região promotora (5' UTR), na posição nt-258 (A/G), o qual não causa nenhuma alteração de aminoácido. As frequências genotípicas observadas desse SNP foram distintas das frequências genotípicas esperadas (EHW - Equilíbrio de Hardy -Weinberg), e além disso, a heterosigosidade observada (H_o) apresentou-se maior que a heterosigosidade esperada (H_e). Quanto ao gene CSN3, foram identificados nesse estudo, dois SNPs nt-98 e nt-102 (nucleotídeos de número 377 e 381 do éxon de número 4, do gene CSN3), presentes nos códons 33 (A C C / A T C) e 34 (A C C / A C T) do fragmento analisado, os quais correspondem aos códons 135 e 136 do peptídeo maduro, e que, uma vez traduzidos, resultam nos aminoácidos Treonina (Thr) / Isoleucina (Ile), no caso dos códons ATC / ACT e Treonina / Treonina, para os códons ACC / ACC. De acordo com as análises, as frequências genotípicas e observadas foram distintas para o gene CSN3. E mais uma vez, a heterosigosidade observada (H_o) apresentou-se maior que a heterosigosidade esperada (H_e), sugerindo-se assim, um excesso de heterozigotos em relação ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Um novo SNP foi encontrado no gene CSN1S1 (5' UTR) em búfalos, e outros 2 polimorfismos no gene CSN3 (éxon 4) ainda não descritos em bubalinos do padrão racial Murrah, criados sob clima tropical, foram investigados. Com isso, o conhecimento de polimorfismos de genes candidatos em búfalos leiteiros sugere e fomenta que sejam realizados estudos que objetivem estabelecer associações entre tais variantes e características de produção de leite e seus derivados, viabilizando a seleção assistida por marcadores moleculares.

Palavras – chave: Búfalo. Leite. Sequenciamento. SNP. Variantes genéticas.

ABSTRACT

The characteristics of milk are controlled by several genes, with emphasis on the four casein genes, CSN1S1; CSN1S2; CSN2 and CSN3, which are responsible for encoding the four fractions of that protein, are they, α -casein which includes α (S1) and α (S2), β and κ -casein. The study of genetic variants in these genes, seek to investigate alleles, insertions or deletions, which may reflect directly on productive characteristics, indicating differences in the quality, composition and yield of milk. Thus, the objective of this study is to investigate the occurrence of polymorphisms in the CSN1S1 and CSN3 genes, in buffalo females of the Mur-rah racial pattern. The CSN1S1 and CSN3 genes were analyzed in 41 lactating Murrah buffaloes, using nucleotide sequencing. The primer pairs amplified fragments of 313 base pairs (bp) for the CSN1S1 gene, and 350 bp for the CSN3 gene. An SNP was found in the amplified fragment for the CSN1S1 gene, located in nucleotide number 2.123 of the promoter region (5'UTR), at position nt-258 (A / G), which does not cause any amino acid alteration. The observed genotypic frequencies of this SNP were different from the expected genotypic frequencies (EHW - Hardy-Weinberg Equilibrium), and in addition, the observed heterosigosity (H_o) was higher than the expected heterosigosity (H_e). As for the CSN3 gene, two SNPs nt-98 and nt-102 (nucleotides number 377 and 381 of exon number 4, of the CSN3 gene) were identified in codons 33 (ACC / ATC) and 34 (AC C / AC T) of the analyzed fragment, which correspond to codons 135 and 136 of the mature peptide, and which, once translated, result in the amino acids Threonine (Thr) / Isoleucine (Ile), in the case of the ATC / ACT codons and Threonine / Threonine, for the ACC / ACC ha-plotypes. According to the analyzes, the genotypic and observed frequencies were different for the CSN3 gene. And again, the observed heterosigosity (H_o) was greater than the expected heterosigosity (H_e), thus suggesting an excess of hetero-zygotes in relation to the Hardy-Weinberg equilibrium model. A new SNP was found in the CSN1S1 gene (5'UTR) in buffaloes, and another 2 polymorphisms in the CSN3 gene (exon 4) not yet described in buffalo of the Murrah racial pattern, raised under tropical climate, were investigated. Thus, the knowledge of candidate gene polymorphisms in dairy buffalo suggests and encourages studies to be carried out that aim to establish associations between such variants and characteristics of milk production and its derivatives, enabling selection assisted by molecular markers.

Keywords: Buffalo. Milk. Sequencing. SNP. Genetic variants.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - População global de búfalos domésticos, em relação ao Continente (%).

Gráfico 2 - População de búfalos domésticos no continente americano (%).

Gráfico 3 - Búfalos criados no Brasil, de acordo com a região (%).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mapa da área onde foi realizado o estudo.
- Figura 2** - Sequências de nucleotídeos e aminoácidos do fragmento amplificado no gene CSN1S1 em fêmeas bubalinas da raça Murrah.
- Figura 3** - Diferentes padrões encontrados para o gene CSN1S1, na posição #2.123 (região promotora (5' UTR), (Genótipos AA, GG e AG).
- Figura 4** - Sequências de nucleotídeos e aminoácidos do fragmento amplificado do gene CSN3 de fêmeas bubalinas da raça Murrah.
- Figura 5** - Diferentes padrões encontrados para o gene CSN3, na posição #377 e #381 (éxon 4, genótipos CC, TT e CT (GG, AA e GA reverse complement)).
- Figura 6** - Parte das sequências de nucleotídeos (de nt-91 a nt-135) e de aminoácidos (de 31 a 45 do alinhamento) do segmento de DNA amplificado por PCR de búfalas leiteiras da raça Murrah, mostrando o alelo C, códon 33 Thr (ACC) / códon 34 Thr (ACC) e alelo T, códon 33 Ile (ATC) / códon 34 Thr (ACT).

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO	11
1.1	Revisão de literatura	12
1.1.1	Bubalinocultura leiteira	12
1.1.1.2	Principais raças produzidas	15
1.1.2	Melhoramento genético de bubalinos leiteiros	16
1.1.3	Proteínas do leite	18
1.1.3.1	Proteínas do soro do leite	18
1.1.3.2	Caseínas	19
1.1.4	Polimorfismos de caseínas do leite bubalino	21
	REFERÊNCIAS	22
2	ESTUDO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES CSN1S1 E CSN3 EM FÊMEAS BUBALINAS DE PADRÃO RACIAL MURRAH	31
2.1	Introdução	31
2.2	Material e métodos	32
2.2.1	Animais e área de estudo	32
2.2.2	Coleta de material biológico	33
2.2.3	Análises moleculares	33
2.3	Resultados e discussão	35
2.3.1	Gene da α - caseína (s1): CSN1S1	35
2.4.2	Gene da κ -caseína: CSN3	38
2.4	Conclusões	42
	REFERÊNCIAS	43
3	CONCLUSÕES GERAIS	46

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Atualmente, o rebanho bubalino brasileiro é estimado em mais de 200 milhões de animais espalhados por todas as regiões (FAOSTAT, 2019), especialmente, a região Norte, que responde por cerca de 66% do rebanho nacional (IBGE, 2016). Considerada uma espécie de múltiplas aptidões (carne, leite e tração) (CRUZ-CRUZ et al., 2014), o búfalo é responsável pela produção de cerca de 100 milhões de litros de leite por ano, distribuídos entre aproximadamente 150 laticínios espalhados pelo país (ANUÁRIO LEITE, 2018).

O leite de búfala é um dos leites mais ricos do ponto de vista nutricional (MÉNARD et al., 2010), uma vez que apresenta elevados teores de sólidos totais (gordura, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas) encontrados na literatura, que variaram de 14,96%; 17,70% (MISRA et al., 2008) a 18,45% (KAPADIYA et al., 2016), gordura, que pode variar de 5,60% (FANGMEIER et al., 2019); 6,2% (RASHEED et al., 2016) a até, 8,3% no leite, podendo se estender a 15%, em condições favoráveis (VARRICCHIO et al., 2007).

A lactose, considerada como o principal carboidrato do leite, é a base para a obtenção dos derivados por meio da fermentação, apresentando valores entre 4,86% (KAPADIYA et al., 2016) e 5,37% (SARKAR et al., 2006), enquanto que a proteína, conta com valores que variam de 3,91% (DUBEY et al., 1997); 4,14% (BALUSAMI, 2015) a 4,65% (YADAV et al., 2013), podendo ser dividida em dois grupos, proteínas do soro e caseínas.

Em relação a fração composta exclusivamente por proteína verdadeira, as proteínas do soro, estão presentes na proporção de 17% (RAFIQ et al., 2016), representadas principalmente pelas proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina (HUMA et al., 2018), codificadas pelos genes LALBA (MANZOOR SIDRA AND NADEEM, 2019) e BLG (SINGH et al., 2015), respectivamente. Enquanto que, as caseínas representam 83% da proteína verdadeira encontrada no leite bubalino (RAFIQ et al., 2016), distribuídas em: α -caseína s1, α -caseína s2, β -caseína e κ -caseína (HUMA et al., 2018), codificadas pelos genes CSN1S1, CSN1S2, CSN2 e CSN3 (DAGNACHEW et al., 2011), respectivamente.

Até o momento, a investigação e aplicação de ferramentas moleculares na bubalinocultura leiteira encontram-se em fase de desenvolvimento, entretanto, tem chamado a atenção, devido a propiciarem o ganho de tempo e a economia de recursos financeiros (OLIVEIRA et al., 2017), possibilitando a identificação do potencial genético dos indivíduos ainda no início da vida, potencializando o processo de seleção dos animais, resultando em sistemas mais lucrativos e que se sustentem a longo prazo.

Estudos que identifiquem variantes genéticas de genes candidatos em bubalinos, e posteriormente, as associem com características de rendimento e qualidade do leite bubalino, ainda são incipientes na literatura, principalmente ao se tratar de bubalinos leiteiros da raça Murrah, criados sob clima tropical, razão pela qual propusemos a realização dessa pesquisa.

Com isso, o objetivo dessa revisão de literatura, é o de enfatizar a bubalinocultura leiteira no Brasil, tratar sobre o status do melhoramento genético de bubalinos leiteiros, destacar as principais proteínas constituintes do leite, e ainda, abordar sobre os polimorfismos das caseínas do leite bubalino, e, quanto ao experimento (capítulo 2), o mesmo objetiva investigar variantes genéticas nos genes CSN1S1 e CSN3, em fêmeas bubalinas de padrão racial Murrah.

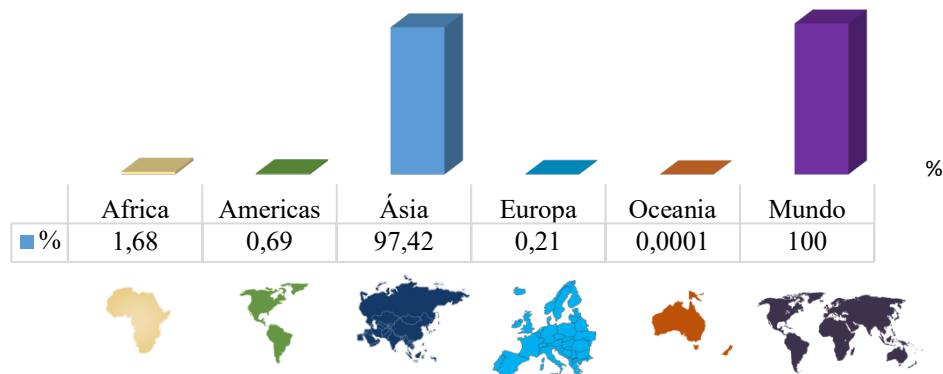
1.1 Revisão de literatura

O estudo de variantes genéticas e a associação com indicadores de produtividade, voltados à bubalinocultura leiteira, podem vir futuramente a auxiliar programas de melhoramento genético, contribuindo com a seleção precoce de animais, com base em características ligadas diretamente ao sucesso econômico da atividade, como rendimento, produção e qualidade de leite, alavancando a produção dos rebanhos bubalinos brasileiros.

O leite bubalino é o segundo mais produzido no mundo (ANUÁRIO LEITE, 2018; IDF, 2012), e ainda, é considerado um dos mais nutritivos (MÉNARD et al., 2010), devido as elevadas concentrações dos principais constituintes, dentre eles, o teor de proteína. Cada proteína presente no leite, é codificada por um gene diferente, os quais podem ser estudados como genes candidatos, por provavelmente influenciarem nas características gerais do leite, podendo estar associados com variações no rendimento e nas propriedades tecnológicas dos derivados do leite.

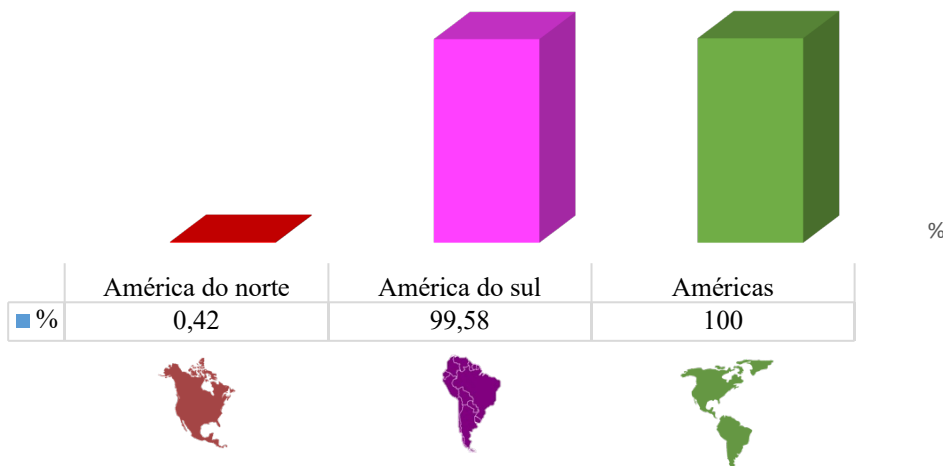
1.1.1 Bubalinocultura leiteira

A população global de búfalos domésticos do mundo em 2017, foi de 200.967.747 de cabeças, sendo que destes, 97,42% foram criados na Ásia, seguido pelos continentes África, Américas, Europa e Oceania, de acordo com o gráfico 1 (FAOSTAT, 2019).

Gráfico 1 - População global de búfalos domésticos, em relação ao Continente (%)

Fonte: Faostat (2019).

De maneira mais detalhada, ainda sobre o ano de 2017, os continentes americanos do Norte e do Sul, possuíam em seus rebanhos, 1.387.987 bubalinos, sendo que destes, 1.381.395 animais pertencem à planteis brasileiros, correspondendo a cerca de 99,52% de todos os búfalos criados no continente americano (Gráfico 2) (FAOSTAT, 2019), dado esse que nos remete a significativa importância da bubalinocultura no Brasil.

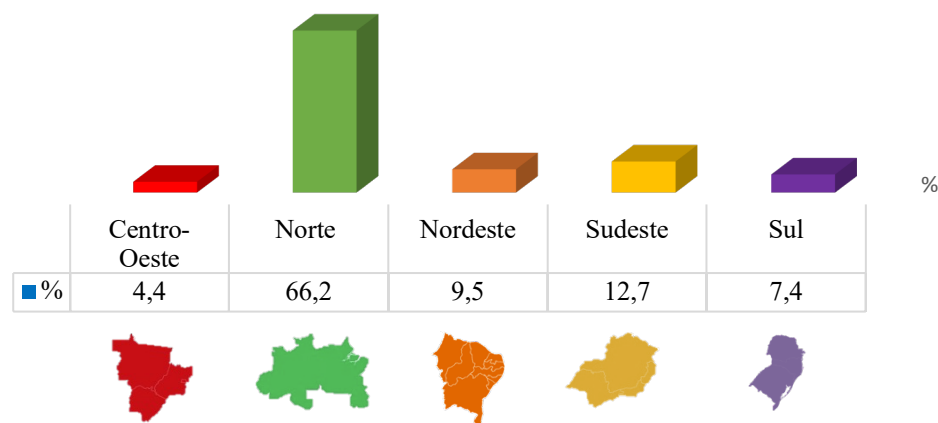
Gráfico 2 – População de búfalos domésticos no continente americano (%)

Fonte: Faostat (2019).

Mais especificamente sobre o Brasil, em 2016, a Região Norte concentrou 66,2% dos Búfalos criados no país, seguida das Regiões Sudeste, Nordeste, Sul e Centro-Oeste (IBGE, 2016). Dados preliminares do censo agropecuário de 2017, revelam como principais estados bubalinocultores, o Pará (33,83%), Amapá (23,61%), Amazonas (7,22%) e São Paulo (7,20%). O maior número de estabelecimentos produtores de búfalos, concentram-se no Pará (4.064;

27,60%), Maranhão (1.928;13,09%), São Paulo (1.263; 8,57%) e Amazonas (1.239; 8,41%) (IBGE, 2019).

Gráfico 3 – Búfalos criados no Brasil, de acordo com a região (%)



Fonte: IBGE, 2016.

A produção mundial de leite em 2016 foi de 111.000.836 toneladas de leite (ANUÁRIO LEITE, 2018), sugerindo que este seja o segundo tipo de leite mais produzido (IDF, 2012), compreendendo a cerca de 13,90% de todo o leite produzido no mundo (798.476.318 ton), uma vez que a categoria também é composta por leites como o de vaca (82,55%), cabra (1,91%), ovelha (1,30%) e camelo (0,34%) (ANUÁRIO LEITE, 2018). No entanto, mesmo que o leite de vaca apresente produção superior, a produção de leite bubalino tem aumentado com o passar do tempo, garantindo seu espaço no cenário da pecuária leiteira (BORGES; MEDEIROS; CORREIA, 2009).

Quanto ao Brasil, o sistema estatístico oficial muitas vezes acaba por mesclar informações de bubalinos com bovinos (BERNARDES, 2007), como o que ocorre com dados referentes a produção de leite, e até mesmo a dimensão real dos rebanhos, causando um menor número de registros confiáveis e variáveis, dependendo da fonte consultada, que normalmente resulta em dados pouco atualizados.

De acordo com dados relatados no Anuário da Pecuária Brasileira (2009) estima-se que foram produzidos 33,515 milhões de litros de leite, em 2.758 estabelecimentos brasileiros em 2009. Mesmo a Região Norte sendo a principal produtora, contribuiu com apenas 32% do leite produzido em 1.285 estabelecimentos, o que provavelmente possa ser justificado pela produção ser principalmente voltada para o mercado de carne (DADARIO; SANTINI PIGATTO; BAPTISTA, 2018), ou baseada em sistemas menos intensificados de produção. Já a Região

Sudeste, produziu cerca de 15.000 mil litros de leite de búfala, em 619 estabelecimentos, contribuindo com 46% da produção nacional (ANUALPEC, 2009).

Dentre as raças, o principal grupo genético para a produção de leite no Brasil é formado por animais da raça Murrah, com produção média de 1.496 a 2.130 kg por lactação (MARCONDES, 2011; TONHATI et al., 2013)

1.1.1.2 Principais raças produzidas

Assim como os bovinos, os búfalos pertencem à família *Bovidae*, e contam com duas espécies, o búfalo asiático ou doméstico (*Bubalus bubalis*) e o búfalo africano (*Syncerus caffer*) (IANNUZZI et al., 2003).

Os búfalos domésticos, conhecidos como búfalos da água, dividem-se em duas principais subespécies, de acordo com características citogenéticas e de habitat (PKHAKADZE, 1939; ULBRICH; FISCHER, 1967). O “búfalo indiano” ou “búfalo do rio” (subespécie *B. bubalis*), com número cromossômico de $2n = 50$ e o “búfalo do pântano” ou “carabao” (subespécie *B. kerebau*) com $2n = 48$ cromossomos (PKHAKADZE, 1939; ULBRICH; FISCHER, 1967), que, caso ocorra o cruzamento entre estes, resultam em animais híbridos, com $2n = 49$ cromossomos (MARQUES et al., 2000).

A bubalinocultura de leite e corte reúnem a nível mundial, aproximadamente 72 raças, (HAMID et al., 2016), sendo que destas, no Brasil, apenas quatro são criadas, por possuírem aptidões que os qualificam para serem usados de forma comercial. São elas Murrah (*Bubalus bubalis* var. *bubalis*), jafarabadi (*Bubalus bubalis* var. *bubalis*), mediterrâneo (*Bubalus bubalis* var. *bubalis*) e carabao (*Bubalus bubalis* var. *kerebau*), oficialmente reconhecidos pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos ABCB (ALBUQUERQUE et al., 2006).

Os primeiros exemplares de búfalos introduzidos no Brasil pertenciam a raça carabao, provenientes da Guiana Francesa, com destino ao estado do Pará, em 1895 (BARUSELLI et al., 1993). Mais tarde, antes e após a 1ª Guerra Mundial, um pequeno número de búfalos das raças Murrah e Jafarabadi foram introduzidos no País, e, posteriormente, em 1920, búfalos da raça Mediterrâneo provenientes da Itália, finalmente chegaram em solos brasileiros, mais especificamente para o estado de São Paulo (VALE, 1999).

A raça Murrah teve sua origem no noroeste da Índia, e logo espalhou-se ao norte do país, e posteriormente difundindo-se ao Paquistão, devido sua principal qualidade ser sua elevada produção leiteira (ANDRADE; GARCIA, 2005). No Brasil, esta raça é padronizada pela ABCB, os quais relatam que esta seja a raça mais numerosa no país, excelente produtora de

leite e com aptidão para a carne. O peso médio dos machos adultos é de 600 a 800 kg, e as fêmeas pesam de 500 a 600 kg, com produção de leite de cerca de 1.650 litros de leite em 305 dias de lactação, observados em medições realizadas na Índia (ABCB, 2019)

A raça Jafarabadi, teve origem no oeste da Índia, no estado de Gujarat (ANDRADE; GARCIA, 2005). Padronizada pela ABCB, considerada de maior porte, devido sua capacidade torácica, altamente apta à produção leiteira (ABCB, 2019). Os machos adultos pesam entre 700 a 1500 kg, já as fêmeas adultas entre 650 a 900 kg, com produção de 2.150 litros de leite em 319 dias de lactação, também observados em medições realizadas na Índia (ABCB, 2019).

Quanto a raça Mediterrâneo, a mesma é composta por búfalos de rios, com descendência de várias raças da Índia, predominantemente encontrada na Europa e Mediterrâneo (ABCB, 2019), uma vez que foram desenvolvidos para a produção de leite e selecionados na Itália (ANDRADE; GARCIA, 2005). De acordo com Andrade & Garcia (2005), esta raça apresenta características comuns as encontradas para as raças Murrah e Jafarabadi, com peso adulto dos machos variando entre 700 e 800 kg, e fêmeas pesando em torno de 600 kg (ABCB, 2019), com produção em torno de 2.000 litros de leite em 270 dias de lactação (ROSA et al., 2007).

Tendo sua origem no sudoeste da Ásia, a raça Carabao, conhecido como “trator do Oriente”, apresenta aptidão voltada para o trabalho agrícola, tração e para a produção de carne (ANDRADE & GARCIA, 2005; ABCB, 2019). Considerada a principal raça do extremo Oriente, também se adaptou as condições brasileiras, onde o peso vivo dos machos varia entre 600 e 700 kg, e das fêmeas, de 450 a 500 kg. Com relação a produção leiteira, a mesma é baixa, e quanto ao seu uso para o trabalho, o tempo médio de trabalho diário é em torno de cinco horas (ABCB, 2019).

Características como adaptabilidade, elevada fertilidade e rusticidade, refletidas em seu potencial de produção de carne e leite, são responsáveis por despertarem o interesse de criadores, motivando a disseminação da espécie pelo país, promovendo a exploração baseada em características ligadas à produtividade (BERNARDES, 2007), principalmente com a intensificação de ferramentas que busquem o melhoramento genético específico para animais bubalinos.

1.1.2 Melhoramento genético de bubalinos leiteiros

Devido a cuidadosa seleção de animais ao longo do tempo, países asiáticos como Índia e Paquistão, visaram amplificar o mérito genético de bubalinos para a produção leiteira, e atualmente, são considerados responsáveis pela criação de um núcleo de animais com genética superior (MOHAMMED, 2018). Na Itália, o uso de biotecnologias reprodutivas, atrelado ao alto

nível de manejo, valor genético e testes de progênie dos animais (MOHAMMED, 2018), propiciaram a aplicabilidade de um rigoroso sistema de registro para seleção de búfalos leiteiros (BORGHESE; MAZZI, 2005), que proporcionaram a produção de animais com médias de 270 dias de lactação, superiores a 2.700 kg de leite (SALZANO et al., 2017).

No Brasil, até a década de 80, as avaliações para seleções de bubalinos eram feitas com base exclusivamente na produção de leite (RAMOS, 1997), o que, posteriormente, avançou para cálculos de capacidade mais provável de produção (CMPP) das búfalas, evoluindo para o uso de modelos mistos com estimativas de BLUP (melhor predição linear não viesada), até chegar na utilização das variáveis touro e animal como modelos (MARCONDES, 2011).

Com isso, sabe-se que o uso de ferramentas auxiliares aos processos de seleção e acasalamento, concomitante ao controle zootécnico do rebanho, são indispensáveis para que a bubalinocultura obtenha na prática, ganhos reais em qualidade e produtividade (MARCONDES, 2011), tornando-se fundamental, a avaliação precisa dos recursos genéticos animais, para a correta utilização em programas de melhoramento genético (POLIDO et al., 2012), tornando real, inclusive o uso de ferramentas moleculares e a associação entre genes e características produtivas (ANDRIGHETTO et al., 2008; MOITA et al., 2010).

Recentemente, a seleção baseada no genótipo (POLIDO et al., 2012), tem contribuído com a solução de algumas das limitações dos métodos que se baseiam exclusivamente no fenótipo (SOUZA, 2012), colaborando ativamente para o progresso do melhoramento animal (MONTALDO; MEZA-HERRERA, 1998). Diante disso, os marcadores moleculares surgiram como uma excelente ferramenta capaz de detectar variações genéticas no DNA (POLIDO et al., 2012), visto que a maior parte das características de interesse econômico apresentam padrões de manifestação quantitativo, controladas por vários genes, cujos efeitos contribuem para o fenótipo final (MONIRUZZAMAN; KHATUN; MINTOO, 2014; POLIDO et al., 2012), como é o caso da produção e composição de leite, controlada por um grupo de genes (poligênica), em que cada gene tem um pequeno efeito sobre a característica (EL DEBAKY et al., 2019).

Os genes candidatos, ou seja, genes que provavelmente estão envolvidos com o desenvolvimento ou fisiologia de determinada característica (BRYNE; MCMULLEN, 1996), podem ser identificados por meio de estudos de correlações entre características fenotípicas e genótípicas (ZHU; ZHAO, 2007); e, segundo El Debaky et al., (2019), uma vez identificados, pode ser realizada por exemplo, a investigação de polimorfismos de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism, SNP), utilizados como marcadores genéticos, devido sua alta frequência e distribuição no genoma.

Atualmente, encontram-se disponíveis na plataforma NCBI dois genomas de búfalos domésticos (TANTIA et al., 2011; ZIMIN et al., 2013), porém, a anotação gênica do genoma ainda não foi realizada (UMD_CASPUR_WB_2.0; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000471725.1/), o que significa, que pesquisadores tenham que se referir a uma espécie de parente próximo, como os bovinos, ou então, que sejam realizados sequenciamentos gene por gene, permitindo a identificação de marcadores genéticos que controlem características economicamente importantes, como as relacionadas à produção e a qualidade do leite (EL DEBAKY et al., 2019), especialmente marcadores relacionados a variações nas proteínas.

1.1.3 Proteínas do leite

O leite possui um sistema de proteínas constituído por duas famílias principais, caseínas (insolúveis) e proteínas do soro do leite (solúveis) (MADUREIRA et al., 2007). Semelhante ao que ocorre no leite bovino, no leite bubalino, as caseínas representam cerca de 80% das proteínas encontradas, e 20%, são proteínas do soro (MÉNARD et al., 2010), mais precisamente, 83% e 17% da proteína verdadeira do leite bubalino são caseínas e proteínas do soro (RAFIQ et al., 2016).

1.1.3.1 Proteínas do soro do leite

As proteínas do soro apresentam a capacidade de se manterem solúveis no soro do leite após a precipitação da caseína a pH 4,6 e temperatura de 20°C (FARRELL et al., 2004a).

As proteínas do soro do leite, são representadas principalmente pela alfa-lactalbumina (α -LA) e a beta-lactoglobulina (β -LG) uma vez que estas compreendem cerca de 70 a 80% do total de proteínas do soro (DAVOODI et al., 2016), os restantes, estão distribuídos em imunoglobulinas (IG), albumina sérica bovina (BSA), lactoferrina (BLF) e lactoperoxidase (LP) (MADUREIRA et al., 2007), consideradas proteínas menores, identificadas no leite bubalino através de estudos envolvendo proteômica (D'AMBROSIO et al., 2008).

A proteína α -LA, desempenha papel importante na síntese de lactose e também na secreção do leite, uma vez que na glândula mamária lactante, a α -LA juntamente com a galactosiltransferase (GT) formam a lactose sistema sintase, que catalisa a etapa final da biossíntese de lactose, devido aumentar a especificidade e afinidade da enzima para glicose (KASHWA, 2016). A

molécula de α -LA possui uma única ligação forte a Ca^{2+} local e liga outros cátions fisiologicamente importantes como Na^+ , Mg^{2+} , K^+ e Mn^{2+} , podendo estes cátions competir pelo sítio de ligação de Ca^{2+} (PERMYAKOV; BERLINER, 2000).

A β -LG, pertence à família das proteínas lipocalinas, que possui uma ampla diversidade de funções biológicas principalmente funções de ligação, entretanto, mesmo possuindo quantidades significativas sendo secretadas no leite, aparenta não ter função fisiológica bem definida, dando espaço a muitas especulações sobre a sua aplicabilidade (KONTOPIDIS; HOLT; SAWYER, 2004), porém, sabe-se que esta, devido à ligação do retinol (vitamina A), é essencial para o crescimento e bem-estar dos mamíferos, por carrear tal vitamina no leite (DE WIT, 1998; SAWYER, 2003).

Quanto as imunoglobulinas e lactoferrinas, atuam conferindo imunidade e defesa aos bezerros recém nascidos contra infecções (NG-KWAI-HANG, 2011), e, particularmente no leite bubalino, até 88°C de aquecimento, não ocorre a desnaturação total das imunoglobulinas, devido a propriedade protetora apresentada pelo elevado teor protéico do leite (EL-LOLY; AWAD; MANSOUR, 2007).

Sobre a albumina sérica, esta atua como uma proteína de transporte de ácidos graxos livres, outros lipídios e moléculas hidrofóbicas, incluindo peptídeos neurodegenerativos e íons metálicos essenciais, como o zinco, permitindo sua distribuição sistêmica (COVERDALE et al., 2019). A lactoperoxidase e outros peptídios secundários fornecem propriedades antimicrobianas importantes para os animais neonatos (GODHIA; PATEL, 2013; URUAKPA; ISMOND; AKOBUNDU, 2002).

De maneira geral, as proteínas do soro de leite são conhecidas por seu alto valor biológico e propriedades funcionais versáteis, características que permitem seu amplo uso em alimentos e produtos farmacêuticos (JARA; PILOSO, 2011; TAVARES; MALCATA, 2013).

1.1.3.2 Caseínas

Caseínas do leite correspondem a fosfoproteínas que precipitam do leite desnatado cru, quando este sofre acidificação, sob pH 4,6 e temperatura de 20°C (FARRELL et al., 2004a).

As caseínas compreendem o principal componente proteico do leite de búfalo e são codificadas por quatro genes intimamente ligados, α -caseína s1, α -caseína s2, β -caseína e κ -caseína, organizados em um cluster de aproximadamente 250 kb no cromossomo 7 (IANNUZZI et al., 2003).

Além de serem as proteínas mais abundantes, as caseínas interagem com partículas de fosfato de cálcio, resultando em uma estrutura denominada micela (MARTIN et al., 2002) composta por caseínas sensíveis ao cálcio (α -caseína s1, α -caseína s2 e β -caseína) na porção hidrofóbica central e as caseínas insensíveis ao cálcio (κ -caseína) na camada hidrofílica periférica, conferindo estabilidade físico-química à micela (RASMUSSEN et al., 1999).

A micela é considerada uma estrutura composta por agregados polidispersos, aproximadamente esféricos, com diâmetros variando entre 150 e 300 nm (MÜLLER-BUSCHBAUM et al., 2007), capazes de promover que grandes quantidades de cálcio atravessem o epitélio mamário sem que ocorra calcificação (SMYTH; CLEGG; HOLT, 2004).

A κ - caseína, localizada externamente à micela, desempenham o papel de estabilizar e determinar o tamanho das micelas (DALGLEISH, 2011). No caso das α - caseínas (s1) e (s2) e β - caseínas por serem sensíveis ao cálcio, precipitam caso entrem em contato direto com as moléculas de (Ca^{2+}) (MÜLLER-BUSCHBAUM et al., 2007), devido serem mais fosforiladas.

A α - caseína (s1), possui o papel de captar e transportar partículas de fosfato e cálcio no leite, considerada como sendo uma proteína fraca e flexível (OLIVEIRA; TIMM, 2007), facilitando a entrada e a ação de proteases, além de precipitar com níveis de cálcio (Ca^{2+}) muito baixos (LORIENT; CHEFTEL; CUQ, 1989). As α - caseínas (s2), possui a mesma função da caseína alfa-s1, mas, possuem maior sensibilidade ao cálcio do que a anterior (WALSTRA; JENNESS, 1984), o que pode ser explicado devido serem ainda mais fosforiladas, estimulando a ligação de fosfatos de serina com o cálcio, promovendo a precipitação (WALSTRA, 1999).

A β - caseína, possui a função de alterar propriedades específicas da superfície da micela, e, quando em contato com íons de cálcio, são menos susceptíveis à precipitação, comparado as α – caseínas (WALSTRA, 1999), e ainda, é facilmente hidrolisada pela protease plasmina, produzindo fragmentos peptídicos chamados caseínas γ , que migram para o soro (SGARBIERI, 2005).

Neste contexto, a principal função da micela, é a de fluidizar moléculas de caseína e solubilizar moléculas de cálcio e fosfato (FARRELL; THOMPSON, 1988), na qual cerca de 95% das caseínas presentes no leite encontram-se na forma dessas partículas, sintetizadas nas células epiteliais das glândulas mamárias (RIJNKELS, 2002), e responsáveis pela propriedade de estabilidade térmica do leite (FOX; BRODKORB, 2008).

As especificidades das caseínas a tornam um ingrediente alimentar amplamente utilizado em laticínios, panificação, indústrias de carnes, bebidas e nutracêuticos por suas funções como emulsificante, fabricação de queijo, além de seu valor nutricional (FOX; KELLY, 2004;

SÉVERIN; WENSHUI, 2005), as quais, segundo investigações recentes, podem variar dependendo de variantes genéticas encontradas em genes candidatos (polimorfismos).

1.1.4 Polimorfismos de caseínas do leite bubalino

Polimorfismos nos genes da caseína do leite tem sido associado normalmente a diferenças na qualidade, composição, processamento, e inclusive, no rendimento do leite (MCLEAN, 1987; TSIARAS et al., 2005). Avanços recentes em sequenciamento de DNA, softwares e a aplicação de conhecimentos de bioinformática, facilitaram a identificação de SNPs (marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único) a partir de segmentos amplificados de DNA genômico (ZHANG et al., 2018), que podem auxiliar através da identificação e seleção de alelos favoráveis à diversos campos largamente explorados na produção animal.

No entanto, ainda são incipientes na literatura, trabalhos que investiguem polimorfismos nos genes das caseínas de bubalinos. No búfalo, apenas 2 alelos no gene CSN1S1 foram identificados até o momento (A e B) (CHIANESE et al., 2009), dois para o gene CSN1S2 (A e B) (COSENZA et al., 2009), dois para o gene CSN3 (A e B) (GOUDA; GALAL; ABDELAZIZ, 2013), e apenas um alelo para o gene CSN2 (A2) (MISHRA et al., 2009).

Quanto ao gene da α S1- CN (CSN1S1), Bâlceanu et al. (2008), identificaram dois alelos (A e B), em búfalos da raça Romena, onde os indivíduos que possuíam o alelo A no nucleotídeo de posição 578, resultavam no aminoácido Leucina, e os que possuíam o alelo B, em uma Serina, ambos no códon de número 193.

O mesmo polimorfismo foi encontrado em búfalos da raça Mediterrânea, resultando nos mesmos aminoácidos, só que desta vez, localizados no códon de número 178 (CHIANESE et al., 2009), e, que mais tarde, foi detalhado, que tal variação ocorre por uma transversoão citosina/timina (C (alelo A) / T (alelo B)), no éxon 17, no nucleotídeo de número 578 da sequência codificante completa de *Bubalus bubalis* (EMBL no. AJ005430.1.) (BONFATTI et al., 2012a).

O alelo B no CSN1S1 foi associado ao aumento no tempo de coagulação do coalho e no tempo de endurecimento da coalhada, além de apresentar coalhada considerada mais fraca (baixo teor de cálcio e caseína) em comparação com o alelo A (BONFATTI et al., 2012b).

Cosenza et al.(2015), relataram a presença de três variantes no gene CSN1S1, uma transição citosina/timina (C/T), localizada na posição 89 do 17º éxon, responsável pela alteração de aminoácidos serina (alelo B) / leucina (alelo A), no códon 178, e outras duas mutações silenciosas, nos nucleotídeos de número 882 guanina/adenina (G/A) e 977 adenina/guanina (A/G) do éxon 19.

A análise da influência de polimorfismos no gene α S1-caseína, sobre o rendimento de coalhada de búfalo mediterrâneo, resultou na informação de que o alelo A em homozigose (AA), apresentava quantidades distintas dos principais constituintes do leite, como matéria seca (MS) de 17,80%, proteína bruta (PB) de 4,59%, gordura de 7,81%, lactose de 4,88%, e cinzas de 0,81%, em comparação aos indivíduos que apresentavam o alelo B em homozigose (BB), com MS de 18,31%, PB 5,00%, gordura 8,39%, lactose 4,78% e cinzas 0,83%, enquanto que, os indivíduos heterozigotos (AB), apresentaram valores de MS 17,72%, PB 4,67%, gordura 8,01%, lactose 4,84% e cinzas 0,82% (ZICARELLI et al., 2020). Neste contexto, foi possível observar que indivíduos homozigotos (BB), podem ser considerados capazes de produzir leite com uma melhor eficiência na produção de queijo, devido aos elevados teores dos sólidos.

Outros SNPs foram encontrados, denominados como alelos B e B^{bt}, caracterizados por uma transição G/A no éxon 5 (GTG/ ATG #136), levando a uma substituição de uma Valina/Metionina (aa 31) (BALTEANU et al., 2013); e uma transição A/G (#175), levando a uma substituição de Isoleucina/Valina (aa 44) na cadeia peptídica (BALTEANU; CARSAI; VLAIC, 2013), respectivamente.

Sobre o gene da α S2- CN (CSN1S2), Cosenza et al. (2009), investigaram a transição citosina/timina (C/T) no nucleotídeo de número 459, a qual se apresenta de forma silenciosa, sem resultar em alteração de aminoácidos, e as transições A/T (#484), que resultam na alteração de uma isoleucina, por uma fenilalanina, na posição 162 (aa), e A/G (#568), resultam na alteração de um triptofano/alanina (aa 200).

Quanto ao gene da κ - CN (CSN3), dois SNPs foram encontrados por El Nahas et al. (2013), uma transição C/T (#315), a qual reflete no códon de número 105 (ACC (alelo A)/ATC (alelo B)), que causa uma alteração de aminoácido, de uma treonina, para uma isoleucina, e outra, uma mutação silenciosa, uma transição C/T (#319), sem variação de aminoácidos no códon 136, o qual reflete em uma treonina.

Diante do exposto, o estudo de polimorfismos em genes candidatos, resultam em informações quanto à variações na composição aminoacídica da proteína final, cabendo a investigação de associações entre tais polimorfismos genéticos e características de produção/qualidade do leite de búfala, que podem vir a auxiliar programas de melhoramento genético, com base em características ligadas diretamente ao sucesso econômico da atividade leiteira.

REFERÊNCIAS

ABCB, A. B. DE C. DE B. **As raças**. Disponível em: <<https://www.bufalo.com.br/home/o-bufalo/>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

ALBUQUERQUE, M. DO S. M. et al. Variabilidade genética em búfalos estimada por marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 623–628, abr. 2006.

ANDRADE, V. J.; GARCIA, S. K. Padrões raciais e registro de bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 1, p. 39–45, 2005.

ANDRIGHETTO, C. et al. Características físico-químicas e sensoriais da carne de bubalinos Murrah abatidos em diferentes períodos de confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 12, p. 2179–2184, dez. 2008.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Agra FNP Pesquisas, 2009.

ANUÁRIO LEITE. **Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro**. [s.l.] Embrapa gado de leite, 2018.

BÂLTEANU, V. A. et al. Multiple mutations events are characterizing alpha s1 casein brv and beta casein crv alleles discovered in romanian buffalo breed. **Bulletin USAMV Animal Science and Biotechnologies**, v. 65, n. (1-2), p. 478, 2008.

BALTEANU, V. A.; CARSAI, T. C.; VLAIC, A. Identification of an intronic regulatory mutation at the buffalo α S1-casein gene that triggers the skipping of exon 6. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 7, p. 4311–4316, 2013.

BALUSAMI, C. Milk Constituents of Non Descript and Graded Murrah Buffaloes in TamilNadu, India. **Indian Journal Of Natural Sciences**, v. 5, n. 28, p. 2475–2479, 2015.

BARUSELLI, P. S. et al. **Diagnóstico da bubalinocultura do Vale do Ribeira. Documento Técnico CATI**. Campinas: [s.n.]. Disponível em: <http://dsti37.fmvz.unesp.br/bufalos/HPBufalos_files/Artigos_Publicados/P-28.pdf>.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293–298, 2007.

BONFATTI, V. et al. Effect of CSN1S1-CSN3 (α S1- κ -casein) composite genotype on milk production traits and milk coagulation properties in Mediterranean water buffalo. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 6, p. 3435–3443, 1 jun. 2012a.

BONFATTI, V. et al. Effect of parity, days in milk, and milk yield on detailed milk protein composition in Mediterranean water buffalo. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4223–4229, 1 ago. 2012b.

BORGES, K. C.; MEDEIROS, A. C. L.; CORREIA, R. T. P. Iogurte de leite de búfala sabor cajá: caracterização físico-química e aceitação sensorial entre indivíduos de 11 a 16 anos.

Alimentos e Nutrição, v. 20, n. 2, p. 295–300, 2009.

BORGHESE, A.; MAZZI, M. **Buffalo population and strategies in the world**. Rome, Italy: FAO of the United Nations, 2005.

BRYNE, P.; MCMULLEN, M. Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and the candidate gene approach. **Probe**, v. 7, p. p.24-27, 1996.

CHIANESE, L. et al. Occurrence of genetic polymorphism at the α -casein locus in Mediterranean water buffalo milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 4, p. 181–189, 2009.

COSENZA, G. et al. A point mutation in the splice donor site of intron 7 in the α 2-casein encoding gene of the Mediterranean River buffalo results in an allele-specific exon skipping. **Animal Genetics**, v. 40, n. 5, p. 791, 1 out. 2009.

COSENZA, G. et al. Mediterranean river buffalo CSN1S1 gene: Search for polymorphisms and association studies. **Animal Production Science**, v. 55, n. 5, p. 654–660, 2015.

COVERDALE, J. P. C. et al. Crosstalk between zinc and free fatty acids in plasma. **Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids**, v. 1864, n. 4, p. 532–542, abr. 2019.
CRUZ-CRUZ, L. DE LA et al. The behaviour and productivity of water buffalo in different breeding systems: A review. **Veterinární medicína**, v. 59, p. 181–193, 2 jun. 2014.

D'AMBROSIO, C. et al. A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and defense against pathogens. **Proteomics**, v. 8, n. 17, p. 3657–3666, 1 set. 2008.

DADARIO, N.; SANTINI PIGATTO, G. A.; BAPTISTA, R. D. O processo de inovação na produção de leite de bubalinos: um estudo de caso no município de Queiroz/SP. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 12, p. 77–90, 2018.

DAGNACHEW, B. S. et al. Casein SNP in Norwegian goats: additive and dominance effects on milk composition and quality. **Genetics Selection Evolution**, v. 43, n. 1, p. 31, 2011.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2265–2272, 2011.

DAVOODI, S. H. et al. Health-Related Aspects of Milk Proteins. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 15, n. 3, p. 573–591, 2016.

DE WIT, J. N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 3, p. 597–608, 1 mar. 1998.

DUBEY, P. C. et al. Factors affecting the composition of milk of buffaloes. **Indian Journal of Animal Sciences**, , v. 67, p. 802–804, 1997.

EL-LOLY, M. M.; AWAD, A. A.; MANSOUR, A. I. A. Thermal Kinetics Denaturation of Buffalo Milk Immunoglobulins. **International Journal of Dairy Science**, v. 2, p. 292–301, 2007.

EL DEBAKY, H. A. et al. Review: Potential of water buffalo in world agriculture: Challenges and opportunities. **Applied Animal Science**, v. 35, n. 2, p. 255–268, 1 abr. 2019.

EL NAHAS, S. M.; BIBARS, M. A.; TAHA, D. A. Genetic characterization of Egyptian buffalo CSN3 gene. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 123–127, 1 dez. 2013.

FANGMEIER, M. et al. Effects of cow, goat, and buffalo milk on the characteristics of cream cheese with whey retention. **Food Science and Technology**, v. 39, n. suppl 1, p. 122–128, jun. 2019.

FAOSTAT, F. AND A. O. OF THE U. N. S. D. **Compare data**. 2019.

FARRELL, H. M. et al. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1641–1674, 1 jun. 2004.

FARRELL, H. M. J.; THOMPSON, M. P. Caseins as calcium binding proteins. In: THOMPSON, M. P. (Ed.). . **Calcium binding proteins**. 2. ed. Boca Raton, FL: [s.n.]. p. 117–137.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 677–684, 1 jul. 2008.

FOX, P. F.; KELLY, A. L. The caseins. In: **Proteins in Food Processing**. . Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, 2004. p. 29–71.

GODHIA, M. .; PATEL, N. Colostrum - its Composition, Benefits as a Nutraceutical - A Review. **Current Research in Nutrition and Food Science**, v. 1, n. 1, p. 37–47, 2013.

GOUDA, E. M.; GALAL, M. K.; ABDELAZIZ, S. A. Genetic Variants and Allele Frequencies of Kappa Casein in Egyptian Cattle and Buffalo Using PCR-RFLP. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 2, p. 197–203, 2013.

HAMID, M. A. et al. Status of Buffalo Production in Bangladesh Compared to SAARC Countries. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 10, n. 6, p. 313–329, 2016.

HUMA, N. et al. Characterization of Milk Proteins from Different Animal Species through Gel Electrophoresis. **Pakistan J. Zool.**, v. 50, p. 1983–1986, 2018.

IANNUZZI, L. et al. The river buffalo (*Bubalus bubalis*, $2n = 50$) cytogenetic map: Assignment of 64 loci by fluorescence in situ hybridization and R-banding. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 102, n. 1–4, p. 65–75, 2003.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: [s.n.]. 2019.

IDF, I. D. F. **The World Dairy Situation 2012. Bulletin of the IDF nº.458/2012, 2012. 235p.** Brussels: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.fil-idf.org>>. Acesso em 05 jun. 2019.

JARA, F.; PILOSO, A. M. R. Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-phase systems. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 374–380, 1 maio 2011.

KAPADIYA, D. B. et al. Comparison of Surti goat milk with cow and buffalo milk for gross composition, nitrogen distribution, and selected minerals content. **Veterinary world**, v. 9, n. 7, p. 710–716, jul. 2016.

KASHWA, M. **Composition of water buffalo milk during the first period of lactation. Relation to mozzarella cheese properties.** [s.l.] Swedish University of Agricultural Sciences, 2016.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited review: B- lactoglobulin: binding properties, structure, and function. **J. Dairy Sci.**, v. 87, p. 785–796, 2004.

LORIENT, D.; CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L. **Proteínas alimentarias: Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas.** Zaragoza, Espanha: Editorial Acribia S.A, 1989.

MADUREIRA, A. R. et al. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. **Food Research International**, v. 40, n. 10, p. 1197–1211, 2007.

MANZOOR SIDRA AND NADEEM, A. AND J. M. Polymorphism association and expression analysis of alpha-lactalbumin (LALBA) gene during lactation in Nili Ravi buffalo. **Tropical Animal Health and Production**, jul. 2019.

MARCONDES, C. R. Melhoramento de búfalos no Brasil: avanços, entraves e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 307–315, 2011.

MARQUES, J. R. F. et al. Origem, Domesticação e Classificação Zoológica. In: JOSÉ RIBAMARFELIPE MARQUES (Ed.). **BÚFALOS: 500 Perguntas, 500 Respostas (O produtor pergunta, a Embrapa responde)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental (Belém,

PA). – Brasília : EmbrapaComunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 16–22.

MARTIN, P. et al. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. **Reprod Nutr Dev**, v. 42, n. 5, p. 433–459, 2002.

MCLEAN, D. M. Influence of milk protein variants on milk composition, yield and cheese making properties. **Animal Genetics**, v. 18, p. 100–102, 1987.

MÉNARD, O. et al. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 544–551, 15 maio 2010.

MISHRA, B. et al. Status of milk protein, β -casein variants among Indian milch animals. **The Indian journal of animal sciences**, v. 79, 10 jul. 2009.

MISRA, S. S. et al. Association of breed and polymorphism of α -s1 and α -s2 casein genes with milk quality and daily milk and constituent yield traits of buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Buffalo Bulletin**, v. 27, p. 294–301, 2008.

MOHAMMED, K. M. E. Application of advanced reproductive biotechnologies for buffalo improvement with focusing on Egyptian buffaloes. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 7, p. 193–205, 1 set. 2018.

MOITA, A. K. F. et al. Heterogeneidade de variâncias na avaliação genética de búfalas no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1443–1449, jul. 2010.

MONIRUZZAMAN, M. R.; KHATUN, R.; MINTOO, A. A. Application of marker assisted selection for livestock improvement in Bangladesh. **Bangladesh Veterinarian**, v. 31, 1 abr. 2014.

MONTALDO, H. H.; MEZA-HERRERA, C. A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock **Electronic Journal of Biotechnology**, 1998.

MÜLLER-BUSCHBAUM, P. et al. Effect of Calcium Concentration on the Structure of Casein Micelles in Thin Films. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 3, p. 960–968, 1 ago. 2007.

NG-KWAI-HANG, K. F. Milk Proteins | Heterogeneity, Fractionation, and Isolation. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p. 751–764, 1 jan. 2011.

OLIVEIRA, A. et al. A biotecnologia e os avanços da sociedade. **Biodiversidade**, v. 16, n. 1, p. 135–154, 2017.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Casein instability in milk without acquired acidity. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. 561–562, p. 17–22, 2007.

PERMYAKOV, E. A.; BERLINER, L. J. α -Lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters**, v. 473, n. 3, p. 269–274, 19 maio 2000.

PKHAKADZE, G. M. Chromosome complement in buffalo (*Bubalus bubalis* L.). **Comp Rend Acad Sci USSR**, v. 24, p. 794–795, 1939.

POLIDO, P. B. et al. Marcadores moleculares aplicados no melhoramento genético de bovinos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 15, n. 2, p. 161–169, 2012.

RAFIQ, S. et al. Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 29, n. 7, p. 1022–1028, jul. 2016.

RAMOS, A. A. Melhoramento genético, seleção e cruzamento. In: **O Búfalo no Brasil**. [s.l.] Cruz das Almas, 1997. p. 236.

RASHEED, S. et al. Comparative Study of Cottage Cheese Prepared from Various Sources of Milk. **Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences**, v. 53, p. 269–282, 1 dez. 2016.

RASMUSSEN, L. . et al. Disulphide-linked caseins and casein micelles. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3–6, p. 215–218, 1 mar. 1999.

RIJNKELS, M. Multispecies Comparison of the Casein Gene Loci and Evolution of Casein Gene Family. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 3, p. 327–345, jul. 2002.

ROSA, B. R. T. et al. Introdução de búfalos no Brasil e sua aptidão leiteira. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 8, p. 1–6, 2007.

SALZANO, A. et al. Influences of different space allowance on reproductive performances in buffalo. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 2, p. 429–436, 13 ago. 2017.

SARKAR, U. et al. Factors affecting test day milk yield and milk composition in dairy animals. **Journal of dairying, foods & home sciences**, v. 25, p. 129–132, 1 fev. 2006.

SAWYER, L. β -Lactoglobulin. In: FOX P. F. AND MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). . **Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A / Part B**. Boston, MA: Springer US, 2003. p. 319–386.

SÉVERIN, S.; WENSHUI, X. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 7–8, p. 645–656, 1 out. 2005.

SGARBIERI, V. C. Review: Structural and Physicochemical Properties of Milk Proteins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, p. 43–56, 2005.

SINGH, U. et al. Association of prolactin and beta-lactoglobulin genes with milk production traits and somatic cell count among Indian Frieswal (HF × Sahiwal) cows. **Biomarkers and Genomic Medicine**, v. 7, n. 1, p. 38–42, 1 mar. 2015.

SMYTH, E.; CLEGG, R.; HOLT, C. A biological perspective on the structure and function of caseins and casein micelles. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 121–126, 1 maio 2004.

SOUZA, M. M. DE. **Avaliação dos efeitos de polimorfismos e da origem parental do alelo na expressão de genes candidatos à característica maciez da carne em bovinos da raça Nelore**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2012.

TANTIA, M. et al. Whole-genome sequence assembly of the water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 81, 1 maio 2011.

TAVARES, T. G.; MALCATA, F. X. Whey Proteins as Source of Bioactive Peptides Against Hypertension. In: HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CHIA-CHIEN, H. (Eds.). . **Bioactive food peptides in health and disease**. p. 75–114. 2013

TONHATI, H. et al. Multiple-trait genomic evaluation for milk yield and milk quality traits using genomic and phenotypic data in buffalo in Brazil. **Buffalo Bulletin**, v. 32, n. 2, p. 746–749, 2013.

TSIARAS, A. M. et al. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 1, p. 327–334, 2005.

ULBRICH, F.; FISCHER, U. J. The chromosomes of the Asiatic buffalo (*Bubalus bubalis*) and the African buffalo (*Syncerus caffer*). **Z Tierzucht Zuchtgsbiol**, v. 83, p. 219–223, 1967.

URUAKPA, F. .; ISMOND, M. A. .; AKOBUNDU, E. N. . Colostrum and its benefits: a review. **Nutrition Research**, v. 22, n. 6, p. 755–767, 1 jun. 2002.

VALE, W. G. **Perspectivas da bubalinocultura no Brasil e na América Latina**. (UNESP/FCAV, Ed.)SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA,. **Anais...Jaboticabal: Anais**, 1999.

VARRICCHIO, M. L. et al. Fatty acid composition of Mediterranean buffalo milk fat. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. sup1, p. 509–511, 15 jan. 2007.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3–6, p. 189–192, 1 mar. 1999.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza, Espanha: Editorial Acribia S.A, 1984.

YADAV, S. P. et al. Variation in milk constituents during different parity and seasons in Murrah buffaloes. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 83, n. 7, p. 747–751, 2013.

ZHANG, T. et al. Selection and effectiveness of informative SNPs for paternity in Chinese Simmental cattle based on a high-density SNP array. **Gene**, v. 673, p. 211–216, 2018.

ZICARELLI, L. et al. Influence of α S1-casein and κ -casein polymorphism on the curd yield of Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis* L.) milk. **International Dairy Journal**, v. 100, p. 1-8, 2020.

ZHU, M.; ZHAO, S. Candidate gene identification approach: progress and challenges. **International journal of biological sciences**, v. 3, n. 7, p. 420–427, 25 out. 2007.

ZIMIN, A. M. G. et al. **The Buffalo Reference Genome Assembly**. International Plant and Animal Genome Conference. **Anais...**San Diego, CA.: 2013.

2 ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES CSN1S1 E CSN3 EM FÊMEAS BUBALINAS DE PADRÃO RACIAL MURRAH

2.1 Introdução

No Brasil, fêmeas bubalinas leiteiras, representadas principalmente por animais da raça Murrah, produzem em média 1.496 a 2.130 kg de leite por lactação (MARCONDES, 2011; TONHATI et al., 2013), e são responsáveis pela produção anual aproximada de 100 milhões de litros de leite processados em 150 laticínios registrados (ANUÁRIO LEITE, 2018).

No entanto, a qualidade do leite também é um fator importante e é definida por parâmetros de composição química, características físico-químicas e higiene (MAPA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2011). Além disso, a presença de sais minerais, vitaminas, gordura, lactose e proteínas, determinam a qualidade desta composição, a qual está diretamente ligada a genética do animal (MÉNARD et al., 2010; RAFIQ et al., 2016).

Quanto as características do leite, estas são controladas por vários genes, em especial os quatro genes da caseína, CSN1S1; CSN1S2; CSN2 e CSN3, que são responsáveis por codificar as quatro frações da referida proteína, são elas, a α -caseína que inclui α (S1) e α (S2), β e κ caseína (EL NAHAS et al., 2013a). Contudo, os genes CSN1S1 e CSN3, codificam proteínas que precipitam quando em contato com o cálcio (α -caseínas (s1)) (MÜLLER-BUSCHBAUM et al., 2007), e que estabilizam e determinam o tamanho das micelas (κ -caseína) (DALGLEISH, 2011), responsáveis por influenciar diretamente na qualidade, composição, processamento e rendimento do leite (MCLEAN, 1987; TSIARAS et al., 2005).

O comprimento total do gene CSN1S1 é de cerca de 17 kb, localizado no cromossomo 7, formado por 19 éxons (NCBI, 2020a), codificando 214 aminoácidos, onde os primeiros 15 resíduos de aminoácidos correspondem ao peptídeo-sinal, enquanto o peptídeo maduro consiste em 199 resíduos (UNIPROT, 2020a). A maioria dos estudos que investigaram o polimorfismo no gene CSN1S1, envolvem os éxons 17 e 19 (BONFATTI et al., 2012a; COSENZA et al., 2015b; EL NAHAS et al., 2013a), no entanto, até o momento não há estudos que tenham investigado, e consequentemente encontrado polimorfismos na região promotora deste gene, mesmo sabendo que esta região é fundamental para a transcrição do gene (ALVES; SOUZA, 2013).

O gene CSN3, possui comprimento total de 13 kb, localizado no cromossomo 7, e 5 éxons (NCBI, 2020b), codificando 190 aminoácidos, onde os primeiros 21 resíduos de aminoácidos constituem o peptídeo-sinal, e os restantes 169 consistem no peptídeo maduro (UNIPROT,

2020b), onde destes, 160 resíduos são encontrados no éxon IV (NCBI, 2020b). A maioria dos estudos que investigaram o polimorfismo no CSN3, utilizam-se de fragmentos que abrangem somente o éxon IV (ABDEL DAYEM et al., 2009; MASINA et al., 2007; RIAZ et al., 2008).

O estudo de variantes genéticas nesses genes, buscam investigar alelos, inserções ou deleções, que possam refletir diretamente em características produtivas, indicando diferenças na qualidade, composição, e rendimento do leite (MCLEAN, 1987; TSIARAS et al., 2005).

Atualmente, recentes avanços em sequenciamento de DNA, softwares e a aplicação de conhecimentos de bioinformática, vem facilitando a identificação de polimorfismos a partir de segmentos amplificados de DNA genômico (ZHANG et al., 2018), os quais podem auxiliar através da identificação e seleção de alelos favoráveis à diversos campos largamente explorados na produção animal, em especial à bubalinocultura especializada em leite.

Diante do exposto, objetivou-se com este estudo, investigar a ocorrência de polimorfismos nos genes CSN1S1 e CSN3, em fêmeas bubalinas de padrão racial Murrah.

2.2 Material e métodos

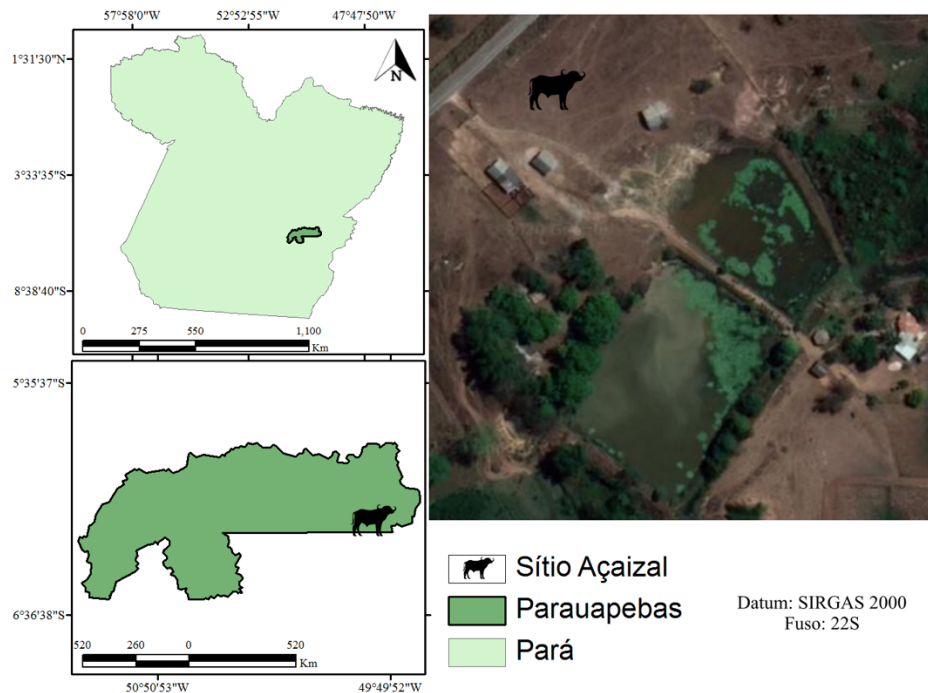
Todos os procedimentos experimentais foram autorizados pela comissão de ética no uso de animais em experimentação – CEUA, da Universidade Federal Rural da Amazônia (16/2015, processo 23084.04411/2015-81).

2.2.1 Animais e área de estudo

O experimento foi realizado com 41 fêmeas bubalinas de padrão racial Murrah, pertencentes ao rebanho leiteiro do Sítio Açaizal, situado no município de Parauapebas, no Sudeste do estado do Pará (UTM: 623667,46 E/9311972,51 N, zona 22M, hemisfério sul) (Figura 1).

A propriedade adota o sistema semi-intensivo de criação, com dieta baseada em pastagens cultivadas de capim mombaça (*Panicum maximum* Jacq. cv. *Mombaça*) *ad libitum* e suplementação mineral.

Figura 1 - Mapa da área onde foi realizado o estudo.



Fonte: Autor

2.2.2 Coleta de material biológico

Foram coletadas 41 amostras de pelos da vassoura da cauda, de fêmeas bubalinas. Os animais foram previamente contidos em tronco, em que cada porção de pelo foi laçada e puxada firmemente em porções de cerca de 20 pelos por vez. Cada amostra apresentou aproximadamente 40 pelos, contendo seus respectivos folículos pilosos, e acondicionados em microtubos (1,5 mL) individuais devidamente identificados e mantidos a -20°C até o momento da extração do DNA genômico.

2.2.3 Análises moleculares

A extração do DNA foi realizada utilizando o kit comercial Wizard® Promega (Promega Bio Sciences, LLC. San Luis Obispo, CA, USA.), de acordo com as normas do fabricante e mantidas a -20°C .

Para verificar a qualidade e quantidade do material extraído, as amostras foram submetidas a espectrofotometria, utilizando o espectrofotômetro UV-Vis Biodrop Duo (BioDrop Ltd,

#80300661, South San Francisco, CA 94080 USA), e posteriormente, submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, visualizadas em fotodocumentador (UVP) sob exposição à luz ultravioleta. Os produtos de DNAs foram diluídos e padronizados para a concentração final de 100ng/ μ L.

Para a determinação dos alelos de CSN1S1, localizados mais especificamente, na região promotora, 5' UTR e éxon 1, foram amplificados fragmentos de 313 pb, e para determinação dos alelos do gene CSN3, localizados entre o éxon 4 e íntron 4, fragmentos de 348 pb, ambos amplificados por meio de reação em cadeia da polimerase, (PCR- polymerase chain reaction), utilizando-se dos primers desenhados por Freitas (2015) (CSN1S1) e Fonseca et al., 2013 (CSN3) ambos desenvolvidos exclusivamente para amplificações em bovinos.

Cada 25 μ L da solução da reação de PCR foram preparados utilizando-se de 2 μ L de tampão ((NH₂)₂SO₄); 1 μ L de Mg⁺ Cl⁻; 2 μ L de dNTP; 0,5 μ L de primer forward; 0,5 μ L de primer reverse; 0,2 μ L de Taq polimerase; 17,3 μ L de água ultrapura e 1 μ L de DNA. Para a realização da técnica de PCR, foi realizado teste de gradiente de temperatura, para garantir a escolha da temperatura ideal de anelamento dos primers, uma vez que foram utilizados primers desenhados previamente para bovinos, e que até então, não haviam sido testados em bubalinos, com isso, a temperatura que resultou visualmente em um melhor anelamento, foi a de 50°C, para ambos os genes (CSN1S1 e CSN3). As amostras foram amplificadas no termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, A24811).

O programa utilizado para amplificação de ambos os genes segue descrito: desnaturação inicial 95°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min com extensão final a 72°C por 30 min.

Para verificar os produtos da reação de amplificação, cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com 3 μ L de SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen corporation), coradas com azul de bromofenol (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, 1X, Invitrogen corporation), e visualizadas fotodocumentador LPIX Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia). O tampão de corrida utilizado foi TBE 1X (Tris-borato-EDTA) e a eletroforese foi realizada em cuba horizontal 10x10 cm (Kasvi, K33-10H), com pentes de 1,0 mm de espessura, nas seguintes condições de corrida: 40V por 10 minutos + 80V por 15 minutos.

Foram consideradas aptas ao sequenciamento genético, amostras que apresentaram amplificações íntegras, no tamanho aproximado de 314pb para o gene CSN1S1, e 347pb para o gene CSN3.

Para purificação das amostras, os produtos de PCR foram processados utilizando o kit de purificação Exo/SAP Go (USB, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Cada reação foi preparada em volume final de 15 μ L, utilizando o kit comercial BigDye® Terminator Cycle Sequencing v3.1 (versão 3.1, Applied Biosystems, Foster City CA, USA), conforme recomendações do fabricante e as amplificações realizadas em termociclador Veriti® Thermal Cycler da Applied Biosystems. Para o sequenciamento, uma nova etapa de purificação das amostras foi realizada (etanol absoluto e etanol 70%) e cada produto foi sequenciado e separado por eletroforese de capilar, em um sequenciador automático modelo ABI-3130® Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

Os eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento foram editados e analisados por meio do software BioEdit - 7.2.1[®], onde inicialmente, as sequências foram editadas para remoção de trechos de baixa qualidade, submetidas ao BLAST (ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local) em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> para confirmação do sequenciamento (nível de compatibilidade de 100%) e alinhadas por meio da ferramenta ClustalW. As sequências geradas para cada produto de PCR, foram alinhadas juntamente com o primer forward ou reverse, e com as sequências referência para cada gene (CSN1S1 - Gene ID: 102396531; CSN3 - Gene ID: 102395364), proporcionando assim um alinhamento linear exato que permite a visualização de eventuais diferenças entre as sequências (mutações ou polimorfismos).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Gene da α - caseína (s1): CSN1S1

Dentre os 41 animais investigados, duas amostras as análises não foram possíveis, devido ao excesso de background nos arquivos de saída do sequenciamento, ocasionando uma amostragem total de 39 animais analisados. O fragmento amplificado apresentou 313pb, localizado em parte da região promotora 5' UTR e parte do éxon 1, abrangendo 273 nucleotídeos 5' UTR e 40 nucleotídeos no éxon 1 (Figura 2).

Figura 2 - Sequências de nucleotídeos e aminoácidos do fragmento amplificado no gene CSN1S1 em fêmeas bubalinas da raça Murrah.

1	<u>TGC ATG TTC TCA TAA TAA CCA TAA ATC TAG GGT TTT GTT GGG GGG</u>	45
46	<u>TTT TTT GTA TGT TAA TTT AGA ACA ATG CCA TTC CAT TTC CTG TAT</u>	90
91	<u>AAT GAA TCA CTT CTT TGT TGT AAA CTC TCC TTA GAA TTT CTT GGG</u>	135
136	<u>AGA GGA ACT GAA CAG AAC ATT GAT TTC CTA TGT GAG AGA ATT CTT</u>	180
181	<u>AGA ATT TAA ATA AAC CTA TTG GTT AAA CTG AAA CCA CAA AAT TAG</u>	225
226	<u>CAT TTT ATT AAT CAG TAG GTT TAA ATA GCT TG@AAG CAA AAG TCT</u>	270
271	<u>GCC</u> ATC ACC TTG ATC ATC AAC CCA GCT TGC TGC TTC TTC CCA G	313
1	I T L I I N P A C C F F P X	13

Fonte: Autor

A região UTR de 5' está destacada e sublinhada. O nucleotídeo marcado como @ corresponde a base A em 23 animais, base G em um (1) animal e A/G em 15 animais heterozigotos.

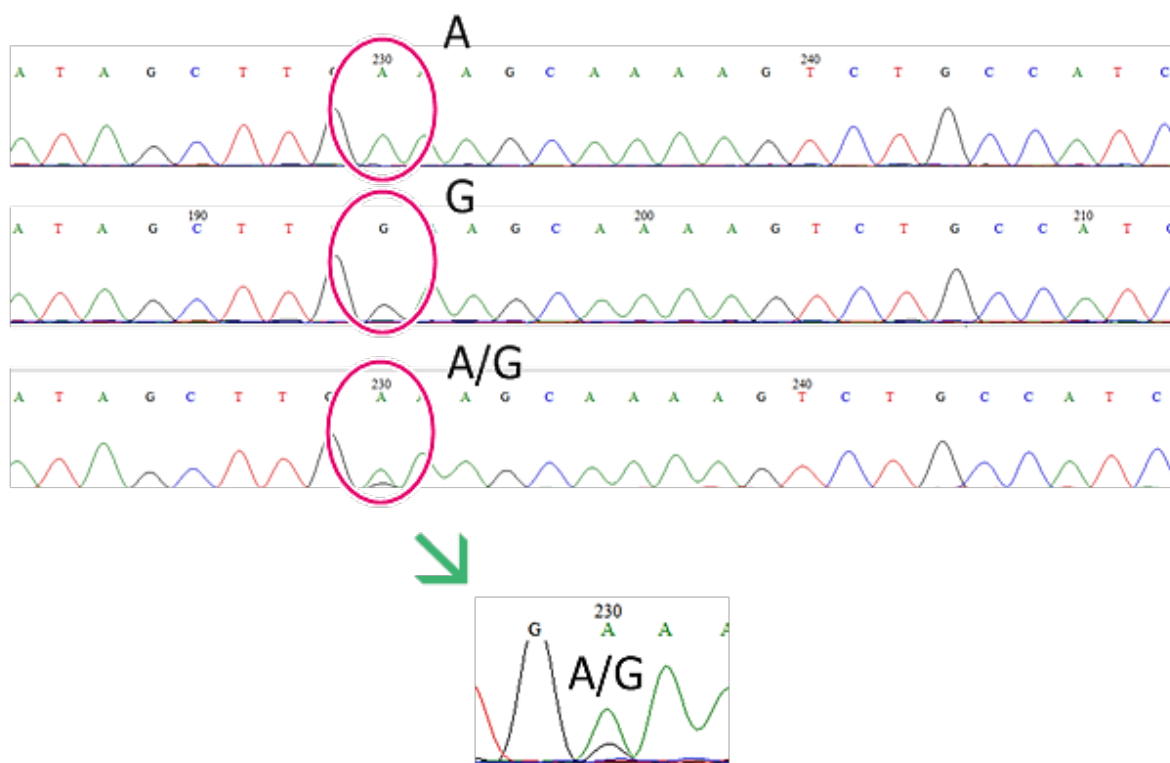
Este mesmo gene foi amplificado e analisado anteriormente em caprinos (BONANNO et al., 2013; COSENZA et al., 2008; DETTORI et al., 2009; VALENTI; PAGANO; AVONDO, 2012), ovinos (CALVO et al., 2013; GIAMBRA et al., 2010), equinos (BRINKMANN et al., 2016), lhamas (PAUCIULLO et al., 2017), camelos (SHUIEP et al., 2013), bovinos (FARRELL et al., 2004b; PERNA et al., 2016; VIALE et al., 2017) e bubalinos (BONFATTI et al., 2012a; CHIANESE et al., 2009; COSENZA et al., 2015b; EL NAHAS et al., 2013a).

Entretanto, a análise de fragmentos que correspondam a região promotora 5' UTR e parte do éxon 1 de búfalos, ainda não constam na literatura, o que pode ser explicado devido tal fragmento não estar inserido em uma região codificante. Entretanto, sabe-se que esta região (5' UTR) é muito importante para a transcrição do gene, visto que a transcrição se inicia na região promotora, e consequentemente, o correto reconhecimento da região promotora torna-se crítico na regulação da expressão gênica, (ALVES; SOUZA, 2013), justificando a necessidade da exploração de estudos de polimorfismos em regiões não codificantes.

As sequências de nucleotídeos de búfalo das 39 amostras foram idênticas, exceto por 1 polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) localizado no nucleotídeo de número 2.123 da região promotora (5' UTR), do gene CSN1S1, na posição nt-258 (A/G). Desta maneira, o SNP observado permitiu a identificação de 3 genótipos distintos: dois homozigotos (AA) e (GG) e

um heterozigoto (AG), sendo que apenas um indivíduo mostrou padrão homozigoto GG (Figura 3).

Figura 3 - Diferentes padrões encontrados para o gene CSN1S1, na posição #2.123 (região promotora (5' UTR)), (Genótipos AA, GG e AG).



Fonte: Autor

Quanto as análises das frequências genotípicas para o polimorfismo encontrado no gene CSN1S1 das fêmeas estudadas, foi possível observar maior percentual do genótipo AA, com 0,59, seguido do genótipo heterozigoto AG, com 0,38, e GG, presente em apenas 0,03 dos indivíduos da população analisada. Quanto a frequência alélica, a mesma foi de 0,78 para o alelo A, e 0,22 para o alelo G.

Em relação à frequência genotípica esperada, a mesma apresentou valores distintos em relação as frequências observadas, resultando em valores de 0,61 (AA), 0,34 (AG) e 0,05 (GG). Além disso, a heterosigosidade observada (H_o) apresentou-se maior que a heterosigosidade esperada (H_e) (0,38 vs. 0,34), sugerindo-se assim, excesso de heterozigotos em relação ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

De acordo com Murray (1996), o excesso de heterozigotos pode ser explicado por dois fatores, pela presença de alelos deletérios ou de genes letais, e, pela predominância de cruzamentos exogâmicos, sendo este último, o que melhor descreve o manejo reprodutivo adotado pela propriedade utilizada neste experimento, uma vez que buscam material genético de maior variabilidade possível.

2.4.2 Gene da κ -caseína: CSN3

Quanto ao gene CSN3, o mesmo foi amplificado e analisado em 34 animais. O fragmento amplificado apresentou 350pb, localizado em parte do éxon 4 e parte do íntron 4, abrangendo 238 nucleotídeos localizados na região codificadora e 112 nucleotídeos no íntron 4 (Figura 4).

Figura 4 - Sequências de nucleotídeos e aminoácidos do fragmento amplificado do gene CSN3 fêmeas bubalinas da raça Murrah.

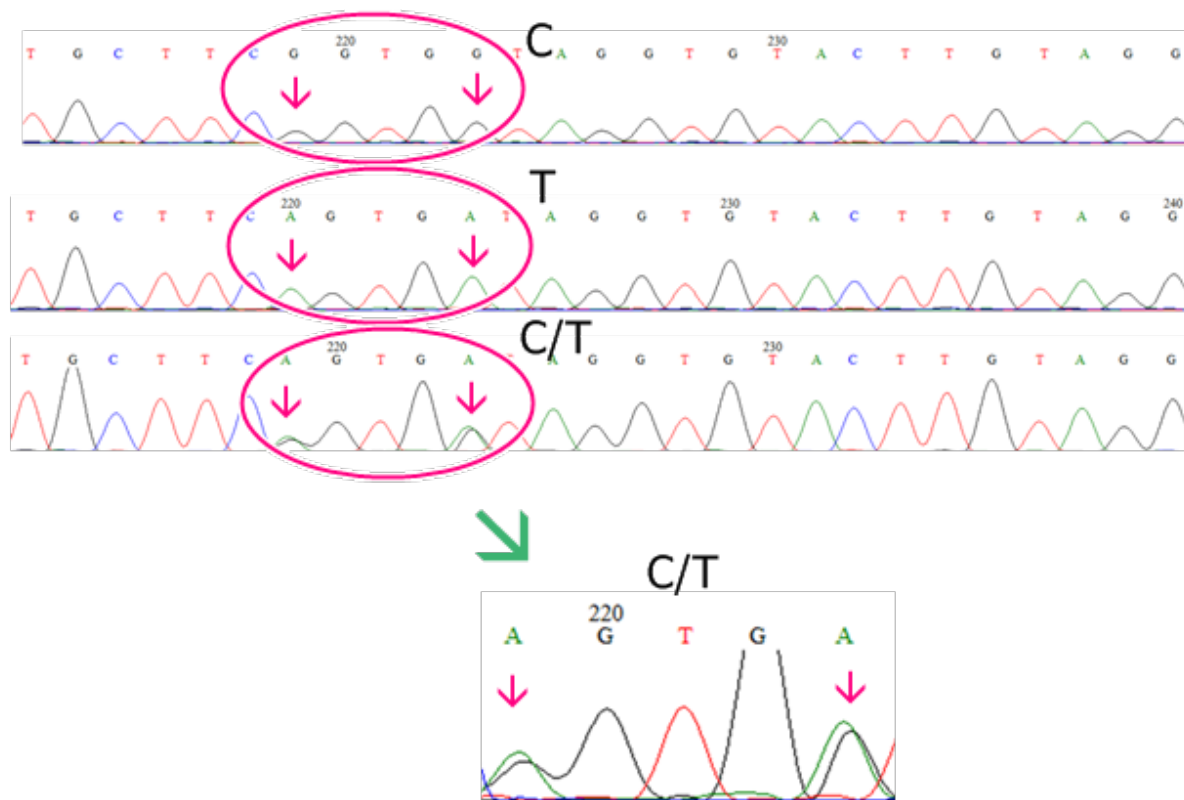
1	TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA AAT CAG GAT AAA ACA	45
1	L S F M A I P P K K N Q D K T	15
46	GAA ATC CCT ACC ATC AAT ACC ATT GTT AGT GTT GAG CCT ACA AGT	90
16	Q I P T I N T I V S V E P T S	30
91	ACA CCT A@C AC@ GAA GCA ATA GAG AAC ACT GTA GCT ACT CTA GAA	135
31	T P X X Q A I Q N T V A T L Q	45
136	GCT TCC TCA GAA GTT ATT GAG AGT GTA CCT GAG ACC AAC ACA GCC	180
46	A S S Q V I Q S V P Q T N T A	60
181	CAA GTT ACT TCA ACC GTC GTC TAA AAA CTC TAA GGA GAC ATC AAA	225
61	Q V T S T V V End K L End G D I K	75
226	GAA GAC AAC ACA <u>GGT AAA TAA GCA AAA TGA ATA ATA GCC AAG ATT</u>	270
76	E D N T	79
271	<u>CAT GGA CTT ATT AAT AAA ATC ATA ACA TCT AAA CTA GCA TAG ATG</u>	315
316	<u>GAT AAA TTA AAT CTG TTA CAG AGA AGG CAA AAT GG-</u>	351

Fonte: Autor

*A região do íntron 4 está destacada e sublinhada. O nucleotídeo marcado como @ corresponde a base C em 18 animais, base T em dois (2) animais e C/T em 14 animais heterozigotos.

De acordo com a análise do sequenciamento no gene CSN3, dois SNPs foram identificados de um total de 34 amostras de búfalas. Os polimorfismos foram localizados nos nucleotídeos de número 377 e 381 do éxon 4, na posição nt-98 e nt-102 (T/C). As bases variantes nos nucleotídeos 377 e 381 foram semelhantes, permitindo a identificação de 3 genótipos distintos: dois homozigotos (CC) e (TT) e um heterozigoto (CT), sendo que apenas dois indivíduos mostraram padrão homozigoto TT (Figura 5), analisados por meio de cromatogramas e de sequências encontradas por amostra.

Figura 5 - Diferentes padrões encontrados para o gene CSN3, na posição #377 e #381 (éxon 4), (Genótipos CC, TT e CT (GG, AA e GA reverse complement)).



Fonte: Autor

Por cobrir uma grande parte da região codificadora deste gene (EL NAHAS et al., 2013), fragmentos de DNA semelhantes foram amplificados e analisados anteriormente em caprinos (CHESSA et al., 2003; PRINZENBERG et al., 2005; SINGH et al., 2015), ovinos (SINGH et al., 2015), iaques (PRINZENBERG; JIANLIN; ERHARDT, 2008), bovinos (CHEN et al., 2008), camelos (PAUCIULLO et al., 2013) e búfalos (ABDEL DAYEM et al., 2009; MASINA et al., 2007; RIAZ et al., 2008).

No que diz respeito aos búfalos, durante muito tempo, diversos autores os consideravam como sendo BB monomórficos (homozigotos para o alelo T) para o gene CSN3 (ABDEL DAYEM et al., 2009; JAAYID et al., 2013; OTAVIANO et al., 2005; PATEL et al., 2007; RIAZ et al., 2008), o que provavelmente estaria associado à técnica empregada nos testes, PCR-RFLP, baseada no uso de enzimas de restrição, mais especificamente, enzimas utilizadas em ensaios com bovinos, *HinfI*, *HindIII* e *TaqI* (ABDEL DAYEM et al., 2009).

Neste contexto, Mitra et al., (1998), buscaram identificar variantes genéticas no gene CSN3 com o uso do PCR-RFLP, o que de fato resultou na observação de apenas um alelo, denominado B (base T), que logo mais, ao utilizarem-se de outra técnica, o sequenciamento de fragmentos de DNA, foi possível encontrar polimorfismos semelhantes aos descritos neste estudo, evidenciando que sempre existiram dois alelos, A e B (bases C e T respectivamente).

Dando espaço a teoria de El Nahas et al., (2013), de que as enzimas de restrição citadas (*HinfI*, *HindIII* e *TaqI*), não são adequadas para testes com búfalos, uma vez que os locais de restrição das enzimas *HinfI* (alelo A bovino) e *TaqI* (alelo B bovino), não estão presentes em búfalos, independente dos alelos. Quanto ao local de restrição pertinente à enzima *HindIII* (presente apenas em bovinos que portam o alelo B) é encontrado em búfalos que possuem ambos os alelos (A e B; bases C e T, respectivamente) o que acaba por confundir, podendo justificar a ausência de polimorfismo nas populações estudadas por autores que utilizaram-se das mesmas técnicas moleculares (PCR-RFLP (*HinfI*, *HindIII* e *TaqI*)).

Os polimorfismos encontrados nesse estudo, também foram relatados por Chikuni et al., (1994), por meio do sequenciamento direto, de apenas um indivíduo; Masina et al., (2007), por meio da clonagem sobreposta de uma biblioteca genômica de búfalos; El Nahas et al., (2013), que buscaram caracterizar o gene CSN3 para o búfalo egípcio; Beneduci et al., (2010), observaram polimorfismo no códon 135, permitindo a detecção de variantes alélicas A e B, em búfalas Murrah búlgaros; e Bonfatti et al., (2012) que detectaram variantes genéticas (alelo C e T) em búfalos do mediterrâneo, e buscaram estimar os efeitos de genótipos combinados entre os genes CSN1S1 e CSN3, sobre características de produção e de coagulação do leite.

Os dois SNPs identificados neste estudo em nt-98 e nt-102 (nucleotídeos de número 377 e 381 do éxon de número 4, do gene CSN3) estavam presentes nos códons 33 (ACC / ATC) e 34 (ACC / ACT) do fragmento analisado, este último, considerado uma mutação silenciosa (BENEDUCI et al., 2010; EL NAHAS et al., 2013).

Tais variantes correspondem aos códons 135 e 136 do peptídeo maduro, e que, uma vez traduzidos, resultam nos aminoácidos Treonina (Thr) / Isoleucina (Ile), no caso dos códons ATC – códon 33; e ACT – códon 34 (Figura 6), e Treonina / Treonina, para os códons ACC

– códon 33; e ACC – códon 34, resultando em diferenças nas concentrações de tais aminoácidos de acordo com a zigose observada, corroborando com o que foi relatado por Beneduci et al., (2010), Bonfatti et al., (2012) e El Nahas et al., (2013).

Figura 6 - Parte das sequências de nucleotídeos (de nt-91 a nt-135) e de aminoácidos (de 31 a 45 do alinhamento) do segmento de DNA amplificado por PCR de búfalas leiteiras da raça Murrah, mostrando o alelo C, códon 33 Thr (ACC) / códon 34 Thr (ACC) e alelo T, códon 33 Ile (ATC) / códon 34 Thr (ACT).

Alelo C

```

91  ACA CCT ACC ACC GAA GCA ATA GAG AAC ACT GTA GCT ACT CTA GAA  135
31  T   P   T   T   Q   A   I   Q   N   T   V   A   T   L   Q   45

```

Thr / Thr

Alelo T

```

91  ACA CCT ATC ACT GAA GCA ATA GAG AAC ACT GTA GCT ACT CTA GAA  135
31  T   P   I   T   Q   A   I   Q   N   T   V   A   T   L   Q   45

```

Ile / Thr

Fonte: Autor

A variante B (alelo T), a qual resulta nos aminoácidos isoleucina e treonina, nos códons 135 e 136 do peptídeo maduro de k-caseína foi associada a maior percentual de gordura, proteína, e caseína no leite bovino, influenciando significativamente na fabricação de queijos, devido seu poder de coagulação superior do coalho em comparação com a variante A (Alelo C) (ALIPANAH; KALASHNIKOVA; RODIONOV, 2005; HECK et al., 2009), tornando necessários estudos que confirmem essa associação também em búfalas, possibilitando que esta variante, possa ser utilizada em programas de seleção assistidos por marcadores moleculares.

Quanto as análises das frequências genotípicas para os polimorfismos encontrados no gene CSN3 das fêmeas analisadas, foi possível observar maior percentual do genótipo CC, com 0,53, seguido do genótipo heterozigoto CT, com 0,41, e TT, presente em apenas 0,06 dos indivíduos da população analisada até o momento. Beneduci et al., (2010) encontraram frequências genotípicas muito similares, como 0,56 para o genótipo AA (CC), 0,40 AB (CT) e 0,04 para o genótipo BB (TT), em búfalas Murrah búlgaras. Diferente de El Nahas et al., (2013b), que encontraram frequências 0,29 para o genótipo AA (CC), 0,65 AB (CT), e 0,06 para o genótipo BB (TT), para búfalas Egípcias. Já Patel et al., (2007), observaram apenas os genótipos BB

(TT) e AB (CT), com as frequências genotípicas de 0,97 e 0,03, respectivamente, para touros búfalos das raças Murrah, Jaffarabadi, Surti e Pandharpuri.

Quanto à frequência alélica, a mesma foi de 0,74 para o alelo C, e 0,26 para o alelo T. Quanto a frequência genotípica esperada (EHW), esta resultou em valores de 0,54 (CC), 0,39 (CT) e 0,07 (TT) (Tabela 1), demonstrando que a população possa estar evoluindo, uma vez que as frequências genotípicas estão sendo alteradas, e ainda, devido a heterosigiosidade observada (H_o) ser maior que a heterosigiosidade esperada (H_e) (0,4118 vs. 0,3893), sugerindo-se assim excesso de heterozigotos em relação ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 1 - Frequências genotípicas observadas, esperadas e alélicas, para os genes CSN1S1 e CSN3.

Gene	N*	Reg*	Frequências dos genótipos								Frequência dos alelos				
			Gen*	FGo	FGe	Gen	FGo	FGe	Gen	FGo	FGe	Alelo	Fa	Alelo	Fa
CSN1S1	2.123	5' UTR	AA	0,59	0,61	AG	0,38	0,05	GG	0,03	0,34	A	0,78	G	0,22
CSN3	377	éxon 4	CC	0,53	0,54	CT	0,41	0,07	TT	0,06	0,39	C	0,74	T	0,26
CSN3	381	éxon 4	CC	0,53	0,54	CT	0,41	0,07	TT	0,06	0,39	C	0,74	T	0,26

N*: Número do nucleotídeo

Reg*: Região do gene

Gen*: Genótipo

Neste contexto, é possível inferir que ocorre ausência de cruzamentos endogâmicos na população estudada, devido a quantidade de indivíduos heterozigotos observada, característica essa também encontrada por Beneduci et al., (2010), ao estudar indivíduos que também pertenciam ao grupo genético Murrah, se depararam com um número elevado de heterozigotos, entretanto, a referida população encontrava-se em EHW no locus CSN3.

2.4 Conclusões

Um novo SNP foi encontrado para o gene CSN1S1, em fêmeas bubalinas, localizado no nucleotídeo de número 2.123 da região promotora (5' UTR), na posição nt-258 (A/G).

Ainda, foram encontrados 2 SNPs já conhecidos, porém que ainda não haviam sido relatados em fêmeas bubalinas de padrão racial Murrah, criadas sob clima tropical, tais variantes estão localizadas nos nucleotídeos de número 377 e 381 do éxon de número 4, do gene CSN3, presentes nos códons 135 e 136 do peptídeo maduro, e que, uma vez traduzidos, resultam nos aminoácidos Treonina (Thr) / Isoleucina (Ile), no caso dos códons ATC / ACT e Treonina / Treonina, para os códons ACC / ACC.

REFERÊNCIAS

- ABDEL DAYEM, A. M. H. et al. Genotyping of kappa-casein gene in Egyptian buffalo bulls. **Livestock Science**, v. 122, n. 2–3, p. 286–289, 1 jun. 2009.
- ALIPANAH, M.; KALASHNIKOVA, L.; RODIONOV, G. **Kappa-casein genotypic frequencies in Russian breeds Black and Red Pied cattle**. [s.l.] National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, 2005. v. 3
- ALVES, E. A.; SOUZA, D. S. Biologia molecular. In: [s.l.: s.n.]. 2013.
- AMARAL, F. R. et al. Qualidade do leite de búfalas: composição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 106–110, 2005.
- ANUÁRIO LEITE. **Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro**. [s.l.] Embrapa gado de leite, 2018.
- BENEDUCI, B. et al. Molecular characterization of k-casein allelic variants in Bulgarian buffalo breed. **Acta Agraria Kaposváriensis**, v. 14, n. 2, p. 169–172, 2010.
- BONANNO, A. et al. Influence of fresh forage-based diets and α S1-casein (CSN1S1) genotype on nutrient intake and productive, metabolic, and hormonal responses in milking goats. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 4, p. 2107–2117, 1 abr. 2013.
- BONFATTI, V. et al. Effect of CSN1S1-CSN3 (α S1- κ -casein) composite genotype on milk production traits and milk coagulation properties in Mediterranean water buffalo. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 6, p. 3435–3443, 1 jun. 2012.
- BRINKMANN, J. et al. Genetic variability of the equine casein genes. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5486–5497, 1 jul. 2016.
- CALVO, J. H. et al. Structural and functional characterisation of the α S1-casein (CSN1S1) gene and association studies with milk traits in Assaf sheep breed. **Livestock Science**, v. 157, n. 1, p. 1–8, 1 out. 2013.
- CHEN, S. Y. et al. Short Communication: New Alleles of the Bovine κ -Casein Gene Revealed by Resequencing and Haplotype Inference Analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 9, p. 3682–3686, 1 set. 2008.
- CHESSA, S. et al. Short Communication: Simultaneous Identification of Five κ -Casein (CSN3) Alleles in Domestic Goat by Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 11, p. 3726–3729, 1 nov. 2003.
- CHIANESE, L. et al. Occurrence of genetic polymorphism at the α S1-casein locus in Mediterranean water buffalo milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 4, p. 181–189, 2009.
- CHIKUNI, K. et al. Direct Sequencing of the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) κ -casein Gene. **Anim. Sci. Technol. (Jpn.)**, v. 65, n. 7, p. 652–655, 1994.

COSENZA, G. et al. Genotyping at the CSN1S1 locus by PCR-RFLP and AS-PCR in a Neapolitan goat population. **Small Ruminant Research**, v. 74, n. 1–3, p. 84–90, 1 jan. 2008.

COSENZA, G. et al. Mediterranean river buffalo CSN1S1 gene: search for polymorphisms and association studies. **Animal Production Science**, v. 55, n. 5, p. 654–660, 2015.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2265–2272, 2011.

DETTORI, M. L. et al. A reliable method for characterization of the goat CSN1S1 E allele. **Livestock Science**, v. 125, n. 1, p. 105–108, 1 out. 2009.

EL DEBAKY, H. A. et al. Review: Potential of water buffalo in world agriculture: Challenges and opportunities. **Applied Animal Science**, v. 35, n. 2, p. 255–268, 1 abr. 2019.

EL NAHAS, S. M. et al. Detection of two CSN1S1 variants in Egyptian buffalo. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 75–77, 1 jun. 2013.

FAOSTAT, F. AND A. O. OF THE U. N. S. D. **Compare data**.

FARRELL, H. M. et al. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1641–1674, 1 jun. 2004.

FREITAS, D. **Relação entre polimorfismo de caseínas, composição, propriedades do leite de animais Holandês x Zebu e indicadores tecnológicos de queijo**. 2015. 54f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

FONSECA, P. et al. A new tetra-primer ARMS-PCR for genotyping bovine kappa-casein polymorphisms. **Genetics and molecular research**, v. 12, p. 6521–6526, 2013.

GIAMBRA, I. J. et al. Genomics and proteomics of deleted ovine CSN1S1*I. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 3, p. 195–202, 1 mar. 2010.

HECK, J. M. L. et al. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 1192–1202, 1 mar. 2009.

JAAYID, T. A. et al. Genetic Polymorphism of Kappa Casein (κ -CN) in Iraqi Buffalo Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. A, n. 3, p. 835–841, 2013.

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Avaliação genética de populações naturais e de estoques de um programa de repovoamento de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando marcadores microsatélite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 954–963, ago. 2010.

MAPA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e**

o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 2011.

MARCONDES, C. R. Melhoria de búfalos no Brasil: avanços, entraves e perspectivas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, p. 307–315, 2011.

MASINA, P. et al. Water buffalo kappa-casein gene sequence. *Italian Journal of Animal Science*, v. 6, n. 2, p. 353–355, 4 fev. 2007.

MCLEAN, D. M. Influence of milk protein variants on milk composition, yield and cheese making properties. *Animal Genetics*, v. 18, p. 100–102, 1987.

MÉNARD, O. et al. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. *Food Chemistry*, v. 120, n. 2, p. 544–551, 15 maio 2010.

MITRA, A. et al. Kappa-casein polymorphisms in Indian dairy cattle and buffalo: A new genetic variant in buffalo. *Animal Biotechnology*, v. 9, n. 2, p. 81–87, jul. 1998.

MÜLLER-BUSCHBAUM, P. et al. Effect of Calcium Concentration on the Structure of Casein Micelles in Thin Films. *Biophysical Journal*, v. 93, n. 3, p. 960–968, 1 ago. 2007.

MURRAY B.W. **The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data.** 1996.

NCBI. **CSN1S1 casein alpha s1 [Bubalus bubalis (water buffalo)]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=CSN1S1+bubalis>>. Acesso em: 29 jan. 2020a.

NCBI. **CSN3 casein kappa [Bubalus bubalis (water buffalo)]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=CSN3+bubalis>>. Acesso em: 29 jan. 2020b.

OTAVIANO, A. R. et al. Kappa-casein gene study with molecular markers in female buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 2, p. 237–241, 2005.

PATEL, R. K. et al. Frequências de genótipo e alelos de κ -caseína e β -lactoglobulina no rio indianobúfalo touros (*Bubalus bubalis*). *Buffalo Bulletin*, v. 26, n. 3, p. 63–66, 2007.

PAUCIULLO, A. et al. Molecular characterization and genetic variability at κ -casein gene (CSN3) in camels. *Gene*, v. 513, n. 1, p. 22–30, 15 jan. 2013.

PAUCIULLO, A. et al. Lama glama α S1-casein: Identification of new polymorphisms in the CSN1S1 gene. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 2, p. 1282–1289, 1 fev. 2017.

PERNA, A. et al. The influence of casein haplotype on quality, coagulation, and yield traits of milk from Italian Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 5, p. 3288–3294, 1 maio 2016.

PRINZENBERG, E.-M. et al. Caprine κ -Casein (CSN3) Polymorphism: New Developments in Molecular Knowledge. *Journal of Dairy Science*, v. 88, n. 4, p. 1490–1498, 1 abr. 2005.

PRINZENBERG, E.-M.; JIANLIN, H.; ERHARDT, G. Genetic Variation in the κ -Casein Gene (CSN3) of Chinese Yak (*Bos grunniens*) and Phylogenetic Analysis of CSN3 Sequences in the Genus *Bos*. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, p. 1198–1203, 1 mar. 2008.

RAFIQ, S. et al. Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 29, n. 7, p. 1022–1028, jul. 2016.

RIAZ, M. . et al. Molecular marker assisted study of kappa-casein gene in nili-ravi (buffalo) breed of Pakistan. **Pakistan Vet. J.**, v. 28, n. 3, p. 103–106, 2008.

SHUIEP, E. T. S. et al. Biochemical and molecular characterization of polymorphisms of α s1-casein in Sudanese camel (*Camelus dromedarius*) milk. **International Dairy Journal**, v. 28, n. 2, p. 88–93, 1 fev. 2013.

SINGH, U. et al. Association of prolactin and beta-lactoglobulin genes with milk production traits and somatic cell count among Indian Frieswal (HF $\times$ Sahiwal) cows. **Biomarkers and Genomic Medicine**, v. 7, n. 1, p. 38–42, 1 mar. 2015.

TONHATI, H. et al. Multiple-trait genomic evaluation for milk yield and milk quality traits using genomic and phenotypic data in buffalo in Brazil. **Buffalo Bulletin**, v. 32, n. 2, p. 746–749, 2013.

TSIARAS, A. M. et al. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 1, p. 327–334, 2005.

UNIPROT. **UniProtKB - O62823 (CASA1_BUBBU)**. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprot/O62823>>. Acesso em: 30 jan. 2020a.

UNIPROT. **UniProtKB - P11840 (CASK_BUBBU)**. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprot/P11840>>. Acesso em: 30 jan. 2020b.

VALENTI, B.; PAGANO, R. I.; AVONDO, M. Effect of diet at different energy levels on milk casein composition of Girgentana goats differing in CSN1S1 genotype. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1–3, p. 135–139, 1 jun. 2012.

VIALE, E. et al. Association of candidate gene polymorphisms with milk technological traits, yield, composition, and somatic cell score in Italian Holstein-Friesian sires. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 9, p. 7271–7281, 1 set. 2017.

ZHANG, T. et al. Selection and effectiveness of informative SNPs for paternity in Chinese Simmental cattle based on a high-density SNP array. **Gene**, v. 673, p. 211–216, 2018.

3 CONCLUSÕES GERAIS

O conhecimento de polimorfismos de genes candidatos em búfalos leiteiros sugere e fomenta estudos que objetivem estabelecer associações entre tais variantes em genes candidatos,

e características de produção de leite e seus derivados, viabilizando a seleção assistida por marcadores moleculares.