

AMÉLIA CRISTINA MENDES DE MAGALHÃES

**METABOLISMO PROTÉICO E ENERGÉTICO E ESTUDO ULTRA-
ESTRUTURAL DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE CABRAS LACTANTES
DE DIFERENTES GENÓTIPOS PARA ALPHA_{s1}-CASEÍNA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M188m
2007

Magalhães, Amélia Cristina Mendes de, 1972-
Metabolismo protéico e energético e estudo ultra-estrutural
da glândula mamária de cabras lactantes de diferentes
genótipos para α_{s1} -caseína / Amélia Cristina Mendes de
Magalhães. – Viçosa, MG, 2007.
xvii, 101f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marcelo Teixeira Rodrigues.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Cabra - Exigências nutricionais. 2. Lactação - Aspectos.
3. Proteínas na nutrição animal. 4. Proteínas - Metabolismo.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.


CDD 22.ed. 636.39

AMÉLIA CRISTINA MENDES DE MAGALHÃES

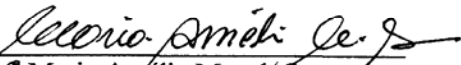
**METABOLISMO PROTÉICO E ENERGÉTICO E ESTUDO ULTRA-
ESTRUTURAL DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE CABRAS LACTANTES
DE DIFERENTES GENÓTIPOS PARA ALPHA_{s1}-CASEÍNA**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

APROVADA: 29 de junho de 2007.



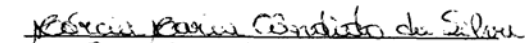
Prof. Adilson Ariza Zacaro
(Co-Orientador)




Prof.^a Maria Amélia Menck Soares
(Co-Orientadora)



Prof. Iran Borges



Prof.^a Márcia Maria Cândido da Silva



Prof. Marcelo Teixeira Rodrigues
(Orientador)

"Os sete pecados capitais responsáveis pelas injustiças sociais são: riqueza sem trabalho; prazeres sem escrúpulos; conhecimento sem sabedoria; comércio sem moral; política sem idealismo; religião sem sacrifício e ciência sem humanismo."

Mahatma Gandhi

Aos meus amados pais, Carlos e Ignez Maria, pelos ensinamentos de vida, pelo incentivo e acima de tudo pela certeza do amor incondicional e irrestrito que nos une.

Às minhas irmãs, Carla e Sandra, minhas melhores amigas, que sempre estiveram do meu lado e me presentearam com preciosos e amados sobrinhos, João Pedro, Natália e Heitor Augusto, e aos cunhados maravilhosos, Ednaldo e Cláuzio.

À minha afilhada Vivian, que pelo seu amor e pela amizade tornou minha vida mais bonita e feliz.

Ao amor da vida, Jay, pelo companheirismo, apoio e incentivo durante a condução deste doutorado e pela certeza do amor que nos une.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao senhor Deus, sem dúvida a grande certeza de minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa e ao Setor de Caprinocultura, por permitirem a execução deste projeto.

À Universidade Federal da Bahia, por me conceder um período de licença para conclusão deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pela concessão de recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, aos meus pais, às irmãs, aos cunhados e sobrinhos, companheiros nas alegrias e tristezas, motivos de orgulho sempre.

Ao professor Marcelo Teixeira Rodrigues, pela orientação zelosa e responsável, pelos ensinamentos profissionais e acima de tudo pelas lições de vida compartilhadas que o tornaram mais que um orientador, um amigo.

À professora Maria Amélia Menck Soares pela amizade e grande empenho em executar as análises genéticas que viabilizaram este estudo.

Ao professor Marco Túlio Coelho Silva, pelo desprendimento, pela dedicação e enorme alegria que conduziu o treinamento em cromatografia.

Ao professor Adilson Ariza Zacaro, meu querido coorientador, que além dos ensinamentos em Microscopia Eletrônica de Transmissão me presenteou com uma lição sobre metodologia científica, que trarei para sempre comigo.

Ao pesquisador Adilson Ferreira da Mota, pela efetiva atuação na coleta das biópsias de glândula mamária das cabras.

Ao professor Paulo Bonomo, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela prontidão e pelo empenho na condução das análises estatísticas.

À querida professora Maria Ignez Leão a quem posso apenas garantir que a levarei para sempre em meu coração.

À doutora Cláudia Vanetti, pela amizade, pelo carinho e permanente disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos, que tornaram os três meses trabalho no núcleo de microscopia eletrônica uma experiência maravilhosa.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, pela amizade, confiança e dedicação com que conduziram minha formação.

À professora Renata Maria Strozi Alves Meira, responsável pelo Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal-UFV, pelas facilidades oferecidas para utilização do fotomicroscópio e das dependências do laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia: Aparecida (Supimpa), Celeste, Venâncio, Márcia, Rosana, Mário, Edson, Adilson, Iraci, Sr. Jorge, Natanael, Zezé, Marcelo e Cleone, pelo auxílio e agradável convívio.

Aos funcionários do Setor de Caprinocultura, pela convivência harmoniosa e pela prontidão em ajudar durante a condução da fase experimental deste trabalho.

Ao funcionário José Maria, o “Corujinha”, que esteve presente em todos os dias do experimento de campo, sempre alegre, tornou nossa estadia no galpão experimental mais feliz, a ele serei eternamente grata.

Aos estagiários: Bernardo, Carla, Fernanda, Luis Henrique, Mariana, Paula, Rodrigo, Rogério, Renata, Simone, Sueli e Timótheo, pelo companheirismo, pelo carinho, pela amizade e pelo enorme comprometimento durante a árdua fase experimental. Tenham certeza que jamais me esquecerei de vocês e da alegria de ter sido, por algum tempo, a “chefinha” e, de tê-los como meus “filhotes”. Obrigada, obrigada, obrigada, muito obrigada...

Aos funcionários da Fábrica de Ração, Mauro Godoi e Sebastião, pela grande colaboração.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal: Monteiro, Fernando, Vera, Wellington, Valdir e Mário, pelo carinho, pelos ensinamentos e pela colaboração durante a temporada de análises.

À minha grande amiga Márcia, tenho tanto a agradecer: por sua inestimável dedicação na execução das análises de cromatografia gasosa, pelos conselhos e pela presença nos momentos alegres e tristes, pelos ensinamentos de garra, pela risada inesquecível, mas, principalmente pela sua amizade que tenho certeza é para toda vida.

Aos queridos afilhados, Lincoln e Elenice, amigos de todas as horas, o carinho de vocês conquistou meu coração para sempre.

À minha querida amiga Lucinda que me acolheu com tanto carinho, te adoro Lu.

Aos queridos amigos Nádja, Patrícia e Robson pela amizade e pelos momentos ímpares compartilhados durante nossa estadia em Viçosa. Saudades...

Ao amigo Miller, pelo convívio harmonioso durante a condução simultânea de nossos experimentos no setor de Caprinocultura e pela inestimável colaboração na execução da biópsias das glândulas mamárias das cabras.

Aos muitos e queridos colegas de curso que tornaram mais amenos e felizes os dias deste doutorado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

AMÉLIA CRISTINA MENDES DE MAGALHÃES, filha de Carlos Augusto de Magalhães e Ignez Maria Mendes Ferreira de Magalhães, nasceu em 21 de agosto de 1972, no município de Viçosa, Minas Gerais.

Em janeiro de 1994, graduou-se em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Em fevereiro de 1995, concluiu o Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Medicina Veterinária, na área de Clínica e Cirurgia de Grandes Animais, pela Universidade Federal de Viçosa.

No período de 10 de março a 9 de julho de 1995, lecionou como Professora Substituta/Auxiliar I no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Atuou como Médica Veterinária responsável pela Usina de Beneficiamento de Leite A Roldi Indústria e Comércio Ltda. e pela Fazenda Santa Bárbara, localizadas no município de Fundão, Estado do Espírito Santo, no período de 1º de agosto de 1995 a 30 de julho de 2001.

Em agosto de 2001, foi admitida como estudante especial pela Universidade Federal de Viçosa para o período letivo correspondente.

Em abril de 2002, matriculou-se no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, em nível de mestrado, concluindo-o em fevereiro de 2003.

Em março de 2003, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa, na área de Nutrição de Ruminantes, submetendo-se à defesa de tese aos 29 de junho de 2007.

Em outubro de 2006, ingressou por meio de concurso público, na Universidade Federal da Bahia, como docente no *Campus* Anísio Teixeira em Vitória da Conquista.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
Desempenho animal e eficiência de utilização de energia e nitrogênio em cabras lactantes com diferentes genótipos para α_{s1} -caseína	20
Resumo	20
Abstract.....	21
1. Introdução	22
2. Material e Métodos	24
2.1. Animais, local e delineamento experimental.....	24
2.2. Identificação dos alelos da α_{s1} -caseína.....	24
2.3. Ensaio de digestão e produção.....	25
3. Resultados e Discussão.....	33
3. Conclusões	44
Literatura Citada	44

	Página
Efeitos dos genótipos para α_{s1} -caseína sobre o perfil de caseínas e ácidos graxos no leite de cabras submetidas a diferentes teores de proteína na dieta	50
Resumo	50
Abstract.....	51
1. Introdução	52
2. Material e Métodos	54
2.1. Animais, local e delineamento experimental.....	54
2.2. Identificação dos alelos da α_{s1} -caseína.....	54
2.3. Dietas experimentais.....	55
2.4. Separação e quantificação das caseínas do leite	57
2.5. Separação e quantificação do perfil de ácidos graxos do leite	59
3. Resultados e Discussão	61
4. Conclusões	69
Literatura Citada	70
Efeitos dos genótipos para α_{s1} -caseína na morfologia da glândula mamária de cabras	75
Resumo	75
Abstract.....	76
1. Introdução	77
2. Material e Métodos	80
2.1. Animais, instalações e delineamento experimental.....	80
2.2. Identificação dos alelos da α_{s1} -caseína.....	80
2.3. Obtenção dos fragmentos de glândula mamária	81
3. Resultados.....	83
3.1. Considerações gerais.....	83
3.2. Organização geral do estroma e dos alvéolos.....	85
3.3. Células secretoras	86
4. Discussão	95
5. Conclusões.....	97
Literatura Citada	98

RESUMO

MAGALHÃES, Amélia Cristina Mendes de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2007. **Metabolismo protéico e energético e estudo ultra-estrutural da glândula mamária de cabras lactantes de diferentes genótipos para α_{s1} -caseína.** Orientador: Marcelo Teixeira Rodrigues. Co-orientadores: Adilson Ariza Zacaro e Maria Amélia Menck Soares.

Considerando a hipótese de que variações no gene da α_{s1} -caseína possam afetar o metabolismo protéico e energético em cabras lactantes, e em consequência suas exigências nutricionais, uma série de três experimentos foi elaborada para analisar esta possibilidade, avaliando-se o desempenho animal, a eficiência de uso da proteína e da energia, a composição de caseínas e ácidos graxos, e a morfologia da glândula mamaria. No primeiro experimento avaliou-se o desempenho como também as eficiências de utilização de energia e do nitrogênio para a síntese de leite, de cabras com os genótipos AA, EE, EF e AF para α_{s1} -caseína e alimentadas com dietas apresentando concentrações de 14% e 17% de proteína bruta. Para a determinação da eficiência de utilização de nutrientes utilizou-se um ensaio de digestibilidade com coleta total de fezes, além de coletas totais de urina e leite. A interação entre os níveis de proteína da dieta e os genótipos para α_{s1} -caseína não se apresentou significativa ($P>0,05$) para todas as variáveis avaliadas neste experimento. Animais pertencentes ao genótipo AA apresentaram valores de consumos de matéria seca, energia líquida, energia metabolizável e o balanço energético superiores aos dos animais do genótipo AF. Não se observou diferenças, entre os genótipos estudados, nos valores de eficiência bruta e

líquida de utilização da energia metabolizável, sendo estes valores médios de 66,21 e 30,66%, respectivamente. O balanço de nitrogênio apresentou-se superior nos animais que consumiram a dieta com 17% de PB e a eficiência de utilização maior para a dieta com 14%. A maior excreção de nitrogênio na urina (NUEx), os maiores teores de nitrogênio uréico no plasma e a menor eficiência líquida de utilização da proteína metabolizável nos animais consumindo a dieta com 17% de proteína bruta fornecem indícios de que este teor protéico encontra-se acima das exigências de proteína das cabras lactantes deste experimento. Não foram observados efeitos significativos dos genótipos analisados e dos níveis de proteína na dieta sobre a produção diária de leite e os conteúdos de gordura, lactose e extrato seco total e de energia no leite. O segundo experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos dos genótipos para α_{s1} -caseína do leite sobre a composição e o perfil de caseínas e de ácidos graxos no leite de cabras foram utilizadas cabras com os genótipos AA, EE, EF e AF para α_{s1} -caseína e submetidas aos teores de 14% e 17% de proteína bruta na dieta. A composição do leite foi determinada utilizando-se espectrofotometria por radiação infravermelha, o perfil de caseínas por cromatografia líquida e o perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa. Para todas as variáveis avaliadas neste experimento não foram observados efeitos significativos ($P>0,05$) da interação entre os níveis de proteína da dieta e os genótipos para α_{s1} -caseína. A concentração relativa de α_{s1} -caseína nos animais contendo alelos homozigotos de alta expressão de α_{s1} -caseína (AA) e nos heterozigotos (AF) apresentou-se como 24,88 e 21,80%, respectivamente, sendo superior aos dos animais dos demais genótipos. Os teores de proteína bruta do leite apresentados pelos animais do genótipo AA (31,68 g/L) foram significativamente superiores apenas aos dos animais do genótipo EF (29,01 g/L), embora não tenha diferido estatisticamente dos valores apresentados nos animais dos genótipos EE (29,94 g/L) e AF (30,24 g/L). A concentração de proteína verdadeira do leite (g.L^{-1}) foi superior para os animais de genótipo AA quando comparada à dos animais dos genótipos EE e EF, em respectivamente, 5,5% e 9,3%. Nos genótipos homozigotos AA e EE observaram-se os níveis de expressão de α_{s1} -caseína de 6,10 e 3,60g/L de leite, podendo-se inferir que a expressão por alelo, nestes casos, foi de respectivamente 3,05 e 1,8g/L de leite. Os animais do genótipo AA apresentaram os menores teores de κ -caseína e este fato associado a um maior conteúdo de α_{s1} -caseína pode estar relacionado ao maior rendimento industrial atribuído ao leite dos animais deste genótipo. Não foram

observados efeitos dos teores de proteína bruta da dieta sobre o *porcentual* de proteína verdadeira, proteína bruta e caseínas totais e individuais no leite. O perfil médio dos ácidos graxos no leite das cabras, os teores totais de ácidos graxos saturados e insaturados, mono e poliinsaturados não apresentaram efeitos significativos dos genótipos analisados e das concentrações de proteína na dieta. Apenas os ácidos graxos C6:0, C8:0 e C17:0 apresentaram-se em maiores concentrações nos animais recebendo a dieta com 14% de proteína bruta. O terceiro experimento foi conduzido com o objetivo de verificar os efeitos dos diferentes genótipos para α_{s1} -caseína (AA, EE, EF e FF) quando analisados parâmetros relativos à morfologia do parênquima mamário e das células secretoras do leite de cabras adultas e em lactação. As análises foram realizadas a partir de biópsias teciduais e os critérios morfológicos basearam-se na descrição histológica e ultra-estrutural (microscopia eletrônica de transmissão). O parênquima da glândula mamária apresentou um padrão de organização geral único e independente dos genótipos para α_{s1} -caseína. O parênquima mostrou-se formado por alvéolos, os quais são compostos por um epitélio com células secretoras colunares, células indiferenciadas e células mioepiteliais. No espaço interlobular observou-se a presença de um estroma constituído de tecido conjuntivo tendendo a frouxo, vasos sanguíneos, plasmócitos e mastócitos. No lúmen alveolar observou-se a presença de secreção láctea com células de descamação e polimorfonucleares. As células indiferenciadas do epitélio secretor não se estendem até a superfície luminal e apresentaram pleomorfismo quanto ao tamanho e a forma e também poucas organelas; no entanto apesar de exibirem polimorfismo nuclear, a cromatina do núcleo das células maiores mostrou-se mais eucromática que aquela observada nas células menores. A ultra-estrutura das células epiteliais secretoras no genótipo AA revelou um citoplasma quase que totalmente preenchido por retículo endoplasmático rugoso, cisternas e vesículas do aparelho de Golgi, além de numerosas mitocôndrias. As características citoplasmáticas das células secretoras dos genótipos EE e EF mostraram-se diferentes daquelas observadas no genótipo AA, por apresentarem a luz do retículo endoplasmático rugoso e das cisternas do Golgi muito dilatadas. A ultra-estrutura das células secretoras do genótipo AF mostrou um padrão intermediário de dilatação da luz do retículo endoplasmático rugoso e das cisternas e vesículas do aparelho de Golgi.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Amélia Cristina Mendes de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2007. **Protein and energy metabolism and study of mammary parenchyma morphology in dairy goats with different α_{s1} -casein genotypes.** Adviser: Marcelo Teixeira Rodrigues. Co-Advisers: Adilson Ariza Zacaro and Maria Amélia Menck Soares.

Taking into consideration the hypothesis that variations in genotypes for α_{s1} -casein in milk may interfere on both efficiency of use and partitioning of nutrients for dairy goats and as a consequence on its nutritional requirements, a series of three experiments was conducted to evaluate animal performance, the energy and nitrogen efficiency and partitioning to milk synthesis, milk composition and mammary gland morphology. In the first experiment both animal performance and the efficiency of energy and nitrogen use for milk synthesis were evaluated by using goats of different genotypes named AA, EE, EF and AF for the α_{s1} -casein and fed diets of 14 and 17% CP. A digestibility assay and total collection of urine and milk was performed to determine use and partitioning of energy and protein. No significant effect ($P>0.05$) was observed for the interaction level of protein and genotype to all variables tested. Higher values of intake of dry matter, of available energy and also for energy balance were observed for animals carrying the AA genotype as compared to those carrying the AF genotype. Efficiency of use of available energy was similar among genotypes averaging 66.21 and 30.66% for net and gross efficiency for ME respectively. Nitrogen balance presented superior for goats fed diets with 17% CP whereas higher efficiency of use of

nitrogen was obtained for those receiving rations with 14% CP. The higher values of nitrogen excreted in urine, expressed as exogenous urinary nitrogen (ExoUN), of the plasma urea and lower net efficiency for using metabolizable (MP) observed for animals fed diets with 17% CP leads to suggest that the amount of protein used was over protein requirement for lactation. A second experiment was conducted to evaluate the effect of genotype for α_{s1} -casein on milk composition and profile of both casein and fatty acids by using goats of different genotypes named AA, EE, EF and AF for the α_{s1} -casein when fed diets with 14 and 17% CP. Milk composition was determined by using infrared spectroscopy, the casein profile by liquid chromatography and fatty acids profile by gas chromatography. No significant effect ($P>0.05$) was observed as the interaction level of protein and genotype was tested for the independent variables studied. The relative concentrations of α_{s1} -casein in animals carrying both homozygous alleles of high expression (AA) and for those heterozygous for high and low expression (AF) were of 24.88 and 21.80%, respectively, and considered higher as compared to EE and EF genotypes. *Percentage* of milk protein for animals of the AA (31.68 g/L) genotype was higher as compared to those with the EF (29.01 g/L) genotype but similar to goats carrying the EE (29.94 g/L) and AF (30.24 g/L) genotype. Concentration of true protein was higher for the AA animals as compared to those carrying the EE and EF genotype by 5.5 and 9.3%, respectively. For animals of homozygous genotypes, named AA and EE, levels of α_{s1} -casein expression were 6.10 and 3.60 g/L of milk, respectively, which leads to assume that the expression per allele in both cases were of 3.05 and 1.8 g/L of milk. Goats of AA genotype presented the lower levels of k-casein and that fact associated with a higher concentration of α_{s1} -casein may be related to the higher industrial output attributed to the milk from animals of that genotype. No difference was found as levels of protein on diet were compared for milk protein *percentage* and total casein concentration. Milk fatty acids profile, the ratio of saturated and unsaturated fatty acids concentration and mono and polyunsaturated fatty acids were similar as both main effects of genotypes and level of protein were studied but concentration of C6:0, C8:0, and C17:0 were higher for animals fed diet with 14% CP. Taking into consideration the hypothesis that genotypes for α_{s1} -casein in milk may interfere on cell organelles involved with milk synthesis in goats a third experiment objected to evaluate and describe mammary parenchyma morphology in lactating goats of different genotypes named AA, EE, EF and AF for the α_{s1} -casein when fed diets with

14 and 17% CP. Evaluation was carried out by tissue biopsy and histological analysis and ultra structure (electronic and transmission microscopy). A unique general pattern of organization was presented in both histological and ultra structural analysis of parenchyma. Despite the genotype for α_{s1} -casein, parenchyma was comprised of alveolar lobules, compounded by columnar epithelial secretory cells, undifferentiated cells, and mioepithelial cells. For the interlobular space it was observed the presence of conjunctive stroma, blood vessels of specialized cells such as plasmocytes and mastocytes and in the alveolar lumen the presence of lacteal secretion, desquamation cells and polymorphonuclears. The undifferentiated cells into the mammary gland parenchyma presented pleomorphism concerning size and shape, little cytological differentiation of cytoplasm and the presence of polymorphic nucleus, with different pattern of condensation of chromatin, which tended to be more decondensed' or euchromatic for larger cells and more condensed and heterochromatic for the smaller ones. The ultra structure of epithelial cells of mammary gland in animals carrying the genotype AA revealed cytoplasm comprised mostly by roughly endoplasmic reticulum and typical vesicles of Golgi apparatus in addition of numerous mitochondria. Conversely, cells in animals carrying the genotype EE, and EF presented dilations of vesicles of endoplasmic reticulum and Golgi cisterns. The ultra structure of epithelial cells of mammary gland in animals of goats carrying the genotype AF showed a pattern of vesicles fairly expanded, intermediary of those presented in both AA and EE/EF genotypes.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O leite de cabra constitui importante fonte de nutrientes para humanos quando usado como parte de uma dieta balanceada. O crescimento na demanda global por leite de cabra está potencialmente relacionado às suas propriedades dietéticas, ao aumento na renda familiar em países em desenvolvimento e ao reconhecimento de suas propriedades terapêuticas (FAO, 2001; DUBEUF *et al.*, 2004).

A utilização do leite de cabra como alimento funcional baseia-se, principalmente, na sua composição química, particularmente rica em macrominerais e ácidos graxos de cadeia curta e média e, pelo menor conteúdo de α_{s1} -caseína relativo ao leite de vaca. Também possuem impacto positivo sobre a melhor tolerabilidade e digestibilidade deste produto, a maior proporção de glóbulos de gordura de menor diâmetro e as características próprias de agregação das micelas de caseína que tendem a formar coágulos mais macios (ALONSO *et al.*, 1999; ATTAIE e RICHTER, 2000).

A α_{s1} -caseína é a principal proteína do leite de vaca, representando 36-40% do total de caseínas, enquanto que, no leite de cabra, seu conteúdo é inferior, podendo variar de zero a 25% do total de caseínas (MARTIN, 1997; BRAMANTI *et al.*, 2003). Menores proporções de α_{s1} -caseína no leite de cabra apresentam influência, já comprovada, sobre a consistência do coágulo de queijo, a diminuição do rendimento industrial, o aumento das características de lipólise espontânea e a menor alergenicidade deste produto.

As proteínas do leite de cabra são similares às do leite de vaca quanto à classificação, mas a proporção relativa destas difere entre estas espécies e, dentro das populações caprinas podem apresentar expressivas variações em função de polimorfismos genéticos, principalmente, o relacionado ao locus da α_{s1} -caseína, que tem sido intensivamente estudado e relatado nas últimas décadas (BOULANGER *et al.*, 1984; GROSCLAUDE *et al.*, 1987; MAHÉ e GROSCLAUDE, 1989; LEROUX *et al.*, 1990; DAVID e DEUTCH, 1992; MARTIN, 1993; PEREZ *et al.*, 1994; MARTIN, 1997; MARTIN *et al.*, 1999; RAMUNNO *et al.*, 2000; BEVILACQUA *et al.*, 2002; COZENZA *et al.*, 2003; RAMUNNO *et al.*, 2004). Martin (2000) e Neveu *et al.* (2002) relataram a ocorrência de 18 alelos no locus da α_{s1} -caseína.

Nos diferentes genótipos para α_{s1} -caseína são observadas diferenças nos teores de proteínas totais, proteínas do soro e na proporção de caseínas (MORGAN *et al.*, 2001). A concentração de α_{s1} -caseína pode variar de 0 a 3,6 g/L de leite/alelo entre os genótipos, ou seja, de 0 a 7,2 g/L de leite, sendo que, nos genótipos de maior produção de α_{s1} -caseína, têm-se observado *porcentuais* de proteínas totais e gorduras no leite também superiores (CHILLIARD *et al.*, 2003).

Para a α_{s1} -caseína presente no leite da espécie caprina tem sido relatada a ocorrência de sete classes destas proteínas (A, B, C, D, E, F e G) e quatro níveis de expressão. O nível de alta expressão, associado aos alelos A, B₁, B₂, B₃, B₄, C, L e H, apresenta-se com 3,6-4,2 g de α_{s1} -caseína/litro de leite/alelo, o nível de expressão intermediária (alelos E e I) com 1,6 g/litro de leite/alelo, o de baixa expressão (alelos D, F e G) com 0,6 g/litro de leite/alelo (RAMUNNO *et al.*, 2000; NEVEU *et al.*, 2002) e o nível nulo (alelo O ou N) sem expressão de α_{s1} -caseína (GROSCLAUDE *et al.*, 1994; MARTIN *et al.*, 1999; COZENZA *et al.*, 2003). O grau de expressão dos demais alelos não foi encontrado na literatura consultada.

As variantes protéicas da α_{s1} -caseína A, B, C e E, contendo 199 resíduos de aminoácidos, diferenciam-se por substituições de aminoácidos, enquanto que as variantes D e F apresentam alterações estruturais mais profundas, envolvendo a deleção interna de, respectivamente, 11 e 37 resíduos de aminoácidos (BRIGNON *et al.*, 1989; BRIGNON *et al.*, 1990; MARTIN, 1993, MARTIN *et al.*, 1999) e a variante G, deleção de 13 aminoácidos (14 ao 26) (MARTIN e LEROUX, 1994, citados por MARTIN *et al.*, 1999).

Os alelos de alta produção de α_{s1} -caseína possuem o gene “completo”, sem mutações graves que comprometam sua funcionalidade, diferindo um do outro apenas por substituição de nucleotídeos que determinam alterações de aminoácidos na proteína, que, aparentemente, não causam diferença na funcionalidade da molécula (MARTIN *et al.*, 1999; BEVILACQUA *et al.*, 2002).

O alelo mutante E caracteriza-se pela inserção de uma seqüência de 457pb no éxon 19, correspondendo a um longo elemento repetitivo (LINE), que determina uma diminuição no conteúdo de RNAm que tem sido associada tanto a redução na taxa de transcrição quanto a uma possível diminuição na estabilidade dos RNAm transcritos (PÉREZ *et al.*, 1994; MARTIN *et al.*, 1999).

As principais variações mutacionais observadas no alelo F são a deleção de uma base nitrogenada (citosina) no éxon 9 e duas inserções uma de 11 e outra de 3 pb no íntron 9. A deleção do referido nucleotídeo pode determinar o aparecimento de um prematuro códon de terminação no transcrito e, as inserções, alterações no mecanismo de *splicing* durante o processamento do RNAm (LEROUX *et al.*, 1990; LEROUX *et al.*, 1992). Nove diferentes tipos de RNAm, transcritos a partir de clones do alelo F, foram isolados e caracterizados, sendo nestes, frequentemente observada a eliminação dos exons 9, 10 e 11 durante o processo de maturação dos transcritos primários além de outras alterações (LEROUX *et al.*, 1992; RAMUNO *et al.*, 2005).

Análises estruturais das proteínas e das seqüências de nucleotídeos têm permitido o entendimento das bases moleculares deste polimorfismo e sua utilização para fins de melhoramento genético (GROSCLAUDE *et al.*, 1987; MARTIN *et al.*, 1999). A seleção baseada na variação genética do gene da α_{s1} -caseína tem sido utilizada em programas de seleção genética na França, sendo este país considerado o maior produtor de queijos de cabra do mundo.

Neste contexto, considera-se relevante a pioneira parceria firmada entre a Universidade Federal de Viçosa e a Unioeste-PR para o desenvolvimento de metodologias de análises genéticas visando à identificação dos alelos envolvidos no polimorfismo do gene da α_{s1} -caseína em caprinos no Brasil. As informações genéticas advindas de levantamentos das freqüências alélicas do gene da α_{s1} -caseína nos rebanhos leiteiros nacionais, inclusive os compostos por animais de raças nativas presentes na região nordeste do Brasil possibilitarão a implantação de programas de seleção genética,

com objetivos de aumentar ou diminuir o teor de α_{s1} -caseína do leite de cabra, dependendo da finalidade de mercado que este possuir.

Os teores de proteínas e gorduras do leite apresentam grande relevância tanto do ponto de vista nutricional quanto industrial e, portanto, são alvos de pesquisas envolvendo aspectos zootécnicos relacionados a fatores nutricionais, ambientais e genéticos que determinam variações nas suas concentrações no leite. Sabendo-se que os teores de proteínas e gorduras no leite de cabras podem diferir entre os genótipos para α_{s1} -caseína, estas variações podem gerar erros na análise de efeitos nutricionais sobre a composição do leite, quando os animais não são geneticamente identificados e separados. Ademais, pode haver diferença na eficiência de utilização de energia para a síntese de leite, entre genótipos para α_{s1} -caseína, a exemplo, do observado por Schmidely *et al.* (2002) com relação à eficiência de utilização de nitrogênio, que se apresentou superior em cabras com genótipos de alta expressão de α_{s1} -caseína. O conhecimento de diferenças na eficiência de utilização de energia e nitrogênio entre diferentes genótipos possibilita o ajuste das exigências nutricionais visando otimizar a utilização de nutrientes dietéticos para a produção de leite.

Um outro aspecto a ser destacado é que o perfil de ácidos graxos característico do leite de cabra, particularmente rico em ácidos graxos de cadeia curta e média, eleva este produto à condição de alimento funcional, devido, principalmente a sua maior digestibilidade. Apesar de a variação no teor de gordura do leite de cabra em função dos genótipos da α_{s1} -caseína ser conhecida, não há relatos se esta é acompanhada por mudança no perfil de ácidos graxos do leite. Sendo assim, a comparação do perfil de ácidos graxos entre animais de diferentes genótipos para α_{s1} -caseína poderá constituir importante ferramenta para se inferir sobre a influência destes sobre a digestibilidade do produto lácteo caprino e seu papel como alimento funcional.

Alterações morfológicas nas células do tecido mamário têm sido relatadas nos genótipos de baixa expressão de α_{s1} -caseína, sendo estas sugestivas de disfunção no mecanismo de secreção de proteínas e lipídeos no leite. Dados morfológicos de células epiteliais mamárias indicam que a agregação das caseínas, para a formação das micelas, inicia-se dentro das vesículas do complexo de Golgi, após a fosforilação das mesmas, e é dependente da concentração de α_{s1} -caseína (CHANAT *et al.*, 1999). A análise estrutural por meio de microscopia convencional e eletrônica de transmissão do tecido mamário de cabras em lactação tem por objetivo elucidar se os menores teores de

proteínas e gorduras, nos genótipos de menor expressão de α_{s1} -caseína encontram-se associadas a diferenças na ultra-estrutura do parênquima mamário.

A condução experimental deste estudo teve por objetivo verificar a interferência de quatro genótipos para α_{s1} -caseína (AA, EE, EF e AF) sobre a eficiência de utilização de proteína e energia da dieta, bem como sobre a produção e composição do leite, perfil de ácidos graxos e ultra-estrutura do tecido mamário de cabras em lactação. Dois níveis de proteína bruta foram utilizados nas dietas experimentais com o objetivo de avaliar se as diferenças genéticas existentes quanto ao gene da α_{s1} -caseína e a adoção de concentrações distintas de proteína na dieta atuam de maneira interativa ou independente sobre a resposta animal e, se maiores concentrações de proteína na dieta poderiam ser aproveitadas, com maior eficiência, por animais de alta expressão de α_{s1} -caseína. Para a determinação da eficiência de utilização de energia e proteína utilizou-se metodologia de ensaio de digestibilidade com coleta total de fezes, urina e leite. A composição do leite foi determinada por análises de proteína bruta, gordura, lactose por meio de espectrofotometria por radiação infravermelha, perfil de caseínas por cromatografia líquida e perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa. As alterações morfológicas das células epiteliais da glândula mamária nos diferentes genótipos para α_{s1} -caseína foram elucidadas através de análises de microscopia eletrônica de transmissão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A produção animal é definida pela interação entre o genótipo e as condições ambientais. A seleção genética e o uso de práticas de manejo adequadas são ferramentas que possibilitam melhoria no desempenho animal e maior grau de especialização na atividade. O sucesso no aumento da produtividade é dependente da utilização racional destes dois componentes, genética e ambiente (PIERRE *et al.*, 1996).

No início da década de 1970, um novo enfoque foi dado ao estudo dos genes. Com o surgimento de novas técnicas de análise genética, tornou-se possível manipular o DNA, alterar e seqüenciar os genes e introduzi-los em outros organismos. A manipulação do DNA vem sendo utilizada em várias áreas, tanto na humana quanto nas áreas animal, vegetal e de microorganismos.

Atualmente destaca-se o aumento da utilização de técnicas que utilizam marcadores moleculares para detecção de polimorfismos no DNA em pesquisas genéticas com animais (VIGNAL *et al.*, 2002).

A seleção genética para produção de leite desencadeou vários estudos com os genes das proteínas do leite. As relações diretas, entre os variantes alélicos e as diferenças nos conteúdos de proteínas e nas propriedades físico-químicas do leite, podem ser utilizadas como ferramentas para a melhoria da produção dos rebanhos. Desde o descobrimento do polimorfismo genético da β -lactoglobulina por Aschaffenburg e Drewry (1955), outras variantes protéicas têm sido descobertas para a maioria das proteínas lácteas, levando, conseqüentemente, ao aumento dos estudos nessa área (BRIGNON *et al.*, 1989; BARBIERI *et al.*, 1995; MARTIN, 1993).

As proteínas do leite são classificadas em duas frações, a micelar que compreende as caseínas α_{s1} , α_{s2} , β , e κ que são predominantes no leite da maioria das espécies de mamíferos e a das proteínas solúveis, que compreendem principalmente as α -lactoalbuminas, β -lactoglobulinas, imunoglobulinas, lactoferrinas, lactoperoxidases, e outras enzimas (BRAMANTI *et al.*, 2003).

As caseínas constituem um grupo heterogêneo de fosfoproteínas sintetizadas na glândula mamária em resposta a hormônios lactogênicos e outros estímulos e secretadas como grandes agregados coloidais, na forma de complexos estáveis com fosfatos de cálcio formando as micelas (AMBROSOLI *et al.*, 1988). O conhecimento da composição de caseínas micelares mostra-se importante pela possível interferência destas no tamanho das micelas, nos processos de agregação, na ação de enzimas proteolíticas e no processamento industrial do leite (BRAMANTI *et al.*, 2003). Sua importância e abundância para a indústria leiteira têm feito dela um alvo para estudos bioquímicos, tornando-a talvez, a proteína mais amplamente estudada dentre todas as proteínas alimentares.

As caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β e κ) são as principais proteínas presentes no leite de espécies ruminantes, representando cerca de 80 % do total de proteínas, sendo codificadas, respectivamente, pelos genes *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* e *CSN3* localizados em *cluster* no cromossomo 6 caprino e bovino (RIJNKELS, 2002; COZENZA *et al.*, 2003; SZYMANOWSKA *et al.*, 2003). As caseínas α_{s1} , α_{s2} e β são sensíveis à precipitação com cálcio e possuem similaridades no peso molecular (\cong 24 kDa), na localização dos sítios de fosforilação, na região reguladora flanqueadora 5' do gene e na estrutura gênica representada por pequenos éxons e baixa relação éxons/introns (RIJNKELS, 2002). Sugere-se que a estreita relação de proximidade e similaridade destes genes possa influenciar a herança comum destes, acompanhada apenas por pequenos fenômenos de recombinação (SZYMANOWSKA *et al.*, 2003).

As proteínas do leite de cabra são similares às do leite de vaca quanto à classificação, mas, o conteúdo e a proporção destas diferem entre estas espécies e, dentro das populações caprinas, podem apresentar variações em função do polimorfismo genético principalmente o relacionado ao locus da α_{s1} -caseína. A α_{s1} -caseína representa no leite de cabra, em média, 10 % (0-25 %) do total de caseínas, enquanto que no leite de vaca esta se apresenta como a principal caseína e constitui 38 % do total de caseínas (MARTIN, 1997).

Na espécie caprina, o intenso e complexo polimorfismo genético presente no locus do gene da α_{s1} -caseína tem sido intensivamente estudado e relatado nas últimas décadas (BOULANGER *et al.*, 1984; GROSCLAUDE *et al.*, 1987; MAHÉ e GROSCLAUDE, 1989; LEROUX *et al.*, 1990; DAVID e DEUTCH, 1992; MARTIN, 1993; MARTIN *et al.*, 1999; RAMUNNO *et al.*, 2000; BEVILACQUA *et al.*, 2002; COZENZA *et al.*, 2003; RAMUNNO *et al.*, 2004). Neste locus, já foram identificados 18 alelos associados a diferenças quantitativas e qualitativas no perfil de proteínas do leite (NEVEU *et al.*, 2002).

Análises estruturais das proteínas e das seqüências de nucleotídeos têm permitido o entendimento das bases moleculares deste polimorfismo e a especulação de que isto pode ser explorado para fins de melhoramento genético (GROSCLAUDE *et al.*, 1987; MARTIN *et al.*, 1999).

Métodos analíticos, como a cromatografia líquida de alta eficiência e fase reversa (RP-HPLC) e eletroforese em gel de poliacrilamida têm sido utilizados, para distinguir e caracterizar as múltiplas classes de proteínas associadas a esta variabilidade genética (MARTIN *et al.*, 1999). Até o presente, considera-se a ocorrência sete classes de proteínas (A, B, C, D, E, F e G) e quatro níveis de expressão da α_{s1} -caseína no leite da espécie caprina. O nível de alta expressão, associado aos alelos A, B, C, L e H, apresenta-se com 3,6-4,2 g de α_{s1} -caseína/litro de leite/alelo, o nível de expressão intermediária (alelos E e I) com 1,6 g/litro/alelo, o de baixa expressão (alelos D, F e G) com 0,6 g/litro de leite/alelo (MAHÉ e GROSCLAUDE, 1989; RAMUNNO *et al.*, 2000; NEVEU *et al.*, 2002) e o nível nulo (alelo O), não possui expressão de α_{s1} -caseína (GROSCLAUDE *et al.*, 1994; MARTIN *et al.*, 1999; COZENZA *et al.*, 2003). O grau de expressão dos demais alelos não foi encontrado na literatura consultada.

A determinação analítica das frações, α_{s1} , α_{s2} , β e κ da caseína por meio de cromatografia líquida de fase reversa de alta definição (RP-HPLC) tem apresentado maior eficiência quando comparada à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (JAUBERT e MARTIN, 1992; TRUJILLO *et al.*, 2000; MOATSOU *et al.*, 2004).

As variantes protéicas da α_{s1} -caseína A, B, C e E, contendo 199 resíduos de aminoácidos, diferenciam-se por simples substituições de aminoácidos, enquanto que as variantes D e F apresentam alterações estruturais mais profundas, envolvendo a deleção interna de respectivamente 11 e 37 resíduos de aminoácidos (BRIGNON *et al.*, 1990;

MARTIN, 1993) e a variante G, deleção de 13 aminoácidos (14 ao 26) (MARTIN e LEROUX, 1994, citados por MARTIN *et al.*, 1999).

No Brasil, os genótipos e as frequências de alguns alelos (A, B, F e nulo) para α_{s1} -caseína foram inferidos com base nas proteínas do leite, pela técnica de eletroforese em gel descontínuo de poliacrilamida (LA GIOIA *et al.*, 2000); contudo, este método permite analisar somente as fêmeas em produção e tem ainda a restrição de separar apenas as proteínas com diferentes cargas líquidas.

O polimorfismo genético das proteínas resulta de mutações envolvendo substituição, inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos e pode ser detectado por análises de DNA para identificação de pontos de mutações ou fenômenos de rearranjos (MOIOLI *et al.*, 1998; MARTIN, 1993). Estas alterações podem ocorrer em regiões codificadoras ou reguladoras do gene da α_{s1} -caseína.

Os conteúdos de proteínas e lipídeos do leite de cabra constituem fatores determinantes da qualidade deste e de seus derivados. A diversidade genética das caseínas no leite da espécie caprina associada à existência de uma variabilidade quantitativa das frações de proteínas e gorduras oferece uma oportunidade para a seleção com fins de melhoria das características físico-químicas, organolépticas, nutricionais, terapêuticas, tecnológicas e imunológicas do leite de cabra.

O conteúdo e a proporção das caseínas do leite apresentam importante relação com as características tecnológicas dos produtos lácteos, por serem estas as únicas proteínas coaguláveis do leite. A produção de queijo baseia-se na liberação do domínio polar das κ -caseínas e conseqüente exposição das caseínas sensíveis ao cálcio, aumentando assim a superfície hidrofóbica das micelas, o que favorece a coagulação das mesmas (MOIOLI *et al.*, 1998).

Nos diferentes genótipos para α_{s1} -caseína são observadas diferenças nos teores de proteínas totais, caseínas totais, proteínas do soro e na proporção de caseínas (MORGAN *et al.*, 2001). Ambrosoli *et al.* (1988) observaram que o leite de cabras Alpinas e Saanen com genótipos de alta expressão de α_{s1} -caseína foi associado a maiores teores de sólidos totais, proteína totais, caseínas e fósforo.

Variações nos teores de proteína e gorduras do leite de cabra, nos diferentes genótipos para α_{s1} -caseína, podem afetar características tecnológicas do leite, tais como velocidade de coagulação, rendimento, sabor e consistência dos produtos, sendo necessário que tais parâmetros sejam acompanhados ao longo da lactação. Em cabras

observa-se após o pico de produção um processo de involução gradual da glândula mamária, caracterizado pela diminuição do número de células secretoras e queda na produção de leite (WILDE e KNIGHT, 1989) e de forma oposta, a concentração de caseínas apresenta-se em declínio até o pico da lactação onde atingem valores mínimos e a partir deste ponto tendem a aumentar (BROWN *et al.*, 1995).

As proporções das caseínas individuais também apresentam alterações ao longo da lactação com diminuição das caseínas α e β e aumento das caseínas κ e γ (resultantes da degradação proteolítica principalmente das β caseínas). Este fato é consistente com o aumento da degradação proteolítica pela plasmina, uma proteinase alcalina, e seu precursor inativo o plasminogênio que se encontram intimamente ligados às micelas de caseína no leite (POLITIS *et al.*, 1992) e que estão associados *in vivo* com a diminuição das concentrações relativas de α e β caseínas em bovinos (POLITIS *et al.*, 1990) e aumento das γ caseínas.

A atividade do plasminogênio no leite de cabra apresenta-se significativamente inferior à observada nos leites de vacas e ovelhas, mas esta é compensada pela elevada atividade do ativador de plasminogênio. No estágio final da lactação, a elevada atividade de plasmina e do ativador de plasminogênio no leite de cabra está negativamente relacionada com as propriedades de coagulação devido à degradação da caseína (FANTUZ *et al.*, 2001).

Remeuf (1993) ao comparar o leite de cabras homozigotas AA, EE e FF para o gene da α_{s1} -caseína não observou diferenças na estabilidade dos leites dos diferentes genótipos ao calor, mas, observaram-se diferenças significativas nos teores de gordura, nitrogênio total, proteínas e caseínas do leite sendo estes decrescentes na ordem dos genótipos AA, EE e FF. As micelas de caseína apresentaram diâmetros crescentes na ordem dos genótipos AA (221 nm), EE (264 nm) e FF (268 nm). As micelas de caseínas no genótipo AA além de menores apresentaram menor teor de minerais (mg de cálcio/mg de caseína) que as micelas dos genótipos EE e FF e melhores características de coagulação.

No leite do genótipo AA para α_{s1} -caseína, os parâmetros de coagulação de firmeza máxima do gel e a velocidade de formação do gel apresentam-se superiores aos observadas para o leite do genótipo FF (REMEUF, 1993). Também foram observados maiores teores de sólidos totais nos queijos, rendimento e recuperação de gordura (PIRISI *et al.*, 1994).

Queijos produzidos a partir de leites com maiores teores de α_{s1} -caseína (genótipo AA) foram associados a sabores característicos dos produtos lácteos caprinos menos intensos e menos picantes, texturas de coágulos mais firmes e macias que os produzidos com leite de genótipos de baixos teores de α_{s1} -caseína (genótipo FF) (HEIL e DUMONT, 1993).

A pesquisa da frequência alélica, no locus do gene da α_{s1} -caseína, em rebanhos caprinos das raças Saanen e Alpina, demonstrou a predominância dos alelos de expressão intermediária E (40%) e baixa F (40%), enquanto que o alelo A de alta expressão apresentou-se na frequência de 10% (MARTIN, 1993). Grosclaude *et al.* (1987) também observaram, em rebanhos caprinos franceses, predominância dos alelos de expressão intermediária e baixa, sendo a proporção dos alelos E e F de 34 e 41% na raça Alpina e 41 e 43% na raça Saanen, respectivamente.

Diferenças entre a frequência de alelos no locus da α_{s1} -caseína entre raças têm sido descritas. Jordana *et al.* (1996) relataram a frequência dos alelos em algumas raças caprinas na Espanha e encontraram predominância do alelo E (intermediário) nas raças Murciana-Granadina, Malaguenha e Payoya (59%, 65%, e 76%, respectivamente). Na raça Canária, observou-se elevada frequência dos alelos A e B (60%), de alta expressão de α_{s1} -caseína. Clark e Sherbon (2000) observaram diferenças entre os teores de α_{s1} -caseínas entre raças, sendo estes superiores nas raças Saanen, Nubiana e La Mancha, em relação às raças Alpinas, Toggenburg, Oberhasli.

Efeitos do polimorfismo da α_{s1} -caseína sobre a produção de leite de cabras Alpinas foram observados por Barbieri *et al.* (1995), onde o genótipo AA apresentou produção significativamente inferior aos genótipos AE, AF, EE e EF. Mahé *et al.* (1993) não observaram efeito dos genótipos para α_{s1} -caseína sobre a produção de leite das cabras.

Análises morfológicas, em células epiteliais do tecido mamário, de cabras homozigotas para os alelos E, F e nulo para α_{s1} -caseína, revelaram aumentos relativos de volume no retículo endoplasmático rugoso e vesículas do complexo de Golgi em relação aos dos genótipos de alta expressão para α_{s1} -caseína (AA), possivelmente, devido ao acúmulo das demais caseínas produzidas. Mediante os dados morfológicos sugeriu-se uma disfunção no mecanismo de secreção das caseínas totais dependente da participação da α_{s1} -caseína, já que o mesmo acúmulo não foi observado em cabras com genótipos nulos para β -caseína (CHANAT *et al.*, 1999). A conclusão de que a α_{s1} -

caseína interfere com o mecanismo de transporte das demais caseínas precisa de confirmação, pois Morgan *et al.* (2001), comparando a composição do leite de cabras homozigotas AA e FF, não observaram diferenças significativas nas quantidades absolutas das caseínas α_{s2} , β e κ (Tabela 1), sendo as diferenças observadas nas proporções relativas explicadas pela menor concentração de α_{s1} -caseína no leite do genótipo FF.

Tabela 1 – Composição protéica do leite de cabra dos genótipos AA e FF para α_{s1} caseína

	Leite do Genótipo AA	Leite do Genótipo FF
Caseína (g/kg)*	27	20,9
α_{s1} -caseína	25,9% (6,99 g)	2,2% (0,46 g)
α_{s2} -caseína	14,6% (3,94 g)	16,6% (3,47 g)
β -caseína	46,8% (12,64 g)	63,2% (13,2 g)
κ -caseína	12,7% (3,43 g)	18% (3,76 g)

* gramas de caseína por quilograma de leite.

Fonte: Morgan *et al.* (2001).

Conforme revisado por Neveu *et al.* (2002), a possível interferência da α_{s1} -caseína no transporte de caseínas e lipídeos pelas células epiteliais mamárias, pode ser um dos fatores determinantes do mecanismo de secreção, por via apócrina, descrito no leite de cabra.

A associação de características morfológicas do tecido mamário ao perfil das caseínas no leite e à taxa de transcrição do gene da α_{s1} -caseína poderá fornecer informações adicionais sobre o mecanismo que determina a menor concentração de α_{s1} -caseína no leite e se este interfere ou não com a secreção das demais caseínas.

Variações no teor de gordura dos leites provenientes dos diferentes genótipos para α_{s1} -caseína também têm sido observadas, sendo superior no leite de cabras homozigotas para o genótipo AA (35 g/kg) do que no leite de cabras do genótipo FF (32 g/kg) (CHILLIARD *et al.*, 2003). O mecanismo determinante das menores concentrações de gordura no leite em genótipos de baixa expressão de α_{s1} -caseína tem sido objeto de estudos tanto por meio de microscopia eletrônica para verificar se há interferência na secreção destas (NEVEU *et al.*, 2002) quanto por análises da atividade de transcrição de enzimas que participam do metabolismo lipídico intracelular (LEROUX *et al.*, 2003; CHILLIARD *et al.*, 2006).

Apesar da variação do teor de gordura do leite de cabra em função dos genótipos da α_{s1} -caseína ser conhecida, não se têm relatos se esta é acompanhada por mudança no perfil de ácidos graxos do leite. Sendo assim, a comparação do perfil de ácidos graxos entre animais homozigotos para os diferentes genótipos da α_{s1} -caseína poderá constituir importante ferramenta para se inferir sobre a influência destes genótipos sobre a digestibilidade do produto lácteo caprino e seu papel como alimento funcional. A elevada digestibilidade da fração lipídica do leite de cabra observada em estudos realizados com crianças com síndromes de má absorção (HACHELAF *et al.*, 1993) e em ratos submetido à secção do segmento distal do intestino delgado para reproduzir esta síndrome (ALFÉREZ *et al.*, 2001) têm sido atribuída à presença de ácidos graxos de cadeia média (8-12 carbonos), cerca de duas vezes superior no leite de cabra do que no leite de vaca (BINDAL e WADHWA, 1993; TOUHAMI, 1997).

O perfil de ácidos graxos do leite de cabra difere do leite de vaca sugerindo diferenças nas vias de regulação da lipogênese na glândula mamária entre estas espécies, particularmente o processo de alongação dos ácidos graxos (CHILLIARD, 1997, CHILLIARD *et al.*, 2003). As peculiaridades da composição de ácidos graxos do leite de cabra e do seu sistema lipolítico possuem importante papel no desenvolvimento do sabor característico do leite (liberação de ácidos graxos de cadeia ramificada e média) ou na formação de sabores anormais, como o de ranço, pela excessiva liberação de ácido butírico, que podem interferir na aceitabilidade dos produtos lácteos caprinos (CHILLIARD *et al.*, 2003).

Sabendo-se que os teores de proteínas e gorduras no leite de cabras podem variar naturalmente entre os diferentes genótipos para α_{s1} -caseína estes podem gerar erros na análise dos efeitos nutricionais sobre a composição do leite quando os animais não são geneticamente identificados e separados. Ademais, pode haver diferença na eficiência de utilização de energia entre os diferentes genótipos para α_{s1} -caseína, a exemplo, do que se observa com a eficiência de utilização de nitrogênio, que se mostrou superior em cabras com genótipos AA de alta α_{s1} -caseína em relação a cabras FF (SCHIMIDELY *et al.*, 2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFÉREZ, M. J. M.; BARRIONUEVO, M.; ALIAGA, T. L.; SANZ-SAMPELAYO, M. R.; LISBONA, F.; ROBLES, J. C.; CAMPOS, M. S. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. **Journal of Dairy Research**, n. 68, p. 451-461, 2001.

ALONSO, L.; FONTECHA, J.; LOZADA, L.; FRAGA, M. J., JUÁREZ, M. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain and trans fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 82 n. 5, p. 878-884, 1999.

AMBROSOLI, R.; DiSTASIO, L., MAZZOCCO, P. Content of α_{s1} -casein and coagulation properties in goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 24-28, 1988.

ATTAIE, R.; RICHTER, R. L. Size distribution of fat globules in Goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 5, p. 940-944, 2000.

BARBIERI, M. E. ; MANFREDI, E., ELSEN, J. M. ; RICORDEAU, G. ; BOUILLON, J. ; GROSCLAUDE, F. ; MAHE, M.-F. ; BIBE, B. Influence du locus de la caseine α_{s1} sur les performances laitieres et les parametres genetiques des chevres de RACE Alpine. **Génétique Sélection Evolution**, v. 27, p. 437-450, 1995.

BEVILACQUA, C.; FERRANTI, P.; GARRO, G.; VELTRI, C.; LAGONIGRO, R.; LEROUX, C. E.; ADDEO, F.; PILLA, F.; CHIANESE, L.; MARTIN, P. Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new α_{s1} casein variant found in goat species. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 4, p. 1293-1303, 2002.

BINDAL, M. P.; WADHWA, B. K. Compositional differences between goat milk fat and that of cows and buffaloes. **Small Ruminant Research**, v. 12, p. 73-88, 1993.

- BOULANGER, A.; GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M. F. Polymorphisme des caséines α_{s1} et α_{s2} de la chèvre (*Capra hircus*). **Génétique Sélection Evolution**, v. 16, p. 157-175, 1984.
- BRAMANTI, E.; SORTINO, C.; ONOR, M.; BENI, F.; RASPI, G. Separation and determination of denatured alpha(s1)-, alpha(s2)-, beta- and kappa-caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses. **Journal of Chromatography A**, n. 994, v. 1-2, p. 59-74, 2003.
- BRIGNON, G.; MAHE, M.-F.; GROSCLAUDE, F. Sequence of caprine α_{s1} -CN and characterization of those of its genetic variants which are synthesized at a high level, α_{s1} -CN A, B and C. **Protein Sequences and Data Analysis**, v. 2, p. 181-188, 1989.
- BRIGNON, G.; MAHE, M. F.; RIBADEAU-DUMAS, B.; MERCIER, J.; GROSCLAUDE, F. Two of the three genetic-variants of goat alpha-s1-casein which are synthesized at a reduced level have an internal deletion possibly due to altered RNA splicing. **European Journal of Biochemistry**, v. 193, n. 1, p. 237-241, 1990.
- BROWN, J. R.; LAW, A. J. R.; KNIGHT, C. H. Changes in casein composition of goats' milk during the course of lactation: physiological inferences and technological implications. **Journal of Dairy Research**, v. 62, n., p. 431-439, 1995.
- CHANAT, E.; MARTIN, P.; OLLIVIER-BOUSQUET, M. As1 casein is required for the efficient transport of β and κ casein from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 3399-3412, 1999.
- CHILLIARD, Y. Caractéristiques biochimiques des lipides du lait de chèvre. Comparaison avec les laits de vache et humain. Actes du colloque: Le lait de chèvre, un atout pour la santé. **INRA Editions**, n. 81, p. 51-66, 1997.
- CHILLIARD, Y.; ROUEL, J.; LEROUX, C. Goat's alpha-s1 casein genotype influences its milk fatty acid composition and delta-9 desaturation ratios. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, p. 474-487, 2006.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 5, p. 1751-1770, 2003.
- CLARK, S.; SHERBON, J. W. Alpha $_{s1}$ -caseína, milk composition and coagulation properties of goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 38, p. 123-134, 2000.
- COZENZA, G.; ILLARIO, R.; RANDO, A.; Di GREGORIO, P.; MASINA, P.; RAMUNNO, L. Molecular characterization of the goat *CSN1S101* allele. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 237-240, 2003.

DAVID, V. A.; DEUTCH, A. H. Detection of bovine α_{s1} -casein genomic variants using the allele-specific polymerase chain reaction. **Animal Genetics**, v. 23, p. 425-429, 1992.

DUBEUF, J. P.; MORAND-FEHR, P.; RUBINO, R. Situation, changes and future of goat industry around the world. **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 165-173, 2004.

FANTUZ, F.; POLIDORI, F.; CHELI, F.; BALDI, A. Plasminogen activation system in goat milk and its relation with composition and coagulation properties. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 8, p. 1786-1790, 2001.

FAO, 2001. **Production Yearbook 1999**. Roma: Food e Agriculture Organization of United Nations, v. 53, n.156, p. 251, 1999.

GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M. F.; BRIGNON, G.; Di STASIO, L.; JEUNET, R. A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat α_{s1} -casein. **Génétique Sélection Evolution**, v.19, p.399-412, 1987.

GROSCLAUDE, F.; RICORDEOU, G.; MARTIN, P; REMEUF, F.; VASSAL, L.; BOULLON, J. Du gène au fromage: Le polymorphisme de la caséine α_{s1} caprine, ses effets son evolution. **INRA Prodctions Animales**, v. 7, p. 3-19, 1994.

HACHELAF, W.; BOUKHREDA, M.; BENBOUABDELLAH, M.; COQUIN, P; DESJEUX, J. F.; BOUDRAA, G.; TOUGHAMI, M. Digestibilité des graisses du lait de chèvre chez des enfants presentant une malnutrition d'origine digestive. Comparaison avec le lait de vache. **Le lait**, v. 73, n. 4-5, p. 593-599, 1993.

HEIL, F. ; DUMONT, J. P. Caractéristiques organoleptiques de fromages de chèvre fabriqués à partir de laits contenant des variants génétiques différents de la caséine α_{s1} . **Lait**, v. 73, p. 559-565, 1993.

JAUBERT, A.; MARTIN, P. Reverse-phase HPLC analysis of goat caseins. Identification of α_{s1} and α_{s2} genetic variants. **Lait**, v. 72, p. 235-247, 1992.

JORDANA, J.; AMILLS, M.; ANGULO, C.; SERRADILLA, J. M.; SÁNCHEZ, A. Gene frequencies of caprine α_{s1} -casein polymorphism in Spanish goat breeds. **Small Ruminant Research**, v. 20, p. 215-221, 1996.

LA GIOIA, D.; GOLÇALVES, H. C.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, P. R. R. **Identificação dos alelos e genótipos da α_{s1} caseína em caprinos leiteiros**. Anais da SBZ, 2002.

LEROUX, C.; MARTIN, P; MAHÉ, M. F.; LEVÉZIEL, H.; MERCIER, J. C. Restriction fragment length polymorphism identification of goat α_{s1} casein alleles: a potential tool in selection of individuals carrying alleles associated with a high level protein synthesis. **Animal Genetics**, v. 21, p. 341-351, 1990.

LEROUX, C.; MAZURE, N.; MARTIN, P. Mutations away from splice site recognition sequences might cis-modulate alternative splicing of goat α_{s1} -casein transcripts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 9, p. 6147-6157, 1992.

LEROUX, C.; LE PROVOST, F.; PETIT, E.; BERNARD, L.; CHILLIARD, Y.; MARTIN, P. Real-time RT-PCR and cDNA macroarray to study the impact of the genetic polymorphism at the α_{s1} -casein locus on the expression of genes in the goat mammary gland during lactation. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 43, p. 459-469, 2003.

MAHÉ, M. F.; GROSCLAUDE, F. α_{s1} Cn^D another allele associated with a decreased synthesis rate at the caprine α_{s1} casein locus. **Génétique Sélection Evolution**, v. 21, p. 127-129, 1989.

MAHÉ, M. F.; GROSCLAUDE, F. Polymorphism of β -casein in the Creole goat of Guadeloupe: evidence for a null allele. **Génétique Sélection Evolution**, v. 25, p. 403-408, 1993.

MARTIN, P. Polymorphism génétique des lactoprotéines caprines. **Lait**, n. 73, p. 511-532, 1993.

MARTIN, P. La composition protéique du lait de chèvre: ses particularités. Actes du colloque: Le lait de chèvre, un atout pour la santé. **INRA Editions**, n. 81, p. 27-50, 1997.

MARTIN, P.; OLLIVIER-BOUSQUET, M.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of caseins: a tool to investigate casein micelle organization. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 163-171, 1999.

MARTIN, P. Genetic polymorphism: a way to fathom the casein micelle. In: Recent advances on goat milk quality, raw material for cheese making. **Proceedings of the technical symposium held within the 7th International Conference on Goats**, 2000.

MOATSOU, G.; SALOMADA, M.; PANAGIOTOU, P.; ANIFANTAKIS, E. Casein fraction of bulk milks from different caprine breeds. **Food Chemistry**, v. 87, p. 75-81, 2004.

MOIOLI, B.; PILLA, F.; TRIPALDI, C. Detection of milk genetic polymorphism in order to improve dairy traits in sheep and goat: a review. **Small Ruminant Research**, v. 27, p. 185-195, 1998.

MORGAN, F.; MICAULT, S.; FAUQUANT, J. Combined effect of whey protein and α_{s1} -casein genotype on the heat stability of goat milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 2, p. 64-68, 2001.

NEVEU, C.; RIAUBLANC, A.; MIRANDA, G.; CHICH, J.F.; MARIN, P. Is the milk secretion process observed in the goat species rooted in the perturbation of the intracellular transport mechanism induced by defective alleles at the α_{s1} -CN locus? **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 163-172, 2002.

PÉREZ, M. J.; LEROUX, C.; BONASTRE, A. S.; MARTIN, P. Occurrence of a LINE sequence in the 3' UTR of the goat α_{s1} casein E encoding allele associated with reduced protein synthesis level. **Gene**, v. 147, p. 179-187, 1994

PIERRE, A.; LE QUERE, J.-L.; FAMELART, M.-H.; ROUSSEAU, F. **Cheeses from goat milks with or without α_{S1} -CN**. In: Production and Utilization of ewe and goat milk. Proc. of the IDF/Greek National Committee of IDF/CIRVAL Seminar. Crete, Greece. 1996, 322 pp.

PIRISI, A.; COLIN, O.; LAURENT, F.; SCHER, J.; PARMENTIER, M. Comparison of milk composition, cheese-making properties and textural characteristics of the cheese from two groups of goats with a high or low rate of α_{s1} -casein synthesis. **International Dairy Journal**, v. 4, p. 329-345, 1994.

POLITIS, I.; BLOCK, E.; TURNER, J. D. Effect of somatotropin on the plasmin system in the mammary gland: proposed mechanism of action for somatotropin on the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 6, p. 1494-1499, 1990.

RAMUNNO, L.; COZENZA, G.; PAPPALARDO, M.; PASTORE, N.; GALLO, D.; DI GREGORIO, P.; MASINA, P. Identification of the goat *CSN1S1F* allele by means of PCR-RFLP method. **Animal Genetics**, v. 31, p. 342-343, 2000.

RAMUNNO, L.; COZENZA, G.; RANDO, A.; ILLARIO, R.; GALLO, D.; Di BERNARDINO, D.; MASINA, P. The goat α_{s1} casein gene: gene structure and promoter analysis. **Gene**, v. 334, p. 105-111, 2004.

RAMUNNO, L.; COZENZA, G.; RANDO, A.; PAUCIULLO, A.; ILLARIO, R.; GALLO, D.; DI BERNARDINO, D.; MASINA, P. Comparative analysis of gene sequence of goat *CSN1S1 F* and *N* alleles and characterization of *CSN1S1* transcript variants in mammary gland. **Gene**, v. 345, n. 2, p. 289-299, 2005.

REMEUF, F. Influence du polymorphisme génétique de la caséine α_{s1} caprine sur les caractéristiques physico-chimiques et technologiques du lait. **Lait**, v. 73, p. 549-557, 1993.

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, 2002.

SCHMIDELY, P.; MESCHY, F.; TESSIER, J.; SAUVANT, D. Lactation response and nitrogen, calcium, phosphorus utilization of dairy goats differing by the genotype for α_{s1} -casein in milk, and fed diets varying in crude protein concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2399-2307, 2002.

SZYMANOWSKA, M.; STRZALKOWSKA, N.; SIADKOWSKA, E.; KRZYZEWSKI, J.; RYNIEWICZ, Z.; ZWIERZCHOWSKI, L. Effects of polymorphism at 5'-noncoding regions (promoters) of α_{s1} and α_{s2} casein genes on selected milk production traits in Polish Black and White cows. **Animal Science Papers and Reports**, v. 21, n. 2, p. 97-108, 2003.

TOUHAMI, M. Intérêt nutritionnel du lait de chèvre. Actes du colloque: Le lait de chèvre, un atout pour la santé. Paris. **INRA Editions**, n. 81, p. 93-100, 1997.

TRUJILLO, A. J.; CASALS, I.; GUAMIS, B. Analysis of major caprine milk proteins by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 1, p. 11-19, 2000.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Génétique Sélection Evolution**, v. 34, p. 275-305, 2002.

WILDE, C. J.; KNIGHT, C. H. Metabolic adaptations in mammary gland during the declining phase of lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 1679-1692, 1989.

Desempenho animal e eficiência de utilização de energia e nitrogênio em cabras lactantes com diferentes genótipos para α_{s1} -caseína

Resumo: Partindo-se da hipótese de que polimorfismo genético presente no locus do gene da α_{s1} -caseína do leite em caprinos poderia interferir sobre o desempenho e a eficiência de utilização e partição de energia e nitrogênio de cabras em lactação, desenvolveu-se este experimento com o objetivo de avaliar a influência dos genótipos AA, EE, EF e AF para α_{s1} -caseína e dos teores de proteína bruta (PB) na dieta (14 e 17%) sobre o desempenho e a eficiência de utilização de energia e nitrogênio para a síntese de leite, avaliados pelo consumo de matéria seca e de nutrientes, produção e composição de leite, ganho de peso e balanços de energia e de nitrogênio. Para todas as variáveis avaliadas neste experimento não foram observados efeitos significativos ($P > 0,05$) da interação entre os níveis de proteína da dieta e os genótipos para α_{s1} -caseína. Os animais pertencentes ao genótipo AA apresentaram valores de consumos de matéria seca, energia líquida, energia metabolizável e o balanço energético superiores aos dos animais do genótipo AF. Não houve diferenças nas eficiências de utilização da energia (bruta e líquida) entre os genótipos estudados. Os valores médios de eficiência de utilização de energia metabolizável líquida e bruta foram de respectivamente 66,21 e 30,66%. O balanço de nitrogênio apresentou-se superior nos animais que consumiram a dieta com 17% de PB enquanto que a maior eficiência de utilização do nitrogênio foi verificada naqueles que receberam a dieta com 14% de PB. A maior excreção de nitrogênio na urina (NUEx), os maiores teores de nitrogênio uréico no plasma e a menor eficiência líquida de utilização da proteína metabolizável nos animais consumindo a dieta com 17% de proteína bruta fornecem indícios de que este teor protéico encontra-se acima das exigências de proteína das cabras lactantes deste experimento. Numericamente, o teor médio de proteína bruta do leite dos animais do genótipo AA apresentou-se superior aos dos animais dos genótipos EE, EF e AF, em respectivamente 5,8, 9,2 e 4,8%. O teor de proteína verdadeira no leite dos animais AA apresentou comportamento similar, sendo superior em 5,5, 9,3 e 4,6% aos dos animais dos genótipos EE, EF e AF. Não foram observados efeitos significativos dos genótipos analisados e dos níveis de proteína na dieta sobre a produção diária de leite e os conteúdos de gordura, lactose, extrato seco total e de energia no leite. A produção diária de gordura no leite observada mostrou-se 21,5% maior nos animais do genótipo AA que nos do genótipo EE. Nas cabras em lactação analisadas neste experimento, os genótipos para α_{s1} -caseína do leite AA, EE, EF e FF não apresentaram efeitos significativos sobre os parâmetros de desempenho animal e de eficiência de utilização de energia e nitrogênio, sendo os efeitos principais evidenciados na composição de proteína bruta e verdadeira do leite.

Palavras-chave: caprinos, proteína da dieta, desempenho animal, composição de leite, caseínas.

Animal performance and efficiency of use of energy and protein in lactating goats carrying different genotypes for α_{s1} -casein

Abstract: Taking into consideration the hypothesis that genotypes for α_{s1} -casein in milk may interfere on efficiency of use and partitioning of nutrients for dairy goats the present experiment objected to evaluate animal performance and both energy and nitrogen efficiency and partitioning to milk synthesis by using forty dairy goats of different genotypes named AA, EE, EF and AF for the α_{s1} -casein and fed diets of 14 and 17% CP. No significant effect ($P > 0.05$) was observed for the interaction level of protein and genotype. Higher values of intake of dry matter and available energy and energy balance were observed for animals carrying the AA genotype as compared to those carrying the AF genotype. Efficiency of use of available energy was similar among genotypes averaging 66.21 and 30.66% for net and gross efficiency for ME. Nitrogen balance presented superior for goats fed diets with 17% CP whereas higher efficiency of use of nitrogen was obtained for those receiving rations with 14% CP. The higher values of nitrogen excreted in urine, expressed as exogenous urinary nitrogen (ExoUN), of plasma urea and lower net efficiency for using metabolizable protein (MP) observed for animals fed diets with 17% CP leads to suggest that the amount of protein used was over protein requirement for lactation. No difference was observed for *percentage* of milk protein and true milk protein as genotypes were compared. Nonetheless average values for protein in animal carrying AA genotype tended to be 5., 9.2, and 4.8% superior to those of EE, EF and AF genotypes. Similar tendency was observed for true protein with 5.5, 9.3, and 4.6% higher for the same sequence comparison. No difference was observed as milk yield, fat%, lactose %, total solid and milk gross energy were compared among genotypes and level of protein of diets. Milk fat yield was 21.5% higher for animals carrying genotype AA as compared to those with EE genotype. In the dairy goats analyzed in this experiment, the genotypes for α_{s1} -casein of the milk AA, EE, EF and FF didn't present significant effects on the parameters of animal performance and on efficiency for use of energy and nitrogen, and the main effects were evidenced in the composition of crude and true protein of the milk.

Key words: goats, protein, animal performance, milk composition and casein.

1. Introdução

A produção animal é definida pela interação entre o genótipo e as condições ambientais. A seleção genética e o uso de práticas de manejo adequadas são ferramentas que possibilitam melhorias no desempenho animal e maior grau de especialização na atividade. O sucesso no aumento da produtividade é dependente da utilização racional dessas duas forças, genética e ambiente (Pierre *et al.*, 1996). Dentre os fatores ambientais, destaca-se o programa nutricional, que segundo Morand-Fehr (2005), deve sempre considerar as características genéticas do rebanho caprino para o qual será destinado.

O reconhecimento dos principais genes relacionados aos efeitos sobre a produção e composição de proteínas do leite, mais precisamente, à composição de caseínas do leite, tem direcionado inúmeras pesquisas nesta área. Apesar dos genes das caseínas α_{s1} , α_{s2} , β e κ encontrarem-se ordenados em *cluster* no cromossomo 6 caprino, maior atenção tem sido dada ao gene da α_{s1} -caseína devido às evidências de efeitos deste sobre características produtivas (Barillet, 2007).

A espécie caprina apresenta intenso e complexo polimorfismo genético no locus do gene da α_{s1} -caseína, e tem sido intensivamente estudado e relatado nas últimas décadas (Boulanger *et al.*, 1984; Grosclaude *et al.*, 1987; Mahé e Grosclaude, 1989; Leroux *et al.*, 1990; David e Deutch, 1992; Martin, 1993; Martin *et al.*, 1999; Ramunno *et al.*, 2000; Bevilacqua *et al.*, 2002; Cozenza *et al.*, 2003; Ramunno *et al.*, 2004). Martin (2000) e Neveu *et al.* (2002) relataram a ocorrência de 18 alelos no locus da α_{s1} -caseína, os quais implicam em variações quantitativas e qualitativas no perfil de proteínas do leite.

Dentre os alelos já estudados são relatados quatro níveis de expressão da α_{s1} -caseína no leite da espécie caprina, designados como de alto, intermediário, baixo e nulo. O nível de alta expressão apresenta-se com variação de 3,6 a 4,2 g de α_{s1} -caseína /litro de leite/alelo, está associado aos alelos A, B, C, L e H; o nível de expressão intermediária (alelos E e I) com 1,6 g/litro/alelo; o de baixa expressão (alelos D, F e G) com 0,6 g/litro de leite/alelo (Mahé e Grosclaude, 1989; Ramunno *et al.*, 2000; Neveu *et al.*, 2002) e o nível nulo (alelo 0), não possui expressão de α_{s1} -caseína (Grosclaude *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1999; Cozenza *et al.*, 2003).

Nos diferentes genótipos para α_{s1} -caseína são observadas diferenças nos teores de proteínas totais, caseínas totais, proteínas do soro e na proporção de caseínas (Morgan *et al.*, 2001). Ambrosoli *et al.* (1988) observaram maiores teores de sólidos totais, proteínas totais, caseínas e fósforo no leite de cabras Alpinas e Saanen com genótipos de alta expressão de α_{s1} -caseína. Variações no teor de gordura dos leites provenientes dos diferentes genótipos para α_{s1} -caseína também têm sido observadas, sendo superior no leite de cabras homozigotas para o genótipo AA (35/kg) do que no leite de cabras do genótipo FF (32/kg) (Chilliard *et al.*, 2003).

Os conteúdos de proteínas e lipídeos do leite de cabra constituem fatores determinantes da qualidade deste e de seus derivados. A diversidade genética das caseínas no leite da espécie caprina associada à existência de uma variabilidade quantitativa das frações de proteínas e gorduras oferece uma oportunidade para a seleção com fins de melhoria das características físico-químicas, organolépticas, nutricionais, terapêuticas, tecnológicas e imunológicas do leite de cabra.

A análise dos efeitos nutricionais sobre a produção e a composição do leite de cabras realizada desconsiderando a influência dos genótipos para α_{s1} -caseína sobre os teores de proteínas e gorduras no leite de cabras pode incorrer em erros. Ademais, pode haver diferença na eficiência de utilização de energia entre os diferentes genótipos para α_{s1} -caseína, a exemplo, do que foi observado por Schimidely *et al.* (2002) com a eficiência de utilização de nitrogênio, a qual se mostrou superior em cabras com genótipos AA de alta produção de α_{s1} -caseína em relação a cabras com genótipo FF.

Especula-se, portanto, se as diferenças genéticas existentes quanto ao gene da α_{s1} -caseína e a adoção de teores distintos de proteína na dieta atuam de maneira interativa ou independente sobre a resposta animal e, se maiores concentrações de proteína na dieta poderiam ser aproveitadas, com maior eficiência, por animais de alta expressão de α_{s1} -caseína.

Desta forma, objetivou-se avaliar o desempenho e as eficiências de utilização de energia e do nitrogênio para a síntese de leite, em cabras com níveis de expressão para a produção de α_{s1} -caseína distintos e submetidas a diferentes teores de proteína bruta na dieta.

2. Material e Métodos

2.1. Animais, local e delineamento experimental

Por intermédio de uma parceria entre a Universidade Federal de Viçosa e a Unioeste-PR, as cabras lactantes utilizadas neste experimento foram previamente selecionadas quanto aos genótipos para α_{s1} -caseína, a saber: homozigotos para alta expressão AA (n = 8), homozigotos para expressão intermediária EE (n = 11), heterozigoto de média e baixa expressão EF (n = 9) e heterozigoto para alta e baixa expressão AF (n = 12). No presente trabalho, os alelos identificados como A representam qualquer um dos alelos de alta expressão (A ou B com menor probabilidade de ser C ou demais alelos de alta expressão).

As coletas das amostras e dos dados de produção foram conduzidas no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Viçosa, no período de 15 de maio a 15 de julho de 2005.

Duas dietas experimentais isoenergéticas e isofibrosas foram formuladas visando atender as exigências de cabras em lactação segundo o AFRC (1993), apresentando concentrações de 14% e 17% de proteína bruta na matéria seca, sendo o valor de 17% superior ao recomendado naquela publicação.

No ensaio experimental foram utilizadas quarenta cabras das raças Alpinas e Saanen, pluríparas e lactantes, peso médio de $52,70 \pm 10,74$, com aproximadamente 40 dias de lactação e produção média de $2,59 \pm 0,75$ L de leite/dia e estas foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, com um arranjo fatorial de 2 x 4, sendo dois níveis de proteína da dieta e quatro genótipos (AA, EE, EF e AF).

2.2. Identificação dos alelos da α_{s1} -caseína

As análises genéticas foram realizadas a partir de leucócitos obtidos através da centrifugação (2.500 xg por 10 minutos) das amostras individuais de sangue coletadas por meio de punção da veia jugular. Uma alíquota destes leucócitos foi encaminhada ao Laboratório de Genética da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste.

Amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos com o tampão de extração descrito por Muhammad *et al.* (1994), com modificações na execução do protocolo. Assim, 80 μ L de leucócitos foram adicionados a 500 μ L do tampão de

extração e mantidos por uma hora a 65 °C, com agitações ocasionais. Após o resfriamento a temperatura ambiente, 500 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) foram adicionados com subsequente agitação. Após a centrifugação por 10 minutos a 10.000 xg, o sobrenadante foi transferido para tubos limpos e a precipitação do DNA foi realizada com a adição de 250 µL de isopropanol a 4 °C e mantido a esta temperatura por mais 30 minutos. O DNA foi precipitado por centrifugação a 12.000 xg por 20 minutos e lavado por duas vezes em etanol 75%. O DNA, dissolvido em água ultra-pura, foi quantificado a 260 e 280 nm.

Para a amplificação dos fragmentos de DNA contendo as regiões específicas do gene da α_{s1} -caseína foram desenhados *primers* com base nas seqüências já disponíveis no GenBank (nº acesso AJ504710). O sistema de amplificação consistiu, além dos *primers* específicos e do DNA genômico, de dNTPs, *Taq* DNA polimerase, MgCl₂, Tris-HCl, KCL, e água ultra-pura, em um volume final de 20 µL. O programa de amplificação utilizado no termociclador constou de três etapas que compreenderam: desnaturação da fita molde, anelamento dos *primers* e extensão da fita pela DNA polimerase. Estes passos foram repetidos para obtenção de quantidade suficiente de fragmentos.

Após a amplificação, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 5% e corado com nitrato de prata. Para a análise do alelo F, os fragmentos de DNA adequadamente amplificados foram, quando necessário, clivados com enzimas de restrição *XmnI* (Ramunno *et al.*, 2004). Alguns fragmentos foram sequenciados em seqüenciador automático MegaBACE 1000 Amersham Life Science – USA no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG.

2.3. Ensaio de digestão e produção

O experimento foi conduzido nas dependências do Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Viçosa, no período de 15 de maio a 15 de julho de 2005.

Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial de 2 x 4, para a avaliação da interação entre dois níveis de proteína na dieta (14 e 17 %) e os quatro genótipos (AA; EE; EF; AF).

As dietas experimentais tiveram como base forrageira o feno de capim Tifton-85 (*Cynodon spp.*) e a mistura concentrada consistiu de farelo de soja (*Glycine max* L.), fubá de milho (*Zea mays* L.), e farelo de trigo (*Triticum aestivum*) além da adição de minerais.

As proporções dos ingredientes nas dietas experimentais, expressas na matéria seca e a composição bromatológica dos ingredientes encontram-se descritas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

A composição bromatológica das dietas experimentais, calculada com base nos valores das análises laboratoriais dos alimentos e na proporção dos ingredientes, encontra-se descrita na Tabela 3.

Para a execução do ensaio de digestão e produção os animais foram confinados em baias individuais com dimensões de 1,5 x 2,0 m, de piso totalmente ripado, adaptadas para coleta total de fezes e urina, onde permaneceram durante os períodos de adaptação, pré-experimental e de coleta de dados.

O período de adaptação foi conduzido com o intuito de familiarizar os animais com as baias e as rotinas de alimentação e ordenhas deste experimento, onde receberam dieta com 14% PB e permaneceram desde o parto até aproximadamente 30 dias de lactação. No período pré-experimental, com duração de duas semanas, realizou-se o ajuste de consumos e a adaptação das cabras às dietas experimentais. Ao final deste período todas as cabras já haviam ultrapassado o período de pico da lactação. Na fase de coletas de dados, com nove semanas de duração, foram mensuradas as seguintes variáveis: consumo, digestibilidade de nutrientes, produção de leite e seus constituintes.

Para a determinação do consumo voluntário pelos animais, realizou-se ajustes diários com o objetivo de garantir o acesso *ad libitum* às dietas experimentais, através de estimativas das sobras que correspondessem a 10% do conteúdo fornecido. As dietas foram fornecidas duas vezes ao dia às 7h e 30 min e às 16h e 30 min. As sobras foram amostradas diariamente e, a cada sete dias, foram feitas amostras compostas, as quais foram congeladas para posteriores análises.

Os animais permaneceram sob regime de duas ordenhas, às 6 h e 16 h, com controle leiteiro diário e individual realizado por meio da pesagem do volume de leite produzido durante as nove semanas experimentais.

Semanalmente foram realizadas pesagens individuais das cabras logo após a ordenha, em jejum.

Tabela 1 – Proporções dos ingredientes nas dietas experimentais

Ingrediente	Dieta 14% PB	Dieta 17% PB
	----- % MS -----	
Feno de capim-tifton 85	42,11	42,11
Farelo de soja	7,12	14,97
Fubá de milho	36,00	30,15
Farelo de trigo	12,00	10,00
Calcário calcítico	0,60	0,60
Fosfato bicálcico	1,17	1,17
Mistura mineral ^{1/}	1,00	1,00

^{1/} Mistura mineral: 0,32% de sulfato ferroso; 0,48% de sulfato de cobre; 0,71% de sulfato de manganês; 2,67% de sulfato de zinco; 0,02% de sulfato de cobalto; 0,0125% de iodato de potássio; 0,006% de selenito de sódio; e 95,78% de cloreto de sódio.

Tabela 2 – Composição bromatológica dos ingredientes

Item	Ingredientes			
	Feno Capim-Tifton 85	Farelo de Soja	Fubá de Milho	Farelo de Trigo
	Composição			
MS (g.kg ⁻¹)	816,9	876,2	888,2	888,3
MO (g.kg ⁻¹)	944,4	928,1	961,3	926,7
PB (g.kg ⁻¹)	135,8	499,7	82,4	155,8
EE (g.kg ⁻¹)	16,7	12,1	32,2	29,2
CT (g.kg ⁻¹)	791,9	425,1	851,2	749,9
CNF (g.kg ⁻¹)	63,3	308,1	722,3	292,4
FDN (g.kg ⁻¹)	728,6	117	128,9	457,5
FDNc (g.kg ⁻¹)	717,0	79,6	100,7	358,6
FDNcp(g.kg ⁻¹)	664,6	73,4	93,8	327,5
FDA (g.kg ⁻¹)	312,2	57,5	25,1	114,6
FDAi (g.kg ⁻¹)	146,1	25,2	38,6	24,9
NIDN (g.kg ⁻¹ NT)	386,1	12,4	84	199,4
NIDA (g.kg ⁻¹ NT)	21,5	9,6	11	65,7
LDA (g.kg ⁻¹)	33,0	8,6	2,8	21,4
Cinzas (g.kg ⁻¹)	55,6	71,9	38,7	73,3
Ca (g.kg ⁻¹)	3,2	2,9	0,8	1,5
P (g.kg ⁻¹)	2,3	2,1	7,1	9,9
	Valores estimados de energia disponível			
NDT (%)	60,65	80,27	85,72	70,21
EM (Mcal.kg ⁻¹)	2,25	3,55	3,2	2,69
EL (Mcal.kg ⁻¹)	1,38	2,26	2,04	1,67

MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; CT = carboidratos totais; CNF = carboidratos não-fibrosos; FDN = fibra em detergente neutro; FDNc = FDN corrigida para cinzas; FDNcp = FDN corrigida para cinzas e proteína; FDA = fibra em detergente ácido; FDAi = FDA indigerível; NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; LDA = lignina em detergente ácido; Ca = cálcio; P = fósforo; NDT = nutrientes digestíveis totais; EM = energia metabolizável; e EL = energia líquida.

Tabela 3 – Composição bromatológica das dietas experimentais

Item	Dietas Experimentais	
	14% PB	17%PB
	Composição	
MS (g.kg ⁻¹)	865,8	865,3
MO (g.kg ⁻¹)	930,5	928,6
PB (g.kg ⁻¹)	142,5	173,8
EE (g.kg ⁻¹)	23,2	21,6
CT g.kg ⁻¹)	764,9	733,2
CNF (g.kg ⁻¹)	341,1	316,9
FDN (g.kg ⁻¹)	423,7	416,2
FDNf (g.kg ⁻¹)	314,1	314,1
FDA (g.kg ⁻¹)	161,5	162,2
FDAi (g.kg ⁻¹)	81,7	80,9
NIDN (g.kg ⁻¹ NT)	221,5	213,6
NIDA (g.kg ⁻¹ NT)	21,8	20,6
LDA (g.kg ⁻¹)	18,4	18,5
Cinzas (g.kg ⁻¹)	51,8	53,7
Ca (g.kg ⁻¹)	7,3	7,5
P (g.kg ⁻¹)	6,0	5,6
	Valores estimados de energia disponível	
NDT (g.kg ⁻¹)	704,2	702,8
EM (Mcal.kg ⁻¹)	2,68	2,72
EL (Mcal.kg ⁻¹) ³	1,69	1,71

MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; CT = carboidratos totais; CNF = carboidratos não-fibrosos; FDN = fibra em detergente neutro; FDNf = FDN proveniente da forragem; FDA = fibra em detergente ácido; FDAi = FDA indigerível; NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; LDA = lignina em detergente ácido; Ca = cálcio; P = fósforo; NDT = nutrientes digestíveis totais; EM = energia metabolizável; e EL = energia líquida

Semanalmente foram coletadas amostras individuais de leite, compostas proporcionalmente às coletas da manhã e da tarde, sendo uma alíquota remetida ao Laboratório de Qualidade do leite da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa-CNPGL em vasilhame contendo o conservante Bronopol[®] (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) para a determinação dos teores de gordura, lactose e extrato seco total pelo método de espectrofotometria na região do infravermelho em equipamento Bentley Combi 2003¹ calibrado para realizar análises em leite de cabra. Análises dos teores de N total, proteína bruta (NT x 6,38), e nitrogênio não protéico foram efetuadas pelo método micro-Kjeldahl e a proteína verdadeira calculada pela diferença entre o teor de proteína bruta total e de NNP (Barbano e Lynch, 2006).

Durante o período de coleta de dados realizou-se ensaio de digestibilidade com sete dias de duração, procedendo-se a coleta total de fezes e urina para as estimativas da

¹ Bentley Instruments Inc.

digestibilidade aparente dos nutrientes, da eficiência de utilização e balanços de nitrogênio e de energia das cabras lactantes, sendo coletadas amostras diariamente de fezes e urina para posteriores análises.

Foram realizadas análises dos alimentos, sobras e fezes quanto aos teores de matéria seca (MS), nitrogênio total (NT), extrato etéreo (EE) e cinzas, utilizando-se as técnicas descritas por Silva e Queiroz (2002), e de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), segundo Van Soest *et al.* (1991). Determinações dos teores de nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) foram realizadas nos alimentos conforme técnica descrita por Licitra *et al.* (1996), e de lignina em ácido sulfúrico (LDA), conforme descrito por Pereira e Rossi Jr. (1995).

Estimativas dos teores de carboidratos totais (CT) e os carboidratos não-fibrosos (CNF) foram obtidas a partir das equações propostas por Sniffen *et al.* (1992) e Van Soest *et al.* (1991), respectivamente:

$$CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%Cinzas)$$

$$CNF = 100 - (\%PB + \%EE + \%Cinzas + \%FDN_{cp})$$

Os valores de energia dos ingredientes das dietas foram estimados pelas equações propostas pelo NRC (2001). No cálculo do NDT, considerou-se o nível de alimentação (L) de 1 x (nível de manutenção), sendo estimado pela equação:

$$NDT_m = (PB_D + CNF_D + FDN_D + EE_D \times 2,25) - 7$$

sendo que a PB_D , refere-se à PB verdadeiramente digestível; CNF_D , aos carboidratos não-fibrosos verdadeiramente digestíveis; FDN_D , à FDN verdadeiramente digestível; EE_D , extrato etéreo verdadeiramente digestível e 7, refere-se ao NDT metabólico fecal.

Os valores de NDT foram utilizados para as estimativas de energia digestível (ED) e energia metabolizável (EM) segundo as equações sugeridas pelo NRC (2001) e em energia líquida pela equação de Moe e Tyrrell (1972), que corresponde à energia líquida ao nível de manutenção descritas a seguir:

$$ED (\text{Mcal.kg}^{-1}) = 0,04409 \times NDT (\%)$$

$$EM (\text{Mcal.kg}^{-1}) = 1,01 \times ED (\text{Mcal/kg}) - 0,45 ;$$

$$EL_m (\text{Mcal.kg}^{-1}) = 0,0266 \times NDT (\%) - 0,12$$

A exigência de energia líquida para produção de leite (EL_p) foi calculada a partir da estimativa do valor energético do leite (VEL) e da produção de leite (PL), de acordo com o NRC (2001):

$$VEL(\text{Mcal.kg}^{-1}) = (0,0929 \times \%Gord) + (0,0563 \times \%PB) + (0,00395 \times \%Lac),$$

em que

%Gord, %PB e %Lac = *porcentual* de gordura, proteína e lactose no leite, respectivamente.

$$EL_p(\text{Mcal}) = VEL \times PL$$

Sendo PL a produção de leite diária em kg por dia

A eficiência bruta de utilização da energia metabolizável (k_{m+L}) para a produção de leite foi calculada segundo Luo *et al.* (2004)^c conforme a fórmula a seguir:

$$k_{m+L} = \left[\frac{EL_p}{CEM} \right] \times 100$$

em que

CEM = consumo de energia Metabolizável total;

A eficiência líquida da utilização da energia metabolizável (k_L) para a produção de leite foi calculada descontando-se do consumo de energia metabolizável total a fração de energia metabolizável exógena excretada na urina (EMU_{exo}), a exigência de energia metabolizável para manutenção (REM_m) e a exigência de energia metabolizável para ganho de peso (REM_g).

$$k_L = \frac{EL_p}{CEM - (EMU_{exo} + REM_m + REM_g)} \times 100$$

Para o cálculo da energia metabolizável exógena excretada na urina (EMU_{ex}) utilizou-se como referência os valores referenciados por Nsahlai *et al.* (2004), que consideram uma perda de energia de 62,21 kJ por g de nitrogênio excretado na urina acima do conteúdo de nitrogênio urinário endógeno.

$$EMU_{ex} (\text{Mcal.dia}^{-1}) = \frac{62,21 \times 0,239 \times NU_{ex}}{1000};$$

em que o nitrogênio urinário exógeno é calculado segundo a fórmula a seguir:

$$NU_{ex} = gN_{Urinário} - gNU_{End}$$

em que NU_{End} corresponde ao nitrogênio urinário endógeno, estimado segundo Luo *et al.* (2004)^b, considerando o valor 0,165 g. (PV^{0,75})⁻¹.

A exigência de energia metabolizável de manutenção foi calculado utilizando-se a recomendação de 431 kJ.kg⁻¹ de peso metabólico dos animais segundo Luo *et al.* (2004)^a.

$$REM_m (\text{Mcal.dia}^{-1}) = \frac{431 \times 0,239 \times PV^{0,75}}{1000}$$

Para estimar a exigência de energia metabolizável para ganho de peso utilizou-se a recomendação para cabras adultas de 28,5kJ.g⁻¹ de ganho de peso diário (Sahlu *et al.*, 2004).

$$REM_g (\text{Mcal.dia}^{-1}) = \frac{28,5 \times 0,239 \times gGPD}{1000}$$

O balanço de energia foi calculado considerando-se a quantidade de energia metabolizável consumida (Mcal.dia⁻¹) descontada dos teores utilizados para manutenção e ganho de peso, da energia metabolizável excretada na urina e da energia líquida utilizada para produção de leite (ELp).

$$BE (\text{Mcal.dia}^{-1}) = CEM - (REM_m + REM_g + EMU_{ex} + ELp)$$

O balanço de nitrogênio foi calculado considerando-se a quantidade de nitrogênio (g.dia⁻¹) consumida e os teores secretados no leite e excretados nas fezes e na urina descontando as frações endógenas:

$$BN (\text{g.dia}^{-1}) = N_{consumido} - N_{Find} - NU_{ex} - N_{leite}$$

Para o cálculo da quantidade de nitrogênio indigerido (N_{Find}) excretado nas fezes, utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{NFind (g.dia}^{-1}\text{)} = \text{gNfecal} - \text{gNMFecal},$$

em que NMFecal = nitrogênio metabólico fecal.

A fração de NMFecal foi calculada conforme a fórmula proposta por Moore *et al* (2004) que considera o consumo de matéria seca do animal:

$$\text{NMFecal(g.dia}^{-1}\text{)} = \frac{2,67 * \text{CMS}}{6,25}$$

A fração de NUEx foi calculada segundo Luo *et al.* (2004)^b conforme descrito anteriormente.

Para o cálculo da proteína bruta verdadeiramente digerida ou proteína metabolizável utilizou-se a fórmula a seguir:

$$\text{PBVdig} = (\text{gNing} - \text{gNFind}) * 6,25 ;$$

em que

PBVdig = proteína bruta verdadeiramente digerida ou Proteína Metabolizável.

O valor biológico, medida direta da proporção da proteína alimentar que pode ser utilizada pelo animal para síntese de tecidos e de outros compostos, foi calculado de acordo com a fórmula adaptada de Coelho e Leão (1979), distinguindo-se as frações do nitrogênio de origem fecal e urinária endógena:

$$\text{VB} = \frac{\text{gNingerido} - [(\text{gNFecal} - \text{gNFMet}) + (\text{gNUrinario} - \text{gNUend})]}{\text{gNing} - (\text{gNFecal} - \text{gNFMet})} \times 100$$

A eficiência líquida de utilização da proteína metabolizável para a síntese de proteína do leite foi calculada segundo a fórmula adaptada de Luo *et al.* (2004)^b.

$$k_L = \frac{\text{PB Leite (g/dia)}}{\text{CPMet} - [\text{PMet}_m + \text{PMet}_g]}$$

em que

k_L = eficiência de utilização da proteína metabolizável;

PB leite: proteína bruta do leite (gN Leite x 6,38); e

CPMet = consumo de proteína metabolizável:

$$\text{CPMet} = \text{CPB} - (\text{PFInd}) - (\text{PUEx})$$

PMet_m = proteína metabolizável de manutenção:

$$\text{PMet}_m = \text{PMFecal} + \text{PUEnd} + \text{PMet}_d$$

em que

PMFecal – proteína metabólica fecal ($\text{PMFecal} = 0,0267 * \text{CMS} (\text{g/dia})$);

PUEnd – proteína urinária endógena ($\text{PUEnd} = 1,031 * \text{PV}^{0,75}$); e

PMet_d – proteína metabolizável de descamação ($\text{PMet}_d = 0,2 * \text{PV}^{0,6}$).

Para o cálculo da proteína metabolizável para ganho (PMet_g) utilizou-se a fórmula a seguir proposta por Luo *et al.* (2004)^b

$$\text{PMet}_g = 0,290 * \text{gGPD}$$

em que

GPD = ganho de peso diário (g/dia).

Os dados obtidos foram analisados por meio do programa computacional, Sistema para análises Estatísticas-SAEG, versão 9.1 (SAEG, 2007), utilizando-se o procedimento de análise de variância (ANOVA) e o teste Student-Neuman-Keuls (SNK), a 5% de probabilidade, para comparação das médias dos tratamentos.

3. Resultados e Discussão

Para todas as variáveis avaliadas neste experimento não foram observados efeitos significativos ($P > 0,05$) da interação entre os níveis de proteína da dieta e os genótipos para α_{s1} -caseína, sendo assim os efeitos destes sobre os parâmetros estudados estão apresentados isoladamente nas tabelas que se seguem. Os dados referentes ao consumo voluntário de matéria seca e de nutrientes pelos animais experimentais em função dos genótipos e dos níveis de proteína das dietas encontram-se descritos na Tabela 4.

De acordo com a Tabela 4, verifica-se que houve efeito dos genótipos ($P < 0,05$) sobre o consumo de matéria seca e nutrientes. Animais pertencentes ao genótipo AA, homocigotos para alta produção de α_{s1} -caseína, apresentaram valores de consumos de matéria seca, matéria orgânica, fibra em detergente neutro, carboidratos totais,

Tabela 4 – Médias para os pesos dos animais e os consumos de matéria seca, matéria orgânica, nutrientes das dietas e coeficientes de variação (CV), em função dos genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína da dieta

Item	Genótipos				CV
	AA	EE	EF	AF	
PV (kg)	53,13	58,90	52,89	50,29	19,83
CMS (kg.dia ⁻¹)	2,51 ^a	2,38 ^{ab}	2,30 ^{ab}	1,96 ^b	15,41
CMS (g.(kgPV ^{0,75}) ⁻¹)	128,39 ^a	111,77 ^{ab}	120,10 ^{ab}	104,76 ^b	13,56
CMS (%PV)	4,79	4,04	4,52	3,96	16,15
CMO (kg.dia ⁻¹)	2,33 ^a	2,21 ^{ab}	2,14 ^{ab}	1,82 ^b	15,39
CFDN (kg.dia ⁻¹)	0,93 ^a	0,88 ^{ab}	0,85 ^{ab}	0,72 ^b	16,47
CFDN (%PV)	1,78	1,50	1,67	1,45	16,18
CPB (kg.dia ⁻¹)	0,41 ^a	0,39 ^a	0,37 ^a	0,32 ^b	14,71
CEE (g.dia ⁻¹)	59,7 ^a	57,0 ^{ab}	54,5 ^{ab}	47,0 ^b	15,97
CCT (kg.dia ⁻¹)	1,86 ^a	1,77 ^{ab}	1,71 ^{ab}	1,46 ^b	15,63
CCNF (kg.dia ⁻¹)	0,93 ^a	0,88 ^{ab}	0,86 ^{ab}	0,73 ^b	15,09
	Nível de Proteína (%)				
		14		17	
PV (kg)		54,63		52,97	19,83
CMS (kg.dia ⁻¹)		2,24		2,26	15,41
CMS (g.(kgPV ^{0,75}) ⁻¹)		113,95		118,55	13,56
CMS (%PV)		4,22		4,43	16,15
CMO (kg.dia ⁻¹)		2,08		2,10	15,39
CFDN (kg.dia ⁻¹)		0,84		0,82	16,47
CFDN (%PV)		1,59		1,61	16,18
CPB (kg.dia ⁻¹)		0,33 ^b		0,41 ^a	14,71
CEE (g.dia ⁻¹)		55,4		51,9	15,97
CCT (kg.dia ⁻¹)		1,72		1,63	15,63
CCNF (kg.dia ⁻¹)		0,87		0,80	15,09

Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem a 5% de probabilidade pelo teste SNK. CV - Coeficiente de variação; PV – Peso vivo; CMS – Consumo de matéria seca; CMO – Consumo de matéria orgânica; CFDN - Consumo de fibra em detergente neutro; CPB – Consumo de proteína bruta; CEE – Consumo de extrato etéreo; CCT – Consumo de carboidratos totais; CCNF – Consumo de carboidratos não-fibrosos.

carboidratos não-fibrosos e extrato etéreo superiores aos dos animais do genótipo AF e os animais pertencentes aos genótipos EE e EF, apresentaram consumos intermediários. Maior consumo de proteína bruta foi observado pelos genótipos AA, EE e EF. Ao se analisar o efeito da concentração de proteína da dieta, não se observou diferenças no consumo de matéria seca e de nutrientes entre os dois níveis estudados, exceto para o consumo de proteína.

Segundo o NRC (2001) a demanda de energia para a manutenção e produção é o principal fator determinante no consumo de alimentos e considerando-se que as rações

utilizadas não continham elevados conteúdos de FDN oriundo da forragem (31%) que poderiam determinar limitações físicas ao aumento de consumo, o maior consumo de matéria seca apresentado pelos animais do genótipo AA pode ser indicativo de uma maior demanda energética por este grupo (Mertens, 1987; Mertens, 1997).

O consumo de FDN, em *porcentagem* do peso vivo, não variou entre os genótipos e nos níveis de proteína na dieta, sendo em média 1,6%, valor este superior à recomendação de ingestão ótima de FDN descrita por Mertens (1992) para vacas leiteiras e por Branco (2005) para cabras em lactação, de respectivamente, 1,25 e 1,24% do peso vivo. Os valores obtidos para o consumo de FDN mostraram-se próximos aos observados por Carvalho *et al* (2006) de 1,53% do peso vivo e aparentemente não afetaram o consumo médio de matéria seca que se apresentou relativamente alto, sendo de 4,33% do peso vivo.

Segundo Van Soest (1994) o consumo de FDN em bovinos está firmemente associado com o consumo de matéria seca devido tanto ao fato de a FDN estar relacionada ao preenchimento físico quanto à taxa de passagem mais lenta. Carvalho *et al* (2006) observaram que os níveis de consumo de FDN de até 1,94% do peso vivo não foram limitantes fisicamente do consumo em cabras lactantes e sugeriram que tal fato decorra de peculiaridades no comportamento ingestivo e na capacidade de processamento da fibra no trato digestivo desta espécie. Segundo Van Soest *et al* (1998) a maior capacidade de ingestão observada em caprinos pode ser resultante do menor tempo de retenção de partículas no rúmen.

Lu *et al* (2005) observaram que o controle fisiológico do consumo em cabras lactantes baseia-se na densidade energética da dieta quando o conteúdo de energia metabolizável destas encontra-se entre 2,39 e 2,48Mcal/kg, portanto inferiores aos apresentados pelas dietas experimentais de 2,68 e 2,72 Mcal/kg. Sendo assim acredita-se que a demanda energética tenha sido determinante no ajuste do consumo pelos animais experimentais.

Comparando-se o efeito da concentração de proteína das dietas sobre o consumo, observou-se diferença significativa no consumo de proteína bruta, sendo este resultado esperado em função do maior fornecimento de proteína bruta aos animais recebendo a dieta com 17% de PB, não sendo observadas diferenças nos consumos de matéria seca e demais nutrientes.

Os valores observados e os preditos pelo AFRC (1993) foram submetidos a análises de correlação e encontram-se apresentados na Figura 1.

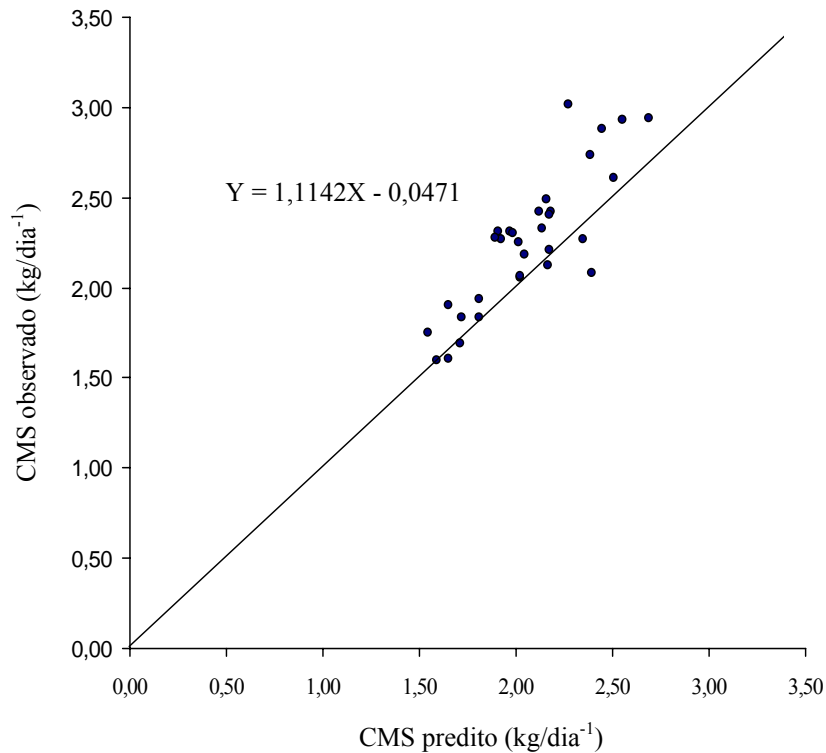


Figura 1 – Correlação entre os valores de consumo de matéria seca (CMS) observados e preditos pelo AFRC (1993). Y = consumo de matéria seca observado (kg.dia⁻¹); e x = consumo de matéria seca predito (kg.dia⁻¹).

Na Figura 1 pode ser visualizada uma correlação positiva ($r = 0,86$) entre as estimativas de consumo de matéria seca obtidas pela fórmula descrita pelo AFRC (1993), e os valores de consumo observados. Considerando-se que para estimar o consumo de MS, o AFRC (1993) considera o peso metabólico e a produção de leite dos animais a correlação observada indica que os animais deste experimento apresentaram consumo de matéria seca compatível com a produção por eles apresentada.

Os dados referentes às estimativas de consumo e de uso da energia disponível nas rações pelos animais experimentais em função dos genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína das dietas encontram-se na Tabela 5.

Os consumos de energia líquida e de energia metabolizável e o balanço energético foram superiores no animais do genótipo AA quando comparados aos valores dos animais do grupo AF. Não houve diferenças no consumo de NDT, bem como nas eficiências de utilização da energia (bruta e líquida) entre os genótipos.

Sugere-se que o comportamento do consumo de energia pelos animais tenha sido reflexo do consumo de matéria seca apresentada (Tabela 4).

Tabela 5 – Médias para os consumos de nutrientes digestíveis totais-NDT, energia metabolizável, energia líquida das dietas, balanço e eficiência de utilização de energia e coeficientes de variação (CV), de acordo com os genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína da dieta

Item	Genótipos				CV
	AA	EE	EF	AF	
CNDT (kg.dia ⁻¹)	1,41	1,38	1,35	1,17	17,20
CEL (Mcal.dia ⁻¹)	4,25 ^a	4,01 ^{ab}	3,90 ^{ab}	3,33 ^b	15,36
CEM (Mcal.dia ⁻¹)	6,74 ^a	6,41 ^{ab}	6,19 ^{ab}	5,27 ^b	15,37
REM _m (Mcal.dia ⁻¹)	2,02	2,19	2,01	1,94	14,76
REM _g (Mcal.dia ⁻¹)	0,89	0,94	1,11	1,01	51,59
EMU _{ex} (Mcal.dia ⁻¹)	0,22	0,20	0,15	0,16	14,76
EL _p (Mcal.dia ⁻¹)	2,25	1,77	2,01	1,63	22,92
BE (Mcal.dia ⁻¹)	1,57 ^a	1,51 ^a	1,06 ^{ab}	0,70 ^b	47,88
k _{m+L} (%)	29,56	28,65	31,75	32,69	17,47
k _L (%)	64,32	60,53	68,25	71,75	17,82
Nível de Proteína (%)					
	14		17		
CNDT (kg.dia ⁻¹)	1,36		1,27		17,20
CEL (Mcal.dia ⁻¹)	3,77		3,87		15,36
CEM (Mcal.dia ⁻¹)	5,99		6,13		15,37
REM _m (Mcal.dia ⁻¹)	2,06		2,02		14,76
REM _g (Mcal.dia ⁻¹)	1,14		0,84		51,59
EMU _{ex} (Mcal.dia ⁻¹)	0,15 ^b		0,22 ^a		14,76
EL _p (Mcal.dia ⁻¹)	1,79		2,01		22,92
BE (Mcal.dia ⁻¹)	1,06		1,36		47,88
k _{m+L} (%)	28,09 ^b		33,24 ^a		17,47
k _L (%)	67,14		65,29		17,82

Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem a 5% de probabilidade pelo teste SNK. CV = coeficiente de variação; CNDT = consumo de nutrientes digestíveis totais; CEL = consumo de energia líquida; CEM = consumo de energia metabolizável; REM_m = requerimento de energia metabolizável de manutenção; EMU_{ex} = energia metabolizável urinária exógena; EL_p = energia líquida para produção de leite; BE = balanço de energia; K_{m+L} = eficiência bruta de utilização da energia metabolizável; e K_L = eficiência líquida de utilização da energia metabolizável para lactação.

Todos os animais independentemente dos genótipos ou dos níveis de proteína nas dietas apresentaram balanço energético positivo este dado torna-se importante na comparação dos demais dados de eficiência de utilização de nutrientes bem como nos dados de produção e composição de leite. Schmidely *et al.* (2002) compararam os efeitos dos genótipos AA e FF sobre a eficiência de utilização de nitrogênio em cabras em lactação e relataram superioridade do genótipo AA na utilização do nitrogênio digerido para a síntese de proteína do leite, mas estes animais encontravam-se em balanço energético negativo.

A eficiência bruta de utilização de energia metabolizável (k_{m+L}) apresentou média de 30,66%, valor este, inferior ao valor de 45% obtido por Carvalho *et al.* (2006)

para cabras recebendo dietas com 35,4% de FDN_f na dieta. Nesta comparação, acredita-se que os menores valores obtidos para k_{m+L} neste experimento possam ser resultantes da menor produção de leite apresentada neste experimento sendo de 2,67 kg/dia *versus* 3,91 kg/dia.

A eficiência líquida de utilização da energia metabolizável foi, em média, de 66,21% sendo este valor semelhante ao observado por Branco (2005), que trabalhando com cabras deste mesmo rebanho e consumindo dieta com 35% de FDN_f, obteve valor semelhante aos teores deste experimento, de 31,41%.

Os animais que consumiram a dieta com 17% de proteína bruta apresentaram maior conteúdo de energia metabolizável urinária exógena provavelmente devido a maior excreção urinária de nitrogênio (Tabela 7).

Os níveis de proteína bruta das dietas experimentais não apresentaram efeito sobre o consumo de NDT e de energias líquida e metabolizável, mas os animais recebendo dieta com 17% de proteína bruta apresentaram maior eficiência bruta de utilização da energia metabolizável, provavelmente, devido ao fato de terem apresentado valor energia líquida de produção de leite (ELp) 12% maior que os animais recebendo a dieta com 14% de PB.

Os coeficientes de digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes da dieta em função dos genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína das dietas encontram-se descritos na Tabela 6.

Não foram observados efeitos significativos dos genótipos analisados e dos níveis de proteína da dieta sobre os valores de digestibilidade aparente da matéria seca e dos nutrientes da dieta. Houve efeito dos níveis de PB sobre a digestibilidade dos CT e CNF, sendo estas, superiores nas cabras recebendo dietas com 14% de PB. O nível de 17% de PB na dieta está acima do recomendado para cabras leiteiras, sugerindo que o maior sincronismo entre as fontes de proteína e energia esteja em torno dos 14% de PB onde foram observados maiores valores de digestibilidade para frações de carboidrato. Fonseca *et al.* (2006) relataram que o nível de 13,5% de PB na dieta era adequado para atender as exigências de cabras com produção de leite até 2,7 L.dia⁻¹.

A sincronia entre as proporções e taxas de degradação de carboidratos e proteínas no rúmen é determinante na maximização da síntese de proteínas microbianas que representam de 50 a 80% da proteína absorvida no intestino de animais ruminantes (Storn e Ørskov, 1983; Bach *et al.*, 2005).

Tabela 6 – Efeito dos genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína das dietas sobre os coeficientes de digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes das dietas

Item	Genótipos				CV
	AA	EE	EF	AF	
DMS (%)	70,64	73,27	72,07	72,22	4,56
DMO (%)	71,31	73,88	72,57	72,71	4,43
DFDN (%)	54,75	58,55	54,89	55,06	11,24
DPB (%)	72,57	76,50	74,67	74,67	4,90
DEE (%)	83,56	86,64	82,81	85,17	3,89
DCT (%)	70,62	72,87	71,69	71,86	4,90
DCNF (%)	52,21	53,19	58,44	59,62	26,52
	Nível de Proteína (%)				
	14			17	
DMS (%)	72,97			71,24	4,56
DMO (%)	73,54			71,78	4,43
DFDN (%)	57,02			54,41	11,24
DPB (%)	73,32			76,04	4,90
DEE (%)	84,82			84,08	3,89
DCT (%)	73,43 ^a			70,17 ^b	4,90
DCNF (%)	62,17 ^a			50,75 ^b	26,52

Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem a 5% de probabilidade pelo teste SNK. CV = coeficiente de variação; DMS = digestibilidade da matéria seca; DMO = digestibilidade da matéria orgânica; DFDN = digestibilidade da fibra em detergente neutro; DPB = digestibilidade da proteína bruta; DEE = digestibilidade do extrato etéreo; DCT = digestibilidade dos carboidratos totais; e DCNF = consumo de carboidratos não-fibrosos.

Os valores referentes ao balanço de nitrogênio, consumo e eficiência de utilização da proteína metabolizável para a síntese de proteína do leite encontram-se na Tabela 7.

Os animais pertencentes ao genótipo AA, homozigotos para alta produção de α_{s1} -caseína, apresentaram valores de consumo de proteína metabolizável significativamente superiores apenas aos dos animais do genótipo AF e numericamente superiores aos demais.

Apesar da não observação de efeitos significativos dos genótipos para α_{s1} -caseína sobre a eficiência líquida de utilização da proteína metabolizável, a magnitude dos valores apresentados pelos animais dos genótipos AA revela uma possível tendência de superioridade sobre os valores dos genótipos EE e EF que se mostraram aproximadamente 15% menores.

O nível de proteína bruta da dieta apresentou efeito significativo sobre o balanço de nitrogênio e a eficiência de utilização da proteína metabolizável para a síntese de leite, sendo o balanço de nitrogênio superior nos animais que consumiram a dieta com 17% de PB e a eficiência de utilização maior para a dieta com 14%.

Tabela 7 – Efeito dos genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína das dietas sobre o consumo e utilização da proteína metabolizável, balanço de nitrogênio e valor biológico

Item	Genótipos				CV
	AA	EE	EF	AF	
CPMet (g.dia ⁻¹)	414,68 ^a	392,02 ^{ab}	362,71 ^{ab}	321,89 ^b	15,77
PMet _{ganho} (g.dia ⁻¹)	38,02	39,86	44,56	43,98	52,79
PMet _{mant.} (g.dia ⁻¹)	89,31	87,77	83,75	73,87	13,87
k (%)	67,01	55,46	56,88	64,42	18,26
BN (g.dia ⁻¹)	30,06	33,70	31,60	26,10	18,43
VB (%)	50,24	55,91	56,69	54,79	12,84
NFind (g.dia ⁻¹)	5,90	3,13	4,27	3,39	49,62
NUex (g.dia ⁻¹)	14,48	13,48	9,51	11,08	34,85
NUP (g/dL)	26,82	25,05	26,89	23,82	19,07
NUL (g/dL)	29,43	28,64	32,60	31,63	16,84
Nível de Proteína (%)					
	14	17			
CPMet (g.dia ⁻¹)	245,31 ^b	500,34 ^a		15,77	
PMet _{ganho} (g.dia ⁻¹)	47,50	35,73		52,79	
PMet _{mant.} (g.dia ⁻¹)	83,33	84,02		13,87	
k (%)	68,08 ^a	53,81 ^b		18,26	
BN (g.dia ⁻¹)	27,19 ^b	33,54 ^a		18,43	
VB (%)	55,08	53,74		12,84	
NFind (g.dia ⁻¹)	3,56	4,78		49,62	
NUex (g.dia ⁻¹)	9,84 ^b	14,43 ^a		34,85	
NUP (g/dL)	22,29 ^b	28,99 ^a		19,07	
NUL (g/dL)	29,57	31,58		16,84	

Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem a 5% de probabilidade pelo teste SNK. CV = coeficiente de variação; CPMet = consumo de proteína metabolizável; PMet_{ganho} = proteína metabolizável para ganho de peso; PMet_{mant.} = proteína metabolizável para manutenção; k = eficiência líquida de utilização da proteína metabolizável para a síntese de proteína do leite; BN = balanço de nitrogênio; NFind = nitrogênio fecal indigerido; NUex = nitrogênio urinário exógeno; NUP = nitrogênio uréico plasmático; e NUL = nitrogênio uréico leite

A maior excreção de nitrogênio na urina (NUEx), os maiores teores de nitrogênio uréico no plasma e a menor eficiência líquida de utilização da proteína metabolizável nos animais consumindo a dieta com 17% de proteína bruta fornecem indícios de que este teor protéico encontra-se acima das exigências de proteína das cabras lactantes deste experimento que apresentavam produção média diária de leite de $2,59 \pm 0,75$ L de leite/dia, peso vivo médio de $52,70 \pm 10,74$ independentemente dos genótipos das mesmas.

Stern *et al.* (1994) associaram maiores perdas de nitrogênio em ruminantes à falta de sincronia entre as proporções e taxas de degradação de carboidratos e proteínas no rúmen devido aos requerimentos específicos para a microflora ruminal que utiliza os carboidratos como fontes de esqueletos de carbono e fontes de energia para a

biossíntese de proteínas microbianas, fato este que, provavelmente, ocorreu neste experimento, visto que nas dietas com 17% de PB a digestibilidade das frações fibrosas apresentou-se numericamente menor (Tabela 6).

O fornecimento de excesso de proteína para animais ruminantes não aproveita a capacidade destes de reciclarem nitrogênio. A reciclagem de nitrogênio é um processo é nutricional e economicamente benéfico e pode contribuir com até 81% do nitrogênio digerido (Lapierre *et al.*, 2005; Abdoun *et al.*, 2007). Ademais, devem ser considerados outros aspectos indesejáveis relacionados ao fornecimento excessivo de proteínas, tais como, perdas econômicas e possíveis danos ao meio ambiente (Tamminga, 1996; Jonker *et al.*, 2002).

Os efeitos dos genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína das dietas sobre os conteúdos de proteína bruta e verdadeira do leite e frações nitrogenadas obtidos pelos métodos micro-Kjeldahl e de nitrogênio uréico analisado pelo método enzimático por kits comerciais enzimáticos encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Efeito dos genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína das dietas sobre os conteúdos de proteína bruta e verdadeira do leite e frações nitrogenadas obtidos pelos métodos micro-Kjeldahl e enzimáticos

Item	Genótipos				CV
	AA	EE	EF	AF	
PB _L (g.L ⁻¹)	31,68 ^a	29,94 ^{ab}	29,01 ^b	30,24 ^{ab}	5,42
PV _L (g.L ⁻¹)	30,63 ^a	29,04 ^{ab}	28,03 ^b	29,28 ^{ab}	4,92
PV _L (%PB)	96,69	96,99	96,66	96,83	1,23
NNP (%PB)	3,26	3,02	3,32	3,14	40,88
NUL (g/dL)	29,43	28,64	32,59	31,63	16,83
	Nível de Proteína (%)				
	14			17	
PB _L (g.L ⁻¹)	29,84			30,60	5,42
PV _L (g.L ⁻¹)	28,85			29,64	4,92
PV _L (%PB)	96,68			96,86	1,23
NNP (%)	3,28			3,07	40,88
NUL (g/dL)	29,57			31,58	16,83

Valores referentes às médias das nove amostras individuais dos quarenta animais experimentais. Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem a 5% de probabilidade pelo teste SNK. CV = coeficiente de variação; PB_L = proteína bruta do leite; PV_L = proteína verdadeira do leite; NNP = nitrogênio não-protéico; e NUL = nitrogênio uréico do leite (análise com kits enzimáticos).

Observou-se efeito significativo do genótipo para α_{s1} -caseína sobre os conteúdos de proteína bruta e proteína verdadeira do leite, tendo os animais pertencentes ao

genótipo AA apresentou valores superiores de proteína bruta e de proteína verdadeira aos dos animais do genótipo EF.

Numericamente, o teor médio de proteína bruta do leite dos animais do genótipo AA apresentou-se superior aos dos animais dos genótipos EE, EF e AF, em respectivamente, 6, 9,2 e 4,8%. O teor de proteína verdadeira no leite dos animais AA apresentou comportamento similar, sendo superior em 5,5%, 9,3% e 4,6% aos dos animais dos genótipos EE, EF e AF.

A observação de que o aumento na proteína bruta da dieta não aumentou significativamente os teores de proteína bruta e de proteína verdadeira do leite vem corroborar os achados de maiores excreções urinárias de nitrogênio e maiores teores de nitrogênio uréico no plasma dos animais recebendo a dieta com 17% sendo estes indícios de que este nível acima das exigências de proteína das cabras lactantes deste experimento.

As dietas experimentais foram formuladas para serem isoenérgicas e isofibras variando apenas o conteúdo de proteína bruta. A ausência de respostas produtivas a este aumento de proteínas na dieta tanto pode ser devido a um excesso efetivo em relação às exigências dos animais quanto a um excesso relativo ao fornecimento de carboidratos digestíveis. A quantidade e a digestibilidade dos carboidratos são reguladores primários da síntese de proteínas microbianas no rúmen.

Os dados referentes à composição do leite dos animais experimentais em função dos genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína das dietas encontram-se descritos na Tabela 9.

Não foram observados efeitos significativos dos os genótipos analisados e dos níveis de proteína na dieta sobre os conteúdos de gordura, lactose e extrato seco total e de energia no leite dos animais experimentais.

O conteúdo de gordura do leite dos animais do genótipo AA, de 38,76 g/kg de leite apresentou-se muito próximo ao valor observado por Schmidely *et al.* (2002), 38,8g/kg de leite. Chilliard *et al.* (2003) relataram variações nos teores de gordura dos leites provenientes dos genótipos AA e FF para α_{s1} -caseína sendo de 35 g/kg e 32 g/kg, respectivamente.

Os dados referentes à produção diária de leite e de seus constituintes em função dos genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína das dietas encontram-se descritos na Tabela 10.

Tabela 9 – Efeito dos genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína das dietas sobre a composição de gordura, lactose, extrato seco total e energia do leite de cabras

Item	Genótipos				CV
	AA	EE	EF	AF	
Gordura (g.kg ⁻¹)	38,76	36,78	37,07	35,86	10,45
Lactose (g.kg ⁻¹)	42,74	42,59	42,97	42,43	4,23
EST (g.kg ⁻¹)	125,91	123,05	121,52	121,15	5,75
Energia (kcal.kg ⁻¹)	704,20	677,76	687,05	679,46	7,91

Item	Nível de Proteína (%)		CV
	14	17	
	Gordura (g.kg ⁻¹)	36,67	
Lactose (g.kg ⁻¹)	42,78	42,59	4,23
EST (g.kg ⁻¹)	122,06	123,76	5,75
Energia (kcal.kg ⁻¹)	688,15	686,09	7,91

Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem a 5% de probabilidade pelo teste SNK. CV = coeficiente de variação; e EST = extrato seco total do leite.

Tabela 10 – Efeito dos genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína das dietas sobre a produção diária de leite e dos seus constituintes

Item	Genótipos				CV
	AA	EE	EF	AF	
Produção	----- g.dia ⁻¹ -----				
Leite	2856,16	2492,94	2939,73	2406,17	25,79
Proteína bruta	90,53	74,26	84,63	72,38	24,26
Proteína verdadeira	87,53	71,99	81,53	70,08	24,37
Gordura	111,62	91,45	109,37	86,98	29,26
Lactose	122,25	105,95	126,11	102,11	25,70
EST	360,62	305,31	356,58	291,73	25,82

Item	Nível de proteína (%)		CV
	14	17	
	Produção	----- g.dia ⁻¹ -----	
Leite	2543,78	2803,72	25,79
Proteína bruta	75,30	85,60	24,26
Proteína verdadeira	72,78	82,97	24,37
Gordura	93,79	105,92	29,26
Lactose	108,73	119,48	25,70
EST	310,02	347,10	25,82

Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem a 5% de probabilidade pelo teste SNK. CV - Coeficiente de variação. EST – Extrato seco total.

Não foi observado efeito significativo dos genótipos para α_{s1} -caseína sobre a produção diária de leite, estando em conformidade com o observado por Mahé *et al.* (1993). Barbieri *et al.* (1995) constataram produções de leite no genótipo AA significativamente inferior às dos genótipos AE, AF, EE e EF.

Apesar dos efeitos significativos dos genótipos analisados sobre o conteúdo de proteína bruta e verdadeira do leite não se observou diferenças na produção diária total destas variáveis.

4. Conclusões

Os genótipos AA, EE, EF e AF para α_{s1} -caseína do leite de cabras não apresentaram efeitos significativos sobre as eficiências de utilização da energia metabolizável (bruta e líquida) e de nitrogênio, bem como, sobre a produção de leite, sendo os efeitos principais evidenciados na composição de proteína bruta e verdadeira do leite.

Cabras pertencentes ao genótipo AA apresentaram maiores consumos de proteína metabolizável e valores de eficiência de utilização de proteína metabolizável com magnitude também superior aos dos demais genótipos revelando que possivelmente estes animais poderiam receber dietas com teores de proteína diferenciados, tal fato, ainda precisa ser mais estudado e esclarecido, para que se possa futuramente, adequar as dietas às reais demandas destes animais.

O teor de 17% de proteína bruta na dieta promoveu maiores perdas e menor eficiência de utilização da mesma.

Literatura Citada

ABDOUN, K.; STUMPF, F.; MARTENS, H. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. **Animal Health Research Reviews**, v. 7, n. 1-2, p. 43-59, 2007.

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. AFRC. **Energy and protein requirements of ruminants**. Wallingford, UK: CAB International, 1993. 159 p.

AMBROSOLI, R.; DiSTASIO, L.; MAZZOCCO, P. Content of α_{s1} -casein and coagulation properties in goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 24-28, 1988.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88, suppl. E9-E21, 2005.

BARBANO, D. M.; LYNCHY, J. L. Major advances in testing of dairy products: milk component and dairy product attribute testing. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1189-1194, 2006.

BARBIERI, M. E. ; MANFREDI, E. ; ELSÉN, J. M. ; RICORDEAU, G. ; BOUILLON, J. ; GROSCLAUDE, F. ; MAHE, M.-F. ; BIBE, B. Influence du locus de la caseine α_{s1} sur les performances laitières et les paramètres génétiques des chèvres de RACE Alpine. **Génétique Sélection Evolution**, v. 27, p. 437-450, 1995.

BARILLET, F. Genetic improvement for dairy production in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 70, p. 60-75, 2007.

BEVILACQUA, C.; FERRANTI, P.; GARRO, G.; VELTRI, C.; LAGONIGRO, R.; LEROUX, C. E.; ADDEO, F.; PILLA, F.; CHIANESE, L.; MARTIN, P. Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new alpha (s1) casein variant found in goat species. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 4, p. 1293-1303, 2002.

BOULANGER, A.; GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M. F. Polymorphisme des caséines α_{s1} et α_{s2} de la chèvre (*Capra hircus*). **Génétique Sélection Evolution**, v. 16, p. 157-175, 1984.

BRANCO, R. H. **Avaliação da qualidade da fibra sobre a cinética ruminal, consumo e eficiência de utilização de nutrientes em cabras leiteiras**. 2005. 151 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

CARVALHO, S.; RODRIGUES, M. T.; BRANCO, R. H.; RODRIGUES, C. A. F. Consumo de nutrientes, produção e composição do leite de cabras da raça Alpina alimentadas com dietas contendo diferentes teores de fibra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 1154-1161, 2006.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 5, p. 1751-1770, 2003.

COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 380 p.

COZENZA, G.; ILLARIO, R.; RANDO, A.; di GREGORIO, P.; MASINA, P.; RAMUNNO, L. Molecular characterization of the goat CSN1S101 allele. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 237-240, 2003.

DAVID, V. A.; DEUTCH, A. H.; Detection of bovine α_{s1} -casein genomic variants using the allele- specific polymerase chain reaction. **Animal Genetics**, v. 23, p. 425-429, 1992.

FONSECA, C. E. M.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C.; RODRIGUES, M. T.; MARCONDES, M. I.; PORTO, M. O.; PINA, D. S.; MORAES, K. A. K. Produção de leite em cabras alimentadas com diferentes níveis de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 1162-1168, 2006.

GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M. F.; BRIGNON, G.; Di STASIO, L.; JEUNET, R. A mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat α_{s1} -casein. **Génétique Sélection Evolution**, v. 19, p. 399-412, 1987.

GROSCLAUDE, F.; RICORDEOU, G.; MARTIN, P.; REMEUF, F.; VASSAL, L.; BOULLON, J. Du gène au fromage: Le polymorphisme de la caséine α_{s1} caprine, ses effets son evolution. **INRA Productions Animales**, v. 7, p. 3-19, 1994.

JONKER, J. S.; KOHN, R. A.; HIGH, J. Use of milk urea nitrogen to improve dairy cow diets. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 4, p. 939-946, 2002.

LAPIERRE, H; BERTHIAUME, R.; RAGGIO, G.; THIVIERGE, M. C.; DOEPEL, L.; PACHECO, D.; DUBREUIL, P.; LOBLEY, E. The route of absorbed nitrogen into milk protein. **Animal Science**, v. 80, n. 1, p. 11-22, 2005.

LEROUX, C.; MARTIN, P; MAHÉ, M. F.; LEVÉZIEL, H.; MERCIER, J. C. Restriction fragment length polymorphism identification of goat α_{s1} casein alleles: a potential tool in selection of individuals carrying alleles associated with a high level protein synthesis. **Animal Genetics**, v. 21, p. 341-351, 1990.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogenfractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, p. 347-358, 1996.

LU, C. D.; KAWAS, J. R.; MAHGOUB, O. G. Fibre digestion and utilization in goats. **Small Ruminant Research**, v. 60, p. 45-52, 2005.

LUO, J.; GOETSCH, A. L.; NSAHLAI, I. V. *et al.* Maintenance energy requirements of goats: predictions based on observations of heat and recovered energy. **Small Ruminant Research**, v. 53, p. 221-230, 2004a.

LUO, J.; GOETSCH, A.L.; NSAHLAI, I.V.; SAHLU, T; FERRELL, C. L.; OWENS, F. N.; GALYEAN, M. L.; MOORE, J.; JOHNSON, Z. B. Metabolizable protein requirements for maintenance and gain of growing goats. **Small Ruminant Research**, v. 53, p. 309-326, 2004b.

LUO, J.; GOETSCH, A. L.; SAHLU, T; NSAHLAI, I. V.; JOHNSON, Z. B.; MOORE, J. E.; GALYEAN, M. L.; OWENS, F. N.; FERRELL, C. L. Prediction of metabolizable energy requirements for maintenance and gain of preweaning, growing and mature goats. **Small Ruminant Research**, v. 53, p. 231-252., 2004c.

MAHÉ, M. F.; MANFREDI, E.; RICORDEAU, G.; PIACÈRE, A.; GROSCLAUDE, F. Effets du polymorphisme de la caséine α_{s1} caprine sur lès performances laitières: analyse intradescendance de boucs de race Alpine. **Génétique Sélection Evolution**, v. 26, p. 151-157, 1993.

- MAHÉ, M. F.; GROSCLAUDE, F. α_{S1} CND another allele associated with a decreased synthesis rate at the caprine α_{S1} casein locus. **Génétique Sélection Evolution**, v. 21, p. 127-129, 1989.
- MARTIN, P. Polymorphism génétique des lactoprotéines caprines. **Lait**, n. 73, p. 511-532, 1993.
- MARTIN, P.; OLLIVIER-BOUSQUET, M.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of caseins: a tool to investigate casein micelle organization. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 163-171, 1999.
- MARTIN, P. Genetic polymorphism: a way to fathom the casein micelle. In: Recent advances on goat milk quality, raw material for cheese making. **Proceedings of the Technical Symposium Held within the 7th International Conference on Goats**, 2000.
- MERTENS, D. R. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. **Journal of Animal Science**, v. 64, p. 1548-1558, 1987.
- MERTENS, D. R. Nonstructural and structural carbohydrates. In: VAN HORN, H. H.; WILCOX, C. J. **Large dairy herd management**. American Science Association. Champaign, 1992.
- MERTENS, D. R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1463-1481, 1997.
- MOE, P. W.; TYRRELL, H. F. The net energy value of feeds for lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 55, p. 945-958, 1972.
- MOORE, J. E; GOETSCH, A. L.; LUO, J; OWENS, F. N.; GALYEAN, M. L.; JOHNSON, Z. B.; SAHLU, T.; FERRELL, C. L. Prediction of fecal crude protein excretion of goats. **Small Ruminant Research**, v. 53, p. 275-292, 2004.
- MORAND-FEHR, P. Recent developments in goat nutrition and application: A review. **Small Ruminant Research**, v. 60, p. 25-43, 2005.
- MORGAN, F.; MICAULT, S.; FAUQUANT, J. Combined effect of whey protein and α_{S1} -casein genotype on the heat stability of goat milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 2, p. 64-68, 2001.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7. ed. Washington: National Academic Press, 2001. 387 p.

NSAHLAI, I. V.; GOETSCH, A. L.; LUO, J.; JOHNSON, Z.B.; MOORE, J.E.; SAHLU, T.; FERRELL, C. L.; GAYLEAN, M. L.; OWENS, F.N. Metabolizable energy requirements of lactating goats. **Small Ruminant Research**, v. 53, p. 253-273, 2004.

NEVEU, C.; RIAUBLANC, A.; MIRANDA, G.; CHICH, J. F.; MARIN, P. Is the milk secretion process observed in the goat species rooted in the perturbation of the intracellular transport mechanism induced by defective alleles at the α_{s1} -CN locus? **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 163-172, 2002.

PEREIRA, J. R. A.; ROSSI JR., P. **Manual prático de avaliação de alimentos**. Piracicaba: FEALQ, 1995. 25 p.

PIERRE, A.; Le QUERE, J.-L.; FAMELART, M.-H.; ROUSSEAU, F. **Cheeses from goat milks with or without α_{s1} -CN**. In: Production and Utilization of ewe and goat milk. Crete, Greece: Proc. of the IDF/Greek National Committee of IDF/CIRVAL Seminar. 1996. 322 p.

RAMUNNO, L.; COZENZA, G.; PAPPALARDO, M.; PASTORE, N.; GALLO, D.; Di GREGORIO, P.; MASINA, P. Identification of the goat *CSNIS1F* allele by means of PCR-RFLP method. **Animal Genetics**, v. 31, p. 342-343, 2000.

RAMUNNO, L.; COZENZA, G.; RANDO, A.; ILLARIO, R.; GALLO, D.; Di BERNARDINO, D.; MASINA, P. The goat α_{s1} casein gene: gene structure and promoter analysis. **Gene**, v. 334, p. 105-111, 2004.

SAEG. **Sistema para análises estatísticas e genéticas**. Viçosa: UFV, 2007.

SAHLU, T.; GOETSCH, A. L.; LUO, J.; NSAHLAI, I. V.; MOORE, J. E.; GALYEAN, M. L.; OWENS, F. N.; FERRELL, C. L.; JOHNSON, Z. B. Nutrient requirements of goats: developed equations, other considerations and future research to improve them. **Small Ruminant Research**, v. 53, p. 191-219, 2004.

SCHMIDELY, Ph; MESCHY, F.; TESSIER, J.; SAUVANT, D. Lactation response and nitrogen, calcium, phosphorus utilization of dairy goats differing by the genotype for α_{s1} -casein in milk, and fed diets varying in crude protein concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2399-2307, 2002.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos** (métodos químicos e biológicos). Viçosa: UFV, 2002. 235 p.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3562-3577, 1992.

STERN, M. D.; VARGA, G. A.; FIRKINS, J. H.; HUBER, J. T.; PALMQUIST, D. L. . Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2762-2786, 1994.

STORN, E.; ORSKOV, E. R. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. **British Journal of Nutrition**, v. 50, p. 463-470, 1983.

TAMMINGA, S. A Review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 3112-3124, 1996.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Comstock, 1994. 476 p.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VAN SOEST, P. J.; McCAMMON-FELDMAN, B.; CANNAS, A. The feeding and nutrition of small ruminants: application of the cornell discount system to the feeding of dairy goats and sheep. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURES. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, 1998. p. 95-104.

Efeitos dos genótipos para α_{s1} -caseína sobre o perfil de caseínas e ácidos graxos no leite de cabras submetidas a diferentes teores de proteína na dieta

Resumo: considerando-se a hipótese de que os genótipos para α_{s1} -caseína do leite teriam interferência sobre a composição e o perfil de caseínas e de ácidos graxos no leite de cabras formulou-se este experimento com o objetivo de avaliar estas variáveis em cabras com os genótipos AA, EE, EF e AF para α_{s1} -caseína e submetidas aos teores de 14% e 17% de proteína bruta na dieta. Para todas as variáveis avaliadas neste experimento não foram observados efeitos significativos ($P > 0,05$) da interação entre os níveis de proteína da dieta e os genótipos para α_{s1} -caseína. A concentração relativa de α_{s1} -caseína nos animais contendo alelos homozigotos de alta expressão de α_{s1} -caseína (AA) e nos heterozigotos alta-baixa (AF) apresentou-se como 24,88 e 21,80%, respectivamente, sendo superior aos dos animais dos demais genótipos. Os teores de proteína bruta do leite apresentados pelos animais do genótipo AA foram significativamente superiores apenas aos dos animais do genótipo EF, mas numericamente observou-se que estes foram superiores aos dos genótipos EE, EF e AF, em respectivamente, 5,8, 9,2 e 4,8%. A proteína verdadeira do leite (g L^{-1}) apresentou-se superior nos animais do genótipo AA em relação à dos animais dos genótipos EE e EF, em respectivamente, 5,5 e 9,3%. Nos genótipos homozigotos AA e EE observaram-se os níveis de expressão de α_{s1} -caseína de 6,10 e 3,60 g/L de leite, podendo-se inferir que a expressão por alelo, nestes casos, foi de respectivamente 3,05 e 1,8 g/L de leite. Os animais do genótipo AA apresentaram os menores teores de κ -caseína e este fato associado a um maior conteúdo de α_{s1} -caseína pode estar relacionado ao maior rendimento industrial atribuído ao leite dos animais deste genótipo. Não foram observados efeitos dos teores de proteína bruta da dieta sobre o *porcentual* de proteína verdadeira, proteína bruta e caseínas totais e individuais no leite. O perfil médio dos ácidos graxos no leite das cabras, os teores totais de ácidos graxos saturados e insaturados, mono e polinsaturados não apresentaram efeitos significativos dos genótipos analisados e das concentrações de proteína na dieta.

Palavras-chave: caprinos, proteína bruta da dieta, composição de leite, cromatografia líquida, cromatografia gasosa.

Effect of genotypes for α_{s1} -casein on fatty acids and casein profile in dairy goat milk submitted to different protein level in the diet

Abstract – Taking into consideration the hypothesis that genotypes for α_{s1} -casein in milk may interfere on milk composition for dairy goats the present experiment objected to evaluate milk composition and profile of both casein and fatty acids by using goats of different genotypes named AA, EE, EF and AF for the α_{s1} -casein when fed diets with 14 and 17% CP. No significant effect ($P > 0.05$) was observed as the interaction level of protein and genotype was tested for the independent variables studied. The relative concentrations of α_{s1} -casein in animals carrying both homozygous alleles of high expression (AA) and for those heterozygous for high and low expression (AF) were of 24.88 and 21.80%, respectively, and considered higher as compared to EE and EF genotypes. *Percentage* of milk protein for animals of the AA genotype was higher as compared to those with the EF genotype but similar to goats carrying the EE and AF genotype. Concentration of true protein was higher for the AA animals as compared to those carrying the EE and EF genotype by 5.5 and 9.3%, respectively. For animals of homozygous genotypes, named AA and EE, levels of α_{s1} -casein expression were 6.10 and 3.60 g/L of milk, respectively, which leads to assume that the expression per allele in both cases were of 3.05 and 1.8 g/L of milk. Goats of AA genotype presented lower levels of k-casein and that fact associated with a higher concentration of α_{s1} -casein may be related to the higher industrial output attributed to the milk from animals of that genotype. No difference was found as levels of protein on diet were compared for milk protein *percentage* and total casein concentration. Milk fatty acids profile, the ratio of saturated and unsaturated fatty acids concentration and mono and polyunsaturated fatty acids were similar as both main effects of genotypes and level of protein were studied but concentration of C6:0, C8:0, and C17:0 were higher for animals fed diet with 14% CP.

Key words: goats, crude protein, milk composition, liquid chromatography and gas chromatography

1. Introdução

As caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β e κ) são as principais proteínas presentes no leite de espécies ruminantes. As proteínas do leite de cabra são similares às do leite de vaca quanto à classificação, mas, o conteúdo e a proporção destas diferem entre estas espécies.

O locus do gene da α_{s1} -caseína apresenta elevado polimorfismo na espécie caprina, determinando diferenças qualitativas e quantitativas no perfil de proteínas do leite. A identificação dos alelos do gene da α_{s1} -caseína e de seus níveis de expressão, classificados em A, B, C, L e H (alta), E e I (intermediária), D, F e G (baixa) ou O (nula) permite ser explorado no auxílio à seleção genética (Martin *et al.*, 1999).

A concentração de α_{s1} -caseína no leite de cabra pode variar entre os genótipos de 0 a 25% do total de caseínas enquanto que no leite de vaca esta constitui 38% do total de caseínas (Martin, 1997). A concentração de α_{s1} -caseína pode variar de 0 a 3,6 g/L de leite/alelo entre os genótipos, ou seja, de 0 a 7,2 g/L de leite, sendo que, nos genótipos de maior produção de α_{s1} -caseína, têm-se observado *porcentuais* de proteínas totais e gorduras no leite também superiores (Chilliard *et al.*, 2003).

Considera-se a ocorrência 7 classes de proteínas (A, B, C, D, E, F e G) e quatro níveis de expressão da α_{s1} -caseína no leite da espécie caprina. O nível de alta expressão, associado aos alelos A, B1, B2, B3, B4, C, L e H, apresenta-se com 3,6-4,2 g de α_{s1} -caseína/litro de leite/alelo, o nível de expressão intermediária (alelo E e I) com 1,6 g/litro de leite/alelo, o de baixa expressão (alelos D, F e G) com 0,6 g/litro de leite/alelo (Mahé e Grosclaude, 1989) e o nível nulo (alelo O ou N) sem expressão de α_{s1} -caseína (Grosclaude *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1999; Cozenza *et al.*, 2003). O grau de expressão dos demais alelos não foi encontrado na literatura consultada.

A utilização de técnicas de cromatografia líquida de fase reversa para a separação e quantificação das frações de caseínas do leite tem sido descrita na literatura (Mikkelsen *et al.*, 1987; Jaubert e Martin, 1992; Feligini *et al.*, 2005). A combinação de análises bioquímicas às técnicas de análise molecular permite uma efetiva caracterização das variantes alélicas do locus da α_{s1} -caseína e o reconhecimento dos seus efeitos nos níveis de expressão das frações de caseína no leite que não é possível pela análise isolada do DNA (Felilgini *et al.*, 2005).

Os conteúdos de proteínas e lipídeos do leite de cabra constituem fatores determinantes da qualidade deste e de seus derivados. A diversidade genética das caseínas no leite da espécie caprina associada à existência de uma variabilidade quantitativa das frações de proteínas e gorduras oferece uma oportunidade para a seleção com fins de melhoria das características físico-químicas, organolépticas, nutricionais e tecnológicas do leite de cabra.

Diferenças nos teores de gordura no leite provenientes de animais de diferentes genótipos para α_{s1} -caseína têm sido relatadas (Schmidely *et al.*, 2002; Chilliard *et al.*, 2003) e no perfil de ácidos graxos (Schmidely *et al.*, 2002; Chilliard *et al.*, 2006).

O perfil de ácidos graxos característico do leite de cabra, particularmente rico em ácidos graxos de cadeia curta e média, eleva este produto à condição de alimento funcional, devido a sua maior digestibilidade (Chilliard, 1997; Alférez *et al.*, 2001), propriedades terapêuticas relacionadas à diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos (López-Aliaga *et al.*, 2005). Sendo assim, a utilização da cromatografia gasosa para a comparação do perfil de ácidos graxos entre animais de diferentes genótipos para α_{s1} -caseína pode constituir importante ferramenta para se inferir sobre a influência destes na digestibilidade do produto lácteo caprino e no seu papel como alimento funcional.

A composição de ácidos graxos do leite tem recebido especial atenção por seus efeitos sobre a saúde humana e características organolépticas e podem ser influenciados por diversos fatores tais como estágio de lactação, raças, variação genética, idade e composição de alimentos (Palmquist *et al.*, 1993).

O desenvolvimento de ferramentas para a seleção de animais, com base em genótipos para α_{s1} -caseína que sabidamente interferem em características nutricionais, tecnológicas do leite destaca-se dentre as áreas da caprinocultura que necessitam de pesquisas no Brasil. Verifica-se, desta forma, a necessidade de se implementar a utilização de métodos analíticos, tais como, a cromatografia líquida de alta eficiência e fase reversa e a cromatografia gasosa para caracterizar e quantificar as caseínas e o perfil de ácidos graxos associados a esta variabilidade genética.

Considerando-se os possíveis efeitos dos genótipos para α_{s1} -caseína do leite sobre a composição e o perfil de caseínas e de ácidos graxos no leite de cabras objetivou-se avaliar estas variáveis em cabras com os genótipos AA, EE, EF e AF para α_{s1} -caseína e submetidas aos teores de 14 e 17% de proteína bruta na dieta.

2. Material e Métodos

2.1. Animais, local e delineamento experimental

Por intermédio de uma parceria entre a Universidade Federal de Viçosa e a Unioeste-PR, as cabras lactantes utilizadas neste experimento foram previamente selecionadas quanto aos genótipos para α_{s1} -caseína, a saber: homozigotos para alta expressão AA (n = 8), homozigotos para expressão intermediária EE (n = 11), heterozigoto de média e baixa expressão EF (n = 9) e heterozigoto para alta e baixa expressão AF (n = 12). No presente trabalho, os alelos identificados como A representam qualquer um dos alelos de alta expressão (A ou B com menor probabilidade de ser C ou demais alelos de alta expressão).

As coletas das amostras e dos dados de produção foram conduzidas no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Viçosa, no período de 15 de maio a 15 de julho de 2005.

Duas dietas experimentais isoenergéticas e isofibrosas foram formuladas visando atender as exigências de cabras em lactação segundo o AFRC 1993, apresentando concentrações de 14 e 17% de proteína bruta na matéria seca, sendo o valor de 17% superior ao recomendado naquela publicação.

No ensaio experimental foram utilizadas quarenta cabras das raças Alpinas e Saanen, pluríparas e lactantes, peso médio de $52,70 \pm 10,74$, com aproximadamente 40 dias de lactação e produção média de $2,59 \pm 0,75$ L de leite/dia e estas foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, com um arranjo fatorial de 2 x 4, sendo dois níveis de proteína da dieta e quatro genótipos (AA, EE, EF e AF).

2.2. Identificação dos alelos da α_{s1} -caseína

As análises genéticas foram realizadas a partir de leucócitos obtidos através da centrifugação (2.500 xg por 10 minutos) das amostras individuais de sangue coletadas por meio de punção da veia jugular. Uma alíquota destes leucócitos foi encaminhada ao Laboratório de Genética da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste.

Amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos com o tampão de extração descrito por Muhammad *et al.* (1994), com modificações na execução do

protocolo. Assim, 80 μL de leucócitos foram adicionados a 500 μL do tampão de extração e mantidos por uma hora a 65 °C, com agitações ocasionais. Após o resfriamento a temperatura ambiente, 500 μL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) foram adicionados com subsequente agitação. Após a centrifugação por 10 minutos a 10.000 $\times g$, o sobrenadante foi transferido para tubos limpos e a precipitação do DNA foi realizada com a adição de 250 μL de isopropanol a 4 °C e mantido a esta temperatura por mais 30 minutos. O DNA foi precipitado por centrifugação a 12.000 $\times g$ por 20 minutos e lavado por duas vezes em etanol 75%. O DNA, dissolvido em água ultra-pura, foi quantificado a 260 e 280 nm.

Para a amplificação dos fragmentos de DNA contendo as regiões específicas do gene da α_{s1} -caseína foram desenhados *primers* baseados nas seqüências já disponíveis no GenBank (nº acesso AJ504710). O sistema de amplificação consistiu, além dos *primers* específicos e do DNA genômico, de dNTPs, *Taq* DNA polimerase, MgCl_2 , Tris-HCl, KCL, e água ultra-pura, em um volume final de 20 μL . O programa de amplificação utilizado no termociclador constou de três etapas que compreenderam: desnaturação da fita molde, anelamento dos *primers* e extensão da fita pela DNA polimerase. Estes passos foram repetidos para obtenção de quantidade suficiente de fragmentos.

Após a amplificação, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 5% e corado com nitrato de prata. Para a análise do alelo F, os fragmentos de DNA adequadamente amplificados foram, quando necessário, clivados com enzimas de restrição *XmnI* (Ramunno *et al.*, 2004). Alguns fragmentos foram sequenciados em seqüenciador automático MegaBACE 1000 Amersham Life Science – USA no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG.

2.3. Dietas experimentais

As dietas experimentais tiveram como forrageira o feno de capim-tifton 85 (*Cynodon spp.*), mistura concentrada consistindo de farelo de soja (*Glycine max* L.), fubá de milho (*Zea mays* L.), e farelo de trigo (*Triticum aestivum*) além da adição de minerais. As dietas foram fornecidas duas vezes ao dia as 7h e 30 min e 16h e 30 min.

As proporções dos ingredientes nas dietas experimentais, expressas na matéria seca e a composição bromatológica dos ingredientes encontram-se descritas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Proporções dos ingredientes nas dietas experimentais

Ingrediente	Dieta 14% PB	Dieta 17% PB
	-----% MS-----	
Feno de capim-tifton 85	42,11	42,11
Farelo de soja	7,12	14,97
Fubá de milho	36,00	30,15
Farelo de trigo	12,00	10,00
Calcário calcítico	0,60	0,60
Fosfato bicálcico	1,17	1,17
Mistura mineral ^{1/}	1,00	1,00

^{1/} Mistura mineral: 0,32% de sulfato ferroso; 0,48% de sulfato de cobre; 0,71% de sulfato de manganês; 2,67% de sulfato de zinco; 0,02% de sulfato de cobalto; 0,0125% de iodato de potássio; 0,006% de selenito de sódio; e 95,78% de cloreto de sódio.

Tabela 2 – Composição bromatológica dos ingredientes

Item	Ingredientes			
	Feno Capim-Tifton 85	Farelo de Soja	Fubá de Milho	Farelo de Trigo
Composição química				
MS (g.kg ⁻¹)	816,9	876,2	888,2	888,3
MO (g.kg ⁻¹)	944,4	928,1	961,3	926,7
PB (g.kg ⁻¹)	135,8	499,7	82,4	155,8
EE (g.kg ⁻¹)	16,7	12,1	32,2	29,2
CT (g.kg ⁻¹)	791,9	425,1	851,2	749,9
CNF (g.kg ⁻¹)	63,3	308,1	722,3	292,4
FDN (g.kg ⁻¹)	728,6	117	128,9	457,5
FDNc (g.kg ⁻¹)	717,0	79,6	100,7	358,6
FDNcp (g.kg ⁻¹)	664,6	73,4	93,8	327,5
FDA (g.kg ⁻¹)	312,2	57,5	25,1	114,6
FDAi (g.kg ⁻¹)	146,1	25,2	38,6	24,9
NIDN (g.kg ⁻¹ NT)	386,1	12,4	84	199,4
NIDA (g.kg ⁻¹ NT)	21,5	9,6	11	65,7
LDA (g.kg ⁻¹)	33,0	8,6	2,8	21,4
Cinzas (g.kg ⁻¹)	55,6	71,9	38,7	73,3
Ca (g.kg ⁻¹)	3,2	2,9	0,8	1,5
P (g.kg ⁻¹)	2,3	2,1	7,1	9,9
Valores estimados de energia disponível				
NDT (%)	60,65	80,27	85,72	70,21
EM (Mcal.kg ⁻¹)	2,25	3,55	3,2	2,69
EL (Mcal.kg ⁻¹)	1,38	2,26	2,04	1,67

MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; CT = carboidratos totais; CNF = carboidratos não-fibrosos; FDN = fibra em detergente neutro; FDNc = FDN corrigida para cinzas; FDNcp = FDN corrigida para cinzas e proteína; FDA = fibra em detergente ácido; FDAi = FDA indigerível; NT = nitrogênio total; NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; LDA = lignina em detergente ácido; Ca = cálcio; P = fósforo; NDT = nutrientes digestíveis totais; EM = energia metabolizável; e EL = energia líquida.

A composição bromatológica das dietas experimentais foi calculada com base nos valores das análises laboratoriais dos alimentos e da proporção dos ingredientes encontra-se descrita na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição bromatológica das dietas experimentais

Item	Dietas Experimentais	
	14% PB	17%PB
	Composição	
MS (g.kg ⁻¹)	865,8	865,3
MO (g.kg ⁻¹)	930,5	928,6
PB (g.kg ⁻¹)	142,5	173,8
EE (g.kg ⁻¹)	23,2	21,6
CT (g.kg ⁻¹)	764,9	733,2
CNF (g.kg ⁻¹)	341,1	316,9
FDN (g.kg ⁻¹)	423,7	416,2
FDNf (g.kg ⁻¹)	314,1	314,1
FDA (g.kg ⁻¹)	161,5	162,2
FDAi (g.kg ⁻¹)	81,7	80,9
NIDN (g.kg ⁻¹ NT)	221,5	213,6
NIDA (g.kg ⁻¹ NT)	21,8	20,6
LDA (g.kg ⁻¹)	18,4	18,5
Cinzas (g.kg ⁻¹)	51,8	53,7
Ca (g.kg ⁻¹)	7,3	7,5
P (g.kg ⁻¹)	6,0	5,6
	Valores estimados de energia disponível	
NDT (g.kg ⁻¹)	704,2	702,8
EL (Mcal.kg ⁻¹)	1,69	1,71
EM (Mcal.kg ⁻¹)	2,68	2,72

MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; CT = carboidratos totais; CNF = carboidratos não-fibrosos; FDN = fibra em detergente neutro; FDNf = FDN proveniente da forragem; FDA = fibra em detergente ácido; FDAi = FDA indigerível; NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; LDA = lignina em detergente ácido; Ca = cálcio; P = fósforo; NDT = nutrientes digestíveis totais; EM = energia metabolizável; e EL = energia líquida.

2.4. Separação e quantificação das caseínas do leite

Amostras individuais de 50 mL de leite foram coletadas proporcionalmente às produções das ordenhas da manhã e da tarde. Inicialmente as amostras foram centrifugadas a 2.500 xg por 30 minutos para a separação da gordura. Após o desnate as amostras de leite foram divididas em duas alíquotas, uma destinada às análises dos teores de N total (NT), proteína bruta (NT x 6,38), e nitrogênio não-protéico (amostras precipitadas com ácido tricloroacético a 25%) pelo método micro-Kjeldahl e a proteína

verdadeira calculada pela diferença entre o teor de proteína bruta total e de NNP e a outra para a precipitação das caseínas (Barbano e Lynch, 2006).

Após o desnaté, alíquotas de 80 mL de leite foram submetidas à precipitação isoelétrica no pH 4,6 por adição de ácido acético 1M e centrifugadas por 20 minutos à 500 *xg*. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e adicionou-se solução de NaOH 1M até o pH 7. Os procedimentos de precipitação e lavagem foram repetidos por três vezes e as caseínas obtidas foram congeladas e posteriormente liofilizadas (Trujillo *et al.*, 2000). O peso das caseínas liofilizadas foi corrigido para 1 litro fornecendo as caseínas totais do leite.

As frações α_{s1} , α_{s2} , β e κ da caseína foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência e fase reversa conforme descrito por Moatsou *et al.* (2004).

Alíquotas de 30 mg de caseínas liofilizadas foram dissolvidas em 2 mL de solução tampão (100mM de tris (hidroxiaminometano), 8M de uréia, 13 g/L de citrato de trissódio e 10 mM de ditrioteitol ajustado para o pH 7 com HCl), e mantidas em temperatura de 37 °C durante 60 minutos. Em seguida, adicionou-se 18 mL do solvente A (solução de 1mL/L de ácido trifluoracético em água ultra pura) adicionado de 6M de uréia e o pH ajustado para 2,2 com ácido trifluoracético a 50%. Posteriormente as amostras foram filtradas em filtro Millipore de 0,45 μ m.

Alíquotas de 20 μ L das amostras foram analisadas no cromatógrafo líquido, modelo GBC LC1445 equipado com bomba LC1110 em coluna Vydac C4 214, TPM5415 à temperatura ambiente.

Os solventes A (1 mL/L de ácido trifluoracético em água ultra pura) e B (0,96 mL ácido trifluoracético, 800 mL de acetonitrila, 200 mL de água ultra pura) utilizados na eluição foram previamente filtrados em filtro Millipore de 0,45 μ m. O fluxo utilizado na coluna cromatográfica foi de 1 mL/minuto e o gradiente linear do solvente B de 370-530 mL/L durante os 30 minutos subsequentes à injeção da amostra.

Os picos correspondentes às frações de caseínas foram identificados por absorvância na luz ultravioleta a 214 nm. Na análise dos cromatogramas obteve-se a identificação e quantificação das caseínas individuais pela área do pico correspondente em relação ao valor total de caseínas, bem como a comparação com os padrões de caseínas totais e individuais utilizados (Sigma).

As proporções obtidas para as caseínas individuais por cromatografia líquida foram utilizadas para calcular as quantidades efetivas das caseínas no leite a partir do conteúdo de caseínas totais liofilizadas.

Os dados obtidos foram analisados por meio do programa computacional, Sistema para análises Estatísticas-SAEG, versão 9.1 (SAEG, 2007), utilizando-se o procedimento de análise de variância (ANOVA) e o teste Student-Neuman-Keuls (SNK), a 5% de probabilidade, para comparação das médias dos tratamentos.

2.5. Separação e quantificação do perfil de ácidos graxos do leite

Para determinação do perfil de ácidos graxos, três coletas de amostras individuais de leite foram realizadas. O leite integral resfriado foi submetido à extração da gordura no mesmo dia da coleta, conforme metodologia descrita por Feng *et al.* (2004). Aliquotas de 30 mL foram centrifugadas a 17.800 xg por 20 minutos a 1 °C (HIMAC-CR21) formando um creme de leite na camada superior (*fat cake*), o qual foi retirado, ainda congelado, com auxílio de palhetas plásticas e armazenadas em frascos de vidro ambar em temperatura de -10 °C.

Posteriormente, transferiu-se aproximadamente 1 g do *fat cake* para tubos de polipropileno de 1,5 mL, que foram submetidos à centrifugação a 17.000 xg por 20 minutos em temperatura ambiente (Force14 - Denver Instrument Company) para obtenção da fração lipídica que permaneceu na parte superior. Essa fração foi retirada e transferida, com auxílio de micropipetas, para um novo tubo de polietileno de 1,5 mL e armazenadas a -10 °C até a etapa de preparação dos ésteres metílicos.

A preparação dos ésteres metílicos foi realizada por meio da modificação do método proposto por Hartman e Lago (1986). Aliquotas de 40µL da gordura foram transferidas para tubos de ensaio com tampa rosqueada. Os lipídios foram hidrolisados com adição de 2,5 mL de solução de NaOH 0,5 N em metanol sob aquecimento a 70°C por 15 minutos, para completa saponificação da amostra e obtenção de ácidos graxos livres. Após resfriamento, foram adicionados 7,5 mL de reagente de esterificação (HCl 0,5 N em metanol), aquecendo-se a 70 °C por 10 minutos para formação dos ésteres metílicos. Após resfriamento, acrescentaram-se 2 mL de solução de NaCl 20% e 2 mL de hexano (grau HPLC). O tubo foi agitado em *vortex* e aproximadamente 1mL da fase superior contendo os ésteres metílicos foi coletado. Adicionou-se mais 1mL de hexano (grau HPLC), coletando-se novamente 1mL da fase superior. Os ésteres

metílicos foram acondicionados em vidros (cor âmbar) e estocados a -18 °C, para a análise.

As análises dos ésteres metílicos dos ácidos graxos da gordura do leite foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UFV em cromatógrafo a gás modelo Finnigan-9001, equipado com detector de ionização de chama (FID). Para registro e análise dos cromatogramas, o aparelho foi acoplado a um microcomputador, utilizando-se o programa Labquest[®]. Os componentes dos ésteres metílicos foram separados em coluna capilar SPTM-2560 (100 m x 0,25 mm x 0,02 µm; Supelco, Inc., Bellefonte, PA).

Para a separação cromatográfica, 1 µL de amostra foi injetado com auxílio de seringa de 10 µL (Hamilton[®]) em sistema *Split* com razão 1:100. O gás hélio foi utilizado como carreador com velocidade linear programada para 20 cm/s e, como *make-up*, com vazão regulada para 25,6 mL/min. A purga foi ajustada para vazão de 3,3 mL/min. As vazões do hidrogênio e ar sintético foram mantidas em 17,9 e 138 mL/min., respectivamente.

As temperaturas do injetor e do detector foram controladas para serem isotérmicas em 260 °C. A temperatura inicial do forno foi de 100 °C (mantida por 5 minutos), aumentando em 4 °C por minuto até atingir 240 °C, permanecendo nesta temperatura por mais 20 minutos, totalizando 60 minutos de análise.

O pico de cada ácido graxo foi identificado pela comparação com o tempo de retenção dos picos presentes no padrão de lipídios, composto por uma mistura de ácidos graxos (Supelco 37 – Component Fame Mix – nº catálogo: 47885-U). Para a integração da área dos picos, cada cromatograma foi integrado individualmente, por meio do Software Labquest[®], de modo que a área mínima para integração correspondeu ao valor de 0,1% da área total obtida no cromatograma.

A avaliação da influência dietética do leite de cabra na susceptibilidade de distúrbios cardiovasculares foi feita adotando-se alguns índices citados na literatura:

$$\text{Sat : Insat} = \frac{\text{Total de Saturados}}{\text{Total de Insaturados}}$$

$$\text{Poli : Sat} = \frac{\text{Total de Insaturados}}{\text{Total de Saturados}}$$

$$\text{IA} = \frac{\text{C12:0} + (4 \times \text{C14:0}) + \text{C16:0}}{\text{Total de Insaturados}}, \text{ em que IA= índice de aterogenicidade.}$$

Os dados obtidos foram analisados por meio do programa computacional, Sistema para análises Estatísticas-SAEG, versão 9.1 (SAEG, 2007), utilizando-se o procedimento de análise de variância (ANOVA) e o teste Student-Neuman-Keuls (SNK), a 5% de probabilidade, para comparação das médias dos tratamentos.

3. Resultados e Discussão

Para todas as variáveis avaliadas neste experimento não foram observados efeitos significativos ($P > 0,05$) da interação entre os níveis de proteína da dieta e os genótipos para α_{s1} -caseína, sendo assim os efeitos das referidas variáveis sobre as características avaliadas estão apresentados isoladamente nas tabelas que se seguem.

As concentrações médias das caseínas α_{s1} , α_{s2} , β e κ calculadas em cada um dos genótipos estudados, bem como seus desvios padrões e coeficientes de variação estão relatados na Tabela 4.

Tabela 4 – Efeito dos genótipos para α_{s1} -caseína e do nível de proteína nas dietas sobre as concentrações médias de caseínas do leite de cabra

Item	Genótipos				CV
	AA	EE	EF	AF	
Caseínas					
α_{s1} (%)	24,88 ^a	15,50 ^b	14,34 ^b	21,80 ^a	21,83
α_{s2} (%)	13,70	9,93	9,68	9,64	46,28
β (%)	49,70 ^b	60,27 ^a	55,68 ^a	50,72 ^b	11,31
κ (%)	11,72	14,30	19,41	18,42	43,13
	Nível de Proteína (%)				
	14		17		
Caseínas					
α_{s1} (%)		17,99		20,27	21,83
α_{s2} (%)		10,54		10,93	46,28
β (%)		54,39		53,95	11,31
κ (%)		17,08		14,84	43,13

Médias na linha seguidas de letras distintas diferem a 5% de probabilidade pelo teste SNK.

Diferenças significativas na concentração de α_{s1} -caseína foram observadas entre os genótipos, sendo esta superior ($P < 0,0001$) nos animais contendo alelos homozigotos de alta expressão de α_{s1} -caseína (AA) e nos heterozigotos alta-baixa (AF). A concentração média de α_{s1} -caseína nos animais do genótipo AA de 24,88 % mostrou-se

muito próxima dos dados da literatura que relatam 25% como o teor de α_{s1} -caseína associado aos genótipos de alta expressão. Morgan *et al.* (2001) relataram para animais do genótipo AA concentrações percentuais de α_{s1} , α_{s2} , β e κ caseínas de respectivamente, 25,9, 14,6, 46,8 e 12,7, sendo estas bastante próximas das observadas neste experimento.

Comparando-se os genótipos homocigotos AA e EE pode-se constatar a redução nas concentrações relativas de α_{s1} -caseínas no leite dos animais contendo alelos homocigotos de média expressão (EE), apesar de não serem na mesma proporção do aumento quantitativo nas concentrações das demais caseínas, este fenômeno têm sido relatado como determinante das diferenças na estrutura das micelas de caseínas e nas suas propriedades de coagulação e de digestibilidade. A proporção das caseínas do leite apresenta importante relação com as características tecnológicas dos produtos lácteos, por serem as principais proteínas coaguláveis do leite. A produção de queijo baseia-se na liberação do domínio polar das κ -caseínas e conseqüente exposição das caseínas sensíveis ao cálcio (α_{s1} , α_{s2} e β), aumentando assim a superfície hidrofóbica das micelas e favorecendo a coagulação das mesmas (Moioli *et al.*, 1998).

Apesar de considerar-se os efeitos isolados dos genótipos para α_{s1} -caseína sabe-se que as caseínas α_{s1} , β , α_{s2} e κ são codificadas, respectivamente, pelos genes *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* e *CSN3* localizados em *cluster* no cromossomo 6 caprino (Rijnkels, 2002; Cozenza *et al.*, 2003; Szymanowska *et al.*, 2003). A possível interferência dos demais genótipos sobre as caseínas analisadas não pode ser quantificada a menos que a análise genética abrangesse todo o haplótipo.

Segundo Szymanowska *et al.* (2003) a estreita relação de proximidade e similaridade destes genes pode influenciar a herança comum destes, acompanhada apenas por pequenos fenômenos de recombinação. Ojala *et al.* (1997) relataram em estudos com bovinos dos efeitos dos genótipos das caseínas κ , β e α_{s1} segundo modelo estatístico de múltiplas características que, alguns genótipos sem efeitos isolados significativos sobre o conteúdo de proteínas do leite quando associados resultaram em aumentos efetivos, sendo este fato considerado um forte indício da ocorrência de efeitos epistáticos entre os *loci* destes genes.

Não foram observados efeitos das concentrações de 14 e 17% de proteína bruta das dietas sobre a proporção de caseínas no leite das cabras experimentais, nem mesmo interação entre genótipo e proteína da dieta. Desta forma, o genótipo para α_{s1} -caseína a

exemplo do observado para os teores de proteína bruta e proteína verdadeira do leite foi significativamente responsável pelas variações observadas.

Os efeitos dos genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína das dietas sobre os conteúdos de proteína bruta e verdadeira do leite obtidos pelos métodos micro-Kjeldahl e frações de caseínas obtidas por HPLC de fase reversa encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Efeito dos genótipos para α_{s1} -caseína e dos níveis de proteína das dietas sobre os conteúdos de proteína bruta e verdadeira do leite e frações de caseínas

Item	Genótipos				CV
	AA	EE	EF	AF	
PB _L (g.L ⁻¹)	31,68 ^a	29,94 ^{ab}	29,00 ^b	30,24 ^{ab}	5,42
PV _L (g.L ⁻¹)	30,63 ^a	29,04 ^b	28,03 ^b	29,28 ^{ab}	4,92
PV _L (%PB)	96,69	96,99	96,66	96,83	1,23
Caseínas (g.L ⁻¹)	24,50 ^a	23,23 ^{ab}	22,43 ^b	23,43 ^{ab}	4,92
α_{s1} (g.L ⁻¹)	6,10 ^a	3,60 ^c	3,22 ^d	5,10 ^b	4,98
α_{s2} (g.L ⁻¹)	3,35 ^a	2,31 ^b	2,19 ^c	2,14 ^c	4,68
β (g.L ⁻¹)	12,18 ^b	13,99 ^a	12,55 ^b	11,88 ^b	4,91
κ (g.L ⁻¹)	2,87 ^c	3,32 ^b	4,46 ^a	4,31 ^a	5,24
	Nível de Proteína (%)				
	14	17			
PB _L (g.L ⁻¹)	29,84	30,60		5,42	
PV _L (g.L ⁻¹)	28,85	29,64		4,92	
PV _L (%PB)	96,68	96,86		1,23	
Caseínas (g.L ⁻¹)	23,09	23,71		4,92	
α_{s1} (g.L ⁻¹)	4,45	4,56		4,98	
α_{s2} (g.L ⁻¹)	2,47	2,53		4,68	
β (g.L ⁻¹)	12,48	12,83		4,91	
κ (g.L ⁻¹)	3,69	3,79		5,24	

Valores referentes às médias das nove amostras individuais dos quarenta animais experimentais. Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem a 5% de probabilidade pelo teste SNK. CV = coeficiente de variação; PB_L = proteína bruta do leite; e PV_L = proteína verdadeira do leite.

Os teores de proteína bruta apresentados pelos animais do genótipo AA foram significativamente superiores apenas aos dos animais do genótipo EF, mas numericamente observou-se que estes foram superiores aos dos genótipos EE, EF e AF, em respectivamente, 5,8, 9,2 e 4,8%.

A proteína verdadeira do leite (g L⁻¹) apresentou-se superior nos animais do genótipo AA em relação à dos animais dos genótipos EE e EF, em respectivamente, 5,5 e 9,3%.

Nos genótipos estudados neste experimento AA, EE, EF e AF estão presentes alelos com níveis de expressão para α_{s1} -caseína no leite de cabra descritos na literatura, sendo o alelo A de alta expressão de α_{s1} -caseína e associado com o nível de 3,6 a 4,2 g de α_{s1} -caseína/litro de leite, o alelo E de expressão intermediária com 1,6 g de α_{s1} -caseína/litro de leite e o alelo F de baixa expressão com 0,6 g de α_{s1} -caseína /litro de leite (Mahé e Grosclaude, 1989; Ramunno *et al.*, 2000; Neveu *et al.*, 2002).

Nos genótipos homozigotos AA e EE observaram-se os níveis de expressão de α_{s1} -caseína de 6,10 e 3,60 g/L de leite, podendo-se inferir que a expressão por alelo, nestes casos, foi de respectivamente 3,05 e 1,8 g/L de leite.

Análises morfológicas, em células epiteliais do tecido mamário, de cabras homozigotas para os alelos E, F e nulo para α_{s1} -caseína, revelaram aumentos relativos de volume no retículo endoplasmático rugoso e vesículas do complexo de Golgi em relação aos dos genótipos de alta expressão para α_{s1} -caseína (AA), possivelmente, devido ao acúmulo das demais caseínas produzidas. Mediante os dados morfológicos sugeriu-se uma disfunção no mecanismo de secreção das caseínas totais dependente da participação da α_{s1} -caseína, já que o mesmo acúmulo não foi observado em cabras com genótipos nulos para β -caseína (Chanat *et al.*, 1999). Associando este relato ao menor conteúdo de α_{s1} -caseína e níveis aumentados das caseínas β e κ no leite de animais portadores dos alelos mutante E e F, sugere-se a existência de algum mecanismo compensatório, ou mesmo de superexpressão dos genes da β e κ -caseína.

Os animais do genótipo AA apresentaram os menores teores de κ -caseína e este fato associado a um maior conteúdo de α_{s1} -caseína e ao menor tamanho das micelas pode estar relacionado ao maior rendimento industrial atribuído ao leite dos animais deste genótipo.

A κ -caseína é considerada fundamental no processamento industrial do leite e no rendimento pela sua efetiva participação no mecanismo de produção de queijos que decorre da coagulação do leite devido à liberação do domínio polar das κ -caseínas, localizadas externamente nas micelas de caseínas, e conseqüente aumento da superfície hidrofóbica das micelas, diminuindo a repulsão entre as mesmas e favorecendo a precipitação (Moioli *et al.*, 1998). Sendo assim um menor conteúdo de κ -caseína facilita a coagulação das micelas de caseína.

A avaliação do perfil de caseínas do leite das cabras dos genótipos estudados mostrou-se complementar à análise genética realizada previamente e forneceu

informações de grande valia tanto para a caracterização da composição do leite, quanto de seus potenciais efeitos sobre as propriedades nutricionais, tecnológicas e terapêuticas.

Não foram observados efeitos dos teores de proteína bruta da dieta sobre o *porcentual* de proteína verdadeira, proteína bruta e caseínas totais e individuais no leite. Segundo o NRC (2001), a proteína bruta dietética apresenta baixa correlação com a *porcentagem* de proteína e com o total de proteína produzida no leite.

As dietas experimentais foram formuladas para serem isoenérgicas e isofibras variando apenas o conteúdo de proteína bruta. A ausência de respostas produtivas a este aumento de proteínas na dieta é um indicativo de que a concentração de 17% de PB seja superior à necessidade dos animais para o nível de produção observado.

Havendo excesso de nitrogênio dietético em relação à disponibilidade de energia, incorre-se em aumentos na concentração de amônia intra-ruminal e a fração não utilizada na síntese protéica, quando absorvida, alcança a circulação portal e assim é transportada até o fígado, onde é convertida a uréia (ciclo da uréia). O fígado também produz uréia a partir da amônia derivada da deaminação de aminoácidos absorvidos no intestino (PNDR) e dos processos relacionados ao catabolismo protéico em geral. Em qualquer dessas possibilidades, a uréia formada é lançada na corrente sanguínea e pode ser excretada na urina (perdas de nitrogênio) ou retornar ao rúmen via epitélio ruminal, ou saliva (reciclagem). A uréia pode ainda se difundir para outros líquidos biológicos, incluindo o leite e secreções do endométrio, graças ao seu baixo peso molecular e à sua alta permeabilidade através das membranas celulares (Gustafsson e Palmquist, 1993; Moore e Varga, 1996).

O aumento da precisão na formulação de ração com relação às frações nitrogenadas estimando a absorção intestinal de aminoácidos e reduzindo o nível de proteína bruta das dietas, visa atender as demandas mundiais por aumento da eficiência de utilização de nitrogênio sem prejuízos produtivos e diminuindo o impacto ambiental por redução nas perdas urinárias de nitrogênio e conseqüente volatilização da amônia (Robinson *et al.*, 2004).

O perfil médio dos ácidos graxos no leite das cabras, os teores totais de ácidos graxos saturados e insaturados, mono e polinsaturados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Efeitos dos genótipos para α_{s1} -caseína sobre o perfil médio de ácidos graxos no leite de cabras

Item	Genótipos				CV
	AA	EE	EF	AF	
C6:0 (%)	0,34	0,39	0,34	0,40	21,98
C8:0 (%)	1,21	1,24	1,26	1,19	13,23
C10:0 (%)	7,17	7,12	7,46	7,39	10,83
C12:0 (%)	3,94	4,08	4,12	4,32	14,88
C14:0 (%)	10,55	10,63	10,93	10,88	8,96
C16:0 (%)	28,75	28,77	28,90	28,91	7,82
C16:1 (%)	1,11	1,11	1,11	1,02	8,81
C17:0 (%)	0,86	0,83	0,86	0,85	10,58
C18:0 (%)	11,96	11,93	11,09	11,15	13,29
C18:1 trans (%)	1,55	1,44	1,51	1,33	12,51
C18:1 (%)C	23,83	24,43	23,30	24,10	9,74
C18:2 (%)	2,48	2,49	2,63	2,53	11,69
C18:3 (%)	0,34	0,35	0,37	0,35	14,40
C20:0 (%)	0,26	0,30	0,28	0,29	18,79
Total saturados (%)	65,04	64,29	65,23	65,33	4,06
C6 C8 C10 (%)	8,71	8,75	9,06	8,92	10,47
C12 C15 (%)	14,49	14,71	15,05	15,21	9,78
C16 C21 (%)	41,84	40,83	41,13	41,20	4,76
Total Insaturados (%)	29,30	29,82	28,92	29,34	8,82
Monoinsaturados (%)	26,48	26,98	25,92	26,46	9,03
Poliinsaturados (%)	2,82	2,84	3,00	2,88	11,55
S/I	2,24	2,18	2,27	2,26	12,74
Poli/Sat	0,04	0,04	0,05	0,04	14,55
IA	2,58	2,55	2,68	2,66	15,19

CV = coeficiente de variação. Ácidos graxos não-quantificados: C4:0; C13:0; C21:0; C15:1 C20:2.

O perfil médio dos ácidos graxos no leite das cabras, os teores totais de ácidos graxos saturados e insaturados, mono e poliinsaturados não apresentaram diferenças estatísticas entre os quatro genótipos analisados.

Schmidely *et al.* (2002), comparando o perfil de ácidos graxos do leite de cabras dos genótipos AA e FF para α_{s1} -caseína, observaram diferenças significativas apenas para os ácidos C14:0, C15:0 e C17:0 que foram superiores nos animais do genótipo AA.

Não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos estudados nas concentrações de ácidos graxos de cadeias curtas e médias (C4 a C14), sendo estes, resultantes de *síntese de novo* na glândula mamária, tendo como principal precursor o acetato produzido pela fermentação de carboidratos no rúmen e, portanto, a manutenção dos teores de gordura do leite depende do suprimento do requerimento de fibra efetiva para o animal (Ashes *et al.*, 1997; Clegg *et al.*, 2001; Bauman e Griinari, 2003).

Apesar de não se ter realizado neste experimento análises específicas para efetividade da fibra dietética, o consumo de FDN, em *porcentagem* do peso vivo, não variou entre os genótipos e nos níveis de proteína na dieta, sendo em média 1,6%, valor este superior à recomendação de ingestão ótima de FDN descrita por Mertens (1992) para vacas leiteiras e por Branco (2005) para cabras em lactação, de respectivamente, 1,25 e 1,24% do peso vivo. Os valores obtidos para o consumo de FDN mostraram-se próximos aos observados por Carvalho *et al.* (2006) de 1,53% do peso vivo e aparentemente não afetaram o consumo médio de matéria seca que se apresentou relativamente alto, sendo de 4,33% do peso vivo (primeiro artigo).

O perfil de ácidos graxos de cadeia média do leite de cabra está associado às propriedades terapêuticas deste, devido à elevada digestibilidade que confere a fração lipídica (Hachlaf *et al.*, 1993; Touhami, 1997; Alférez *et al.*, 2001; Park, 1994).

Estes ácidos graxos de cadeia média são mais rapidamente hidrolisados por enzimas pancreáticas e são prontamente absorvidos pela veia porta sem que haja necessidade de formação de micelas e este processo pode aumentar a absorção de vitaminas hidrossolúveis (McCullough, 2004). Os efeitos dos ácidos graxos de cadeia média do leite de cabra sobre a diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol e de triglicerídeos podem ser resultantes do aumento na secreção biliar de colesterol e do efeito positivo sobre o metabolismo de lipídeos observado em ratos consumindo leite de cabra (López-Aliaga *et al.*, 2005).

Alonso *et al.* (1999) ressaltam a utilização da relação C12:0:C10:0 (mirístico: cáprico) de aproximadamente 0,50, como indicador de autenticidade de produtos lácteos caprinos. Neste experimento, esta relação foi mantida em todos os genótipos, independentemente da concentração de proteína nas dietas, confirmando a validade desta ferramenta na identidade do leite desta espécie.

A concentração de ácido palmítico (C16:0) não variou entre os genótipos estudados e foi em média 28,83%. O *pool* de ácido palmítico no leite pode ser oriundo tanto na síntese de novo na glândula mamária quanto de lipídeos circulantes (Neville e Picciano, 1997). Schmidely *et al.* (2002) não observaram diferenças nos teores de ácido palmítico entre os genótipos AA e FF, sendo este em média 31,5% do total de ácidos graxos no leite.

A concentração de ácido esteárico (C18:0) foi em média 11,53% e de ácido oléico (C18:1cis e trans) 25,37%, sendo estes valores semelhantes aos obtidos por Silva

et al (2006) neste mesmo rebanho mas, bastante diferentes dos relatados Schmidely *et al.* (2002) de respectivamente, 4,15% e 13,45%.

Nas razões entre ácidos graxos saturados e insaturados, poliinsaturados e saturados e no índice de aterogenicidade não foram observadas diferenças entre os genótipos estudados. Estes parâmetros têm sido utilizados na análise de alimentos como indicadores de riscos associados a distúrbios cardiovasculares.

A razão entre ácidos graxos poliinsaturados:saturados foi em média 0,045, valores semelhantes foram observados por Silva *et al.* (2006) e por Queiroga *et al.* (2007). A recomendação de Wood *et al.* (2003) para esta razão na dieta de humanos é de mais de 0,4.

A razão entre ácidos graxos saturados e insaturados no leite de cabra foi em média 2,24 e não apresentou diferenças significativas entre os genótipos. Valores reduzidos desta razão estão associados à redução nos níveis plasmáticos de colesterol (Schmidely *et al.*, 2005).

O perfil de ácidos graxos no leite em função dos teores de proteína das dietas experimentais encontra-se descrito na Tabela 7.

Não foram observados efeitos significativos das concentrações de proteína na dieta nos principais ácidos graxos do leite de cabra e nas concentrações totais de saturados, insaturados, monoinsaturados e poliinsaturados, relações entre os saturados e insaturados, poliinsaturados e índices de insaturação.

Os ácidos graxos C6:0, C8:0 e C17:0 apresentaram-se em maiores concentrações nos animais recebendo a dieta com 14% de proteína.

Tabela 7 – Efeitos dos níveis de proteína nas dietas sobre o perfil médio de ácidos graxos no leite de cabras

Item	Nível de Proteína (%)		CV
	14	17	
C6:0 (%)	0,44 ^a	0,27 ^b	21,98
C8:0 (%)	1,32 ^a	1,13 ^b	13,23
C10:0 (%)	7,17	7,40	10,83
C12:0 (%)	4,04	4,19	14,88
C14:0 (%)	10,50	11,00	8,96
C16:0 (%)	28,25	29,42	7,82
C16:1 (%)	1,11	1,06	8,81
C17:0 (%)	0,88 ^a	0,82 ^b	10,58
C18:0 (%)	11,45	11,11	13,29
C18:1trans (%)	1,47	1,44	12,51
C18:1cis (%)	24,26	23,58	9,74
C18:2 (%)	2,57	2,50	11,69
C18:3 (%)	0,36	0,35	14,40
C20:0 (%)	0,32	0,25	18,79
Total Saturados (%)	64,37	65,58	4,06
C6 C8 C10 (%)	8,92	8,80	10,47
C12 a C15 (%)	14,54	15,18	9,78
C16 a C21 (%)	40,90	41,60	4,76
Total Insaturados (%)	29,76	28,94	8,82
Monoinsaturados (%)	26,84	26,09	9,03
Poliinsaturados (%)	2,92	2,85	11,55
S/I	2,19	2,29	12,74
Poli/Sat	0,05	0,04	14,55
IA	2,53	2,71	15,19

CV = coeficiente de variação. Ácidos graxos não quantificados: C4:0; C13:0; C21:0; C15:1 C20:2; S/I – relação entre ácidos graxos saturados e insaturados; Poli/Sat = relação entre ácidos graxos poliinsaturados e saturados; e IA = Índice de aterogenicidade

4. Conclusões

Não foi observado efeito interativo entre as concentrações de 14% e 17% de proteína bruta na dieta e os genótipos da α_{s1} -caseína sobre o perfil de caseínas e ácidos graxos no leite de cabras.

Não foram observados efeitos dos teores de proteína bruta da dieta sobre o percentual de proteína verdadeira, proteína bruta e caseínas totais e individuais no leite

As concentrações de proteína verdadeira e a concentração relativa de α_{s1} -caseína do leite apresentadas pelos animais do genótipo AA e AF foram superiores quando comparadas às dos animais dos genótipos EE e EF.

Os genótipos para α_{s1} -caseína e os teores de proteína estudados não alteraram o perfil da maioria dos ácidos graxos do leite caprino.

Literatura Citada

- ALFÉREZ, M. J. M.; BARRIONUEVO, M.; ALIAGA, T. L. ;SANZ-SAMPELAYO, M. R.; LISBONA, F.; ROBLES, J. C.; CAMPOS, M. S. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. **Journal of Dairy Research**, n. 68, p. 451-461, 2001.
- ALONSO, L.; FONTECHA, J.; LOZADA, L.; FRAGA, M. J.; JUÁREZ, M. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain and trans fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 82 n. 5, p. 878-884, 1999.
- ASHES, J. R.; GULATI, S. K.; SCOTT, T. W. Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. Symposium: New approaches to changing milk composition. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 9, p. 2204-2212, 1997.
- BARBANO, D. M.; LYNCHY, J. L. Major advances in testing of dairy products: milk component and dairy product attribute testing. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1189-1194, 2006.
- BAUMAN, D. E.; GRINARI, J. M. Nutritional regulation of of milk fat synthesis. **Annual Reviews of Nutrition**, v. 23, p. 203-227, 2003.
- BRANCO, R. H. **Avaliação da qualidade da fibra sobre a cinética ruminal, consumo e eficiência de utilização de nutrientes em cabras leiteiras**. 2005. 151 f. Tese (Doutorado em Zootecina) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- CARVALHO, S.; RODRIGUES, M. T.; BRANCO, R. H.; RODRIGUES, C. A. F. Consumo de nutrientes, produção e composição do leite de cabras da raça Alpina alimentadas com dietas contendo diferentes teores de fibra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 1154-1161, 2006.
- CHANAT, E.; MARTIN, P.; OLLIVIER-BOUSQUET, M. κ casein is required for the efficient transport of β and κ casein from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 3399-3412, 1999.
- CHILLIARD, Y. Caractéristiques biochimiques des lipides du lait de chèvre. Comparaison avec les laits de vache et humain. Actes du colloque: Le lait de chèvre, un atout pour la santé. **INRA Editions**, n. 81, p. 51-66, 1997.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 5, p. 1751-1770, 2003.
- CHILLIARD, Y.; ROUEL, J.; LEROUX, C. Goat's alpha-s1 casein genotype influences its milk fatty acid composition and delta-9 desaturation ratios. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, p. 474-487, 2006.

CLEGG, R. A.; BARBER, M. C.; POOLEY, L. Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. **Livestock Production Science**, v. 70, p. 3-14, 2001.

COZENZA, G.; ILLARIO, R.; RANDO, A.; di GREGORIO, P.; MASINA, P.; RAMUNNO, L. Molecular characterization of the goat *CSN1S101* allele. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 237-240, 2003.

FELIGINI, M.; FRATI, S.; CURIK, V. C.; BRAMBILLA, A.; PARMA, P.; CURIK, I.; GREPPI, G. F.; ENNE, G. Caprine α_{s1} -casein polymorphism: Characterisation of A, B, E and F variants by means of various biochemical and molecular techniques. **Food Technological Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 123-132, 2005.

FENG, S.; LOCK, A.L.; GARNSWORTHY, P.C. Technical note: a rapid lipid separation method for determining fatty acid composition in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3785-3788, 2004.

GROSCLAUDE, F.; RICORDEOU, G.; MARTIN, P.; REMEUF, F.; VASSAL, L.; BOULLON, J. Du gène au fromage: Le polymorphisme de la caséine α_{s1} caprine, ses effets son evolution. **INRA Productions Animales**, v. 7, p. 3-19, 1994.

GUSTAFSSON, A. H.; PALMIQUIST, D. L. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 2, p. 475-484, 1993.

HACHELAF, W.; BOUKHREDA, M.; BENBOUABDELLAH, M.; COQUIN, P.; DESJEUX, J. F.; BOUDRAA, G.; TOUGHAMI, M. Digestibilité des graisses du lit de chèvre chez des enfants présentant une malnutrition d'origine digestive. Comparaison avec le lait de vache. **Le lait**, v. 73, n. 4-5, p. 593-599, 1993.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. **Rapid preparation of fatty acid methyl esters**. London: Laboratory Practice, v. 22, p. 475-476, 1986.

JAUBERT, A.; MARTIN, P. Reverse phase HPLC analysis of goat casein – Identification of α_{s1} and α_{s2} genetic variants. **Lait**, v. 72, p. 235-247, 1992.

LÓPEZ-ALIAGA, I.; ALFÉREZ, M. J. M.; NESTARES, P. B. R. Goat milk feeding causes an increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 3, p. 1024-1030, 2005.

MAHÉ, M. F.; GROSCLAUDE, F. α_{s1} CND another allele associated with a decreased synthesis rate at the caprine α_{s1} -casein locus. **Génétique Sélection Evolution**, v. 21, p. 127-129, 1989.

MARTIN, P. La composition protéique du lait de chèvre: ses particularités. Actes du colloque: Le lait de chèvre, un atout pour la santé. **INRA Editions**, n. 81, p. 27-50, 1997.

MARTIN, P.; OLLIVIER-BOUSQUET, M.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of caseins: a tool to investigate casein micelle organization. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 163-171, 1999.

McCULLOUGH, F. S. W. Nutritional interest of goat's milk- Present information and future prospects. **International symposium: The future of the sheep and goat dairy sectors**. Zaragoza, Spain, session 5, p. 1-7, 2004.

MERTENS, D. R. Nonstructural and structural carbohydrates. In: VAN HORN, H. H.; WILCOX, C. J. **Large dairy herd management**. Champaign: American Science Association. 1992.

MIKKELSEN, J.; HØJURUP, P.; KNUDSEN, J. Purification of goats' milk casein by reverse-phase-high-performance liquid chromatography and identification of α_{s1} -casein. **Journal of Dairy Research**, v. 54, p. 361-367, 1987.

MOATSOU, G.; SALOMADA, M.; PANAGIOTOU, P.; ANIFANTAKIS, E. Casein fraction of bulk milks from different caprine breeds. **Food Chemistry**, v. 87, p. 75-81, 2004.

MOIOLI, B.; PILLA, F.; TRIPALDI, C. Detection of milk genetic polymorphism in order to improve dairy traits in sheep and goat: a review. **Small Ruminant Research**, v. 27, p. 185-195, 1998.

MOORE, D. A.; VARGA, G. BUN and MUN: Urea nitrogen testing in dairy cattle. **Compendium Continuing Education Veterinary**, v. 18, n. 6, p. 712-721, 1996.

MORGAN, F.; MICAULT, S.; FAUQUANT, J. Combined effect of whey protein and α_{s1} -casein genotype on the heat stability of goat milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 2, p. 64-68, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of dairy cattle**. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381 p

NEVEU, C.; RIAUBLANC, A.; MIRANDA, G.; CHICH, J. F.; MARIN, P. Is the milk secretion process observed in the goat species rooted in the perturbation of the intracellular transport mechanism induced by defective alleles at the α_{s1} -CN locus? **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 163-172, 2002.

NEVILLE, M. C.; PICCIANO, M. F. Regulation of milk lipid secretion and composition. **Annual Reviews Nutrition**, v. 17, p. 159-184, 1997.

OJALA, M.; FAMULA, T. R.; MEDRANO, J. F. Effect of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1776-1785, 1997.

PARK, Y. W. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. **Small Ruminant Research**, n. 14, p. 151-159, 1994.

QUEIROGA, R. C. R. E.; COSTA, R. G.; BISCONTINI, T. M. B. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase da lactação na composição química do leite de cabras Saanen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 430-437, 2007.

RAMUNNO, L.; COZENZA, G.; PAPPALARDO, M.; PASTORE, N.; GALLO, D.; Di GREGORIO, P.; MASINA, P. Identification of the goat *CSNISIF* allele by means of PCR-RFLP method. **Animal Genetics**, v. 31, p. 342-343, 2000.

RAMUNNO, L.; COZENZA, G.; RANDO, A.; ILLARIO, R.; GALLO, D.; Di BERNARDINO, D.; MASINA, P. The goat α_{s1} -casein gene: gene structure and promoter analysis. **Gene**, v. 334, p. 105-111, 2004.

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, 2002.

ROBINSON, P. H.; CHALUPA, W.; SNIFFEN, C. J.; SATO, H.; FUJIEDA, T.; UEDA, T.; SUZUKI, H. Influence of ingredient reformulation to reduce diet crude protein level on productivity, and efficiency of dietary nitrogen use, in esrly lactation dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 116, p. 67-81, 2004.

SAEG. **Sistema para análises estatísticas e genéticas**. Viçosa: UFV, 2007.

SCHMIDELY, P.; MESCHY, F.; TESSIER, J.; SAUVANT, D. Lactation response and nitrogen, calcium, phosphorus utilization of dairy goats differing by the genotype for α_{s1} -casein in milk, and fed diets varying in crude protein concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2399-2307, 2002.

SCHMIDELY, P.; MORAND-FEHR, P.; SAUVANT, D. Influence of extruded soybeans with or without bicarbonate on milk performance and fatty acid composition of goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 757-765, 2005.

SILVA, M. M. C.; RODRIGUES, M. T.; SILVA, M. T. C. *et al.* Perfil de ácidos graxos do leite de cabras recebendo suplementos de lipídeos na dieta. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006. CD ROM.

SZYMANOWSKA, M.; STRZALKOWSKA, N.; SIADKOWSKA, E.; KRZYZEWSKI, J.; RYNIOWICZ, Z.; ZWIERZCHOWSKI, L. Effects of polymorphism at 5'-noncoding regions (promoters) of α_{s1} and α_{s2} casein genes on selected milk production traits in Polish Black and White cows. **Animal Science Papers and Reports**, v. 21, n. 2, p. 97-108, 2003.

TOUHAMI, M. Intérêt nutritionnel du lait de chèvre. Actes du colloque: Le lait de chèvre, un atout pour la santé. **INRA Editions**, n. 81, p. 93-100, 1997.

TRUJILLO, A. J.; CASALS, I.; GUAMIS, B. Analysis of major caprine milk proteins by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 1, p. 11-19, 2000.

Efeitos dos genótipos para α_{s1} -caseína na morfologia da glândula mamária de cabras

Resumo: este experimento objetivou analisar a morfologia do parênquima mamário de cabras adultas e em lactação com a finalidade de verificar os efeitos dos diferentes genótipos para α_{s1} -caseína (AA, EE, EF e FF) nas células secretoras do leite. As análises foram realizadas a partir de biópsias teciduais e os critérios morfológicos basearam-se na descrição histológica e ultra-estrutural (microscopia eletrônica de transmissão). O parênquima da glândula mamária apresentou um padrão de organização geral único e independente dos genótipos para α_{s1} -caseína. O parênquima mostrou-se formado por alvéolos, os quais são compostos por um epitélio com células secretoras colunares, células indiferenciadas e células mioepiteliais. No espaço interlobular observou-se a presença de um estroma constituído de tecido conjuntivo tendendo a frouxo, vasos sanguíneos, plasmócitos e mastócitos. No lúmen alveolar observou-se a presença de secreção láctea com células de descamação e polimorfonucleares. As células indiferenciadas do epitélio secretor não se estendem até a superfície luminal e apresentaram pleomorfismo quanto ao tamanho e a forma e também poucas organelas; no entanto apesar de exibirem polimorfismo nuclear, a cromatina do núcleo das células maiores mostrou-se mais eucromática que aquela observada nas células menores. A ultra-estrutura das células epiteliais secretoras no genótipo AA revelou um citoplasma quase que totalmente preenchido por retículo endoplasmático rugoso, cisternas e vesículas do aparelho de Golgi, além de numerosas mitocôndrias. As características citoplasmáticas das células secretoras dos genótipos EE e EF mostraram-se diferentes daquelas observadas no genótipo AA, por apresentarem a luz do retículo endoplasmático rugoso e das cisternas do Golgi muito dilatadas. A ultra-estrutura das células secretoras do genótipo AF mostrou um padrão intermediário de dilatação da luz do retículo endoplasmático rugoso e das cisternas e vesículas do aparelho de Golgi.

Palavras-chave: caprinos, histologia, ultra-estutura, parênquima mamário, microscopia eletrônica.

Effect of genotypes for α_{s1} -casein on mammary gland morphology

Abstract: taking into consideration the hypothesis that genotypes for α_{s1} -casein in milk may interfere on cell organelles involved with milk synthesis in goats the present experiment objected to evaluate and describe mammary parenchyma morphology in lactating goats of different genotypes named AA, EE, EF and AF for the α_{s1} -casein when fed diets with 14 and 17% CP. Evaluation was carried out by tissue biopsy and histological analysis and ultra structure (electronic and transmission microscopy). A unique general pattern of organization was presented in both histological and ultra structural analysis of parenchyma. Despite the genotype for α_{s1} -casein, parenchyma was comprised of alveolar lobules, compounded by columnar epithelial secretory cells, undifferentiated cells, and mioepithelial cells. For the interlobular space it was observed the presence of conjunctive stroma, blood vessels of specialized cells such as plasmocytes and mastocytes and in the alveolar lumen the presence of lacteal secretion, desquamation cells and polymorphonuclears. The undifferentiated cells into the mammary gland parenchyma presented pleomorphism concerning size and shape, little cytological differentiation of cytoplasm and the presence of polymorphic nucleus, with different pattern of condensation of chromatin, which tended to be more decondensed or euchromatic for larger cells and more condensed and heterochromatic for the smaller ones. The ultra structure of epithelial cells of mammary gland in animals carrying the genotype AA revealed cytoplasm comprised mostly by roughly endoplasmic reticulum and typical vesicles of Golgi apparatus in addition of numerous mitochondria. Conversely, cells in animals carrying the genotype EE, and EF presented dilations of vesicles of endoplasmic reticulum and Golgi cisterns. The ultra structure of epithelial cells of mammary gland in animals of goats carrying the genotype AF showed a pattern of vesicles fairly expanded, intermediary of those presented in both AA and EE/EF genotypes.

Key words: goats, histology, ultra structure, mammary parenchyma, electronic transmission microscopy.

1. Introdução

Uma importante característica da glândula mamária é a notável capacidade de regeneração de seu epitélio, sendo facilmente demonstrada pela presença de ciclos de desenvolvimento, involução e redensolvimento, a cada período de lactação (Ellis e Capuco, 2002; Smith e Boulanger, 2002).

De acordo com a revisão elaborada por Chepko e Smith (1999), a qual foi estabelecida com critérios histológicos e ultra-estruturais, as células do epitélio mamário podem ser subdivididas em cinco tipos morfológicos: a) células primitivas, as quais se mostram pequenas e claras; b) células indiferenciadas maiores e claras com pequeno grau de diferenciação citológica; c) células grandes e claras com um grau de diferenciação mais complexo; d) células secretoras, escuras e diferenciadas que possuem organelas citoplasmáticas desenvolvidas e grânulos de secreção; e) células mioepiteliais.

A glândula mamária é uma das poucas glândulas exócrinas que estocam o produto de sua secreção em um compartimento extracelular ou lúmen dos alvéolos. Basicamente, a secreção é liberada das células secretoras através de dois processos celulares distintos e simultâneos denominados apócrino (brotamento de vesículas membranosas que possuem gotas lipídicas e citoplasma periférico) e merócrino (exocitose de proteínas). O processo de secreção que ocorre no epitélio mamário é estabelecido a partir de uma complexa mistura de cinco vias principais envolvidas na produção e secreção dos constituintes do leite através do epitélio mamário, sendo estas classificadas em: a) transporte transmembrana de solutos (Na^+ , K^+ , Cl^-); b) exocitose de produtos modificados pelo complexo de Golgi, tais como caseínas, proteínas do soro e lactose; c) secreção de gotas de gordura envoltas por membrana celular; d) transcitose, envolvendo tráfego de imunoglobulinas; e) transporte paracelular de solutos do líquido intersticial direto para o leite (Shennan e Peaker, 2000).

O processo de secreção das caseínas envolve síntese no retículo endoplasmático rugoso, transporte e processamento das micelas protéicas de caseínas pelo complexo de Golgi e posterior exocitose, a partir da qual a secreção atinge o lúmen do alvéolo (Farrell Jr *et al.*, 2006).

Os glóbulos de gordura presentes no lúmen possuem uma membrana externa que consiste de fosfolípídeos, glicolípídeos e proteínas, sendo uma parte destas enzimas. As gotas de gordura presentes no citoplasma das células secretoras são pequenas e

desprovidas de envoltório membranoso e, geralmente, são observadas na região basal da célula. Embora ainda não muito bem esclarecido, existem evidências que a formação das gotas lipídicas origina-se a partir da fusão de gotículas precursoras com vesículas provenientes do Complexo de Golgi, à medida que migram para a região apical da célula (Wooding, 1971; Evers, 2004). Em cabras, o mecanismo de secreção apócrina e a presença de citoplasma celular associado aos glóbulos de gordura secretados foram descritos por Wooding e Peake (1970) e Boutinaud e Jammes (2002).

Na espécie caprina, o intenso e complexo polimorfismo genético presente no locus do gene da α_{s1} -caseína tem sido intensivamente estudado e relatado nas últimas décadas (Boulanger *et al.*, 1984; Grosclaude *et al.*, 1987; Mahé e Grosclaude, 1989; Leroux *et al.*, 1990; David e Deutch, 1992; Martin, 1993; Martin *et al.*, 1999; Ramunno *et al.*, 2000; Bevilacqua *et al.*, 2002; Cozenza *et al.*, 2003; Ramunno *et al.*, 2004). Dentre os alelos já estudados, quatro níveis de expressão da α_{s1} -caseína no leite foram relatados na espécie caprina. O nível de alta expressão (alelos A, B, C, L e H), que resulta na produção de 3.6-4,2 g/litro/alelo, o nível de expressão intermediária (alelo E e I), com 1.6 g/litro/alelo, o de baixa expressão (alelos D, F e G) com 0.6g/litro/alelo (Mahé e Grosclaude, 1989; Ramunno *et al.*, 2000; Neveu *et al.*, 2002) e o nível nulo (alelo 0), que não possui expressão de α_{s1} -caseína (Grosclaude *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1999; Cozenza *et al.*, 2003).

As variantes protéicas da α_{s1} -caseína A, B, C e E, contêm 199 resíduos de aminoácidos e diferenciam-se por substituições de aminoácidos, enquanto que as variantes D e F apresentam alterações estruturais mais profundas, envolvendo a deleção interna de, respectivamente, 11 e 37 resíduos de aminoácidos (Brignon *et al.*, 1989; Brignon *et al.*, 1990; Martin, 1993, Martin, 1999) e a variante G, deleção de 13 aminoácidos (14 ao 26) (Martin e Leroux, 1994, citados por Martin *et al.*, 1999).

Chanat *et al.* (1999) descreveram alterações ultra-estruturais nas células do tecido mamário de cabras com genótipos de baixa expressão de α_{s1} -caseína, sendo estas relacionadas com alguma disfunção no mecanismo de secreção de proteínas e lipídeos presentes no leite. Dados ultra-estruturais de células secretoras do epitélio alveolar indicam, que durante a formação das micelas, a agregação das caseínas inicia-se dentro das vesículas do Complexo de Golgi, após a fosforilação das mesmas. Os resultados obtidos por estes autores também sugerem que a formação de micelas depende da concentração de α_{s1} -caseína. Cabras homozigotas para os alelos E, F e nulo para α_{s1} -

caseína, revelaram aumentos relativos de volume no retículo endoplasmático rugoso e vesículas do Complexo de Golgi das células secretoras quando comparado com os genótipos de alta expressão para α_{s1} -caseína (AA). Segundo estes autores, o aumento de volume destas organelas decorre do acúmulo de outras caseínas (α_{s2} , β e κ caseínas), possivelmente ocasionado pela menor concentração ou ausência de α_{s1} -caseína, uma vez que o mesmo acúmulo não foi observado em cabras com genótipos nulos para expressão de β -caseína.

Neveu *et al.* (2002), utilizando-se de análises de imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de transmissão, também observaram disfunções no transporte e secreção das caseínas na ausência de α_{s1} -caseína. Estes autores defendem a hipótese de que a secreção apócrina do leite na espécie caprina encontra-se fortemente associada às perturbações do transporte intracelular das caseínas, o qual parece estar relacionado aos alelos de menor expressão para α_{s1} -caseína.

A conclusão de que a α_{s1} -caseína interfere no mecanismo de transporte das demais caseínas ainda precisa de confirmação, pois Morgan *et al.* (2001) comparando a composição do leite de cabras homozigotas AA e FF, não observaram diferenças significativas nas quantidades absolutas das caseínas α_{s2} , β e κ e explicaram que as diferenças observadas nas proporções relativas justificam-se pela menor concentração de α_{s1} -caseína no leite do genótipo FF.

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a α_{s1} -caseína possui propriedades funcionais que se assemelham às das chaperonas, a exemplo de sua capacidade de reduzir o tamanho dos agregados de β e κ caseínas e prevenir a agregação induzida por fatores térmicos, químicos e luminosos (Bhattacharyya e Das, 1999; Morgan *et al.*, 2005; Farrel Jr. *et al.*, 2006).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar e descrever as alterações morfológicas das células secretoras do parênquima da glândula mamária de cabras adultas e lactantes que apresentam os genótipos AA, EE, EF e AF para α_{s1} -caseína, utilizando-se de métodos de análise histológica e ultra-estrutural (microscopia eletrônica de transmissão).

2. Material e Métodos

2.1. Animais, instalações e delineamento experimental

Por intermédio de uma parceria entre a Universidade Federal de Viçosa (UFV, Departamento de Zootecnia) e a Unioeste-PR, os animais utilizados neste experimento foram previamente selecionados quanto aos genótipos para α_{s1} -caseína. Da população de cabras mantida pelo capril da UFV, 16 cabras das raças Alpinas e Saanen, lactantes, com peso médio de $52,70 \pm 10,74$, com aproximadamente 230 dias de lactação e produção média de $2,59 \pm 0,75$ L de leite/dia, foram selecionadas quanto à presença de genótipos homozigotos para alta expressão (AA, n = 4), homozigotos para expressão intermediária (EE, n = 4), heterozigoto de média e baixa expressão (EF, n = 4) e heterozigoto para alta e baixa expressão AF, n = 4).

A coleta das biópsias de glândula mamária foi realizada no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia (UFV).

2.2. Identificação dos alelos da α_{s1} -caseína

As análises genéticas foram realizadas a partir de leucócitos obtidos através da centrifugação (2.500 xg por 10 minutos) das amostras individuais de sangue coletadas por meio de punção da veia jugular. Uma alíquota destes leucócitos foi encaminhada ao Laboratório de Genética da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste.

Amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos com o tampão de extração descrito por Muhammad *et al.* (1994), com modificações na execução do protocolo. Assim, 80 μ L de leucócitos foram adicionados a 500 μ L do tampão de extração e mantidos por uma hora a 65 °C, com agitações ocasionais. Após o resfriamento a temperatura ambiente, 500 μ L de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) foram adicionados com subsequente agitação. Após a centrifugação por 10 minutos a 10.000 xg, o sobrenadante foi transferido para tubos limpos e a precipitação do DNA foi realizada com a adição de 250 μ L de isopropanol a 4 °C e mantido a esta temperatura por mais 30 minutos. O DNA foi precipitado por centrifugação a 12.000 xg por 20 minutos e lavado por duas vezes em etanol 75%. O DNA, dissolvido em água ultra-pura, foi quantificado a 260 e 280 nm.

Para a amplificação dos fragmentos de DNA contendo as regiões específicas do gene da α_{s1} -caseína foram desenhados *primers* baseados nas seqüências já disponíveis no GenBank (n^o acesso AJ504710). O sistema de amplificação consistiu, além dos *primers* específicos e do DNA genômico, de dNTPs, *Taq* DNA polimerase, MgCl₂, Tris-HCl, KCL, e água ultra-pura, em um volume final de 20 μ L. O programa de amplificação utilizado no termociclador constou de três etapas que compreenderam: desnaturação da fita molde, anelamento dos *primers* e extensão da fita pela DNA polimerase. Estes passos foram repetidos para obtenção de quantidade suficiente de fragmentos.

Após a amplificação, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 5% e corado com nitrato de prata. Para a análise do alelo F, os fragmentos de DNA adequadamente amplificados foram, quando necessário, clivados com enzimas de restrição *XmnI* (Ramunno *et al.*, 2004). Alguns fragmentos foram sequenciados em seqüenciador automático MegaBACE 1000 Amersham Life Science – USA no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG.

2.3. Obtenção dos fragmentos de glândula mamária

Os fragmentos de tecido da glândula mamária foram obtidos por meio de biópsia tecidual. As cabras foram sedadas e receberam anestesia local antes de serem submetidas a uma incisão de pele na região posterior da glândula mamária de onde foram retirados os pequenos fragmentos de tecido glandular por meio de agulha própria para biópsia de 18G (gauge).

2.4. Processamento dos fragmentos de glândula mamária

Logo após a coleta de cada uma das biópsias, os fragmentos de tecido mamário foram colocados em uma placa de petri imersos em fixador de Karnovsky (Karnovsky, 1965) diluído em tampão cacodilato de sódio (0,1M) para obtenção de uma solução final contendo glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (2%) e tampão cacodilato de sódio (0,05M) segundo Strum, (1979).

Cada fragmento foi fracionado em pelo ao menos dez pedaços de 1 mm³, os quais foram mantidos no fixador por 1 hora. Após este período os fragmentos foram

submetidos a uma seqüência de seis lavagens de 10 minutos cada, em tampão de cacodilato de sódio 0,05 M, totalizando uma hora e desidratados em série crescente de solução alcóolica de 30 a 70% sendo armazenados em álcool 70% por 45 dias (Dykstra, 1993).

O material foi submetido à rehidratação e osmificado com solução de OsO₄ 1%, em seguida o material foi submetido a desidratação em série crescente de soluções de etanol (30 a 100%).

Os fragmentos desidratados foram submetidos a uma seqüência de embebições em soluções com ordem crescente de resina Spurr em etanol absoluto antes da inclusão em resina Spurr pura. A polimerização ocorreu em estufa a 60-70 °C, durante 12 horas.

Para visualização dos fragmentos, localização e seleção de campos para os estudos ultra-estruturais, secções semifinas (1 a 2 µm) foram obtidas, com navalha de vidro, com ultramicrótomo. As secções semifinas foram coradas segundo Richardson *et al.* (1960). Alternativamente, lâminas com secções semifinas também foram submetidas a outras colorações específicas, tais como o azul de bromofenol, Toluidine-pironine e Xylidine Ponceau, com intuito de auxiliar na identificação da natureza lipídica ou protéica do conteúdo dos vacúolos citoplasmáticos. Após coloração, as preparações foram montadas com meio de montagem (mistura de 2,3 M de solução aquosa de sacarose e glicerol, na proporção de 1:1 e 0,0005% de azida sódica), lamínula e lutadas com esmalte incolor.

A análise das lâminas e os registros fotográficos foram efetuados em fotomicroscópio modelo Olympus AX-70, do laboratório de anatomia vegetal, Departamento de Biologia Vegetal-UFV.

As secções ultrafinas foram obtidas com navalha de diamante e colhidas em grades de cobre. Depois de recolhidas e secas, foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo.

As grades, contendo as secções ultrafinas, foram ainda submetidas a uma pós-contratação pela técnica de fixação em vapor de tetróxido de ósmio (OsO₄), a qual consiste em manter grades em uma câmara plástica hermética contendo uma placa de Petri com um filme líquido de OsO₄ que ao se volatilizar impregna as secções ultrafinas (Tiedt *et al.*, 1987).

A análise e os registros fotográficos das preparações ultra-estruturais foram realizados, respectivamente, com um microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM-109 e filme de alto contraste (35 mm).

3. Resultados

3.1. Considerações gerais

As análises histológicas e ultra-estruturais do parênquima da glândula mamária de cabras adultas e lactantes pertencentes aos genótipos AA, EE, EF e AF para α_{s1} -caseína revelaram um padrão de organização geral único e independente dos genótipos para α_{s1} -caseína. O parênquima mostrou-se formado por alvéolos, os quais são compostos por um epitélio com células secretoras colunares, células indiferenciadas (células brancas ou tronco) e células mioepiteliais. No espaço interlobular observou-se a presença de um estroma constituído de tecido conjuntivo tendendo a frouxo, vasos sanguíneos, plasmócitos e mastócitos. No lúmen alveolar observou-se a presença de secreção láctea com células de descamação e polimorfonucleados (Figuras 1 e 2).

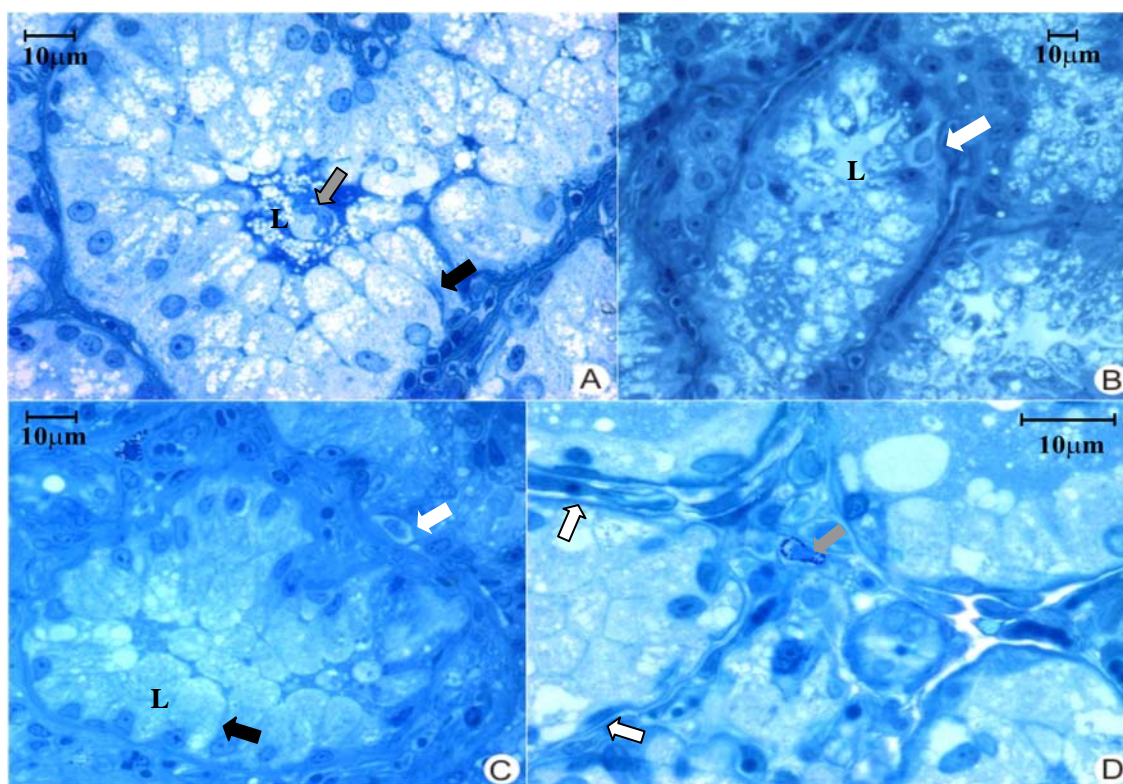


Figura 1 – Histologia do padrão organizacional do parênquima mamário de cabras em lactação (coloração Richardson). L = lúmen alveolar; setas pretas indicam as células epiteliais secretoras; setas brancas = células claras indiferenciadas; seta cinza = mástócito; setas brancas com margem preta = células mioepiteliais; seta cinza com margem preta = polimorfonucleares. Magnitude dos aumentos em A, B, C e D, de respectivamente, 80x, 60x, 80x e 100x.

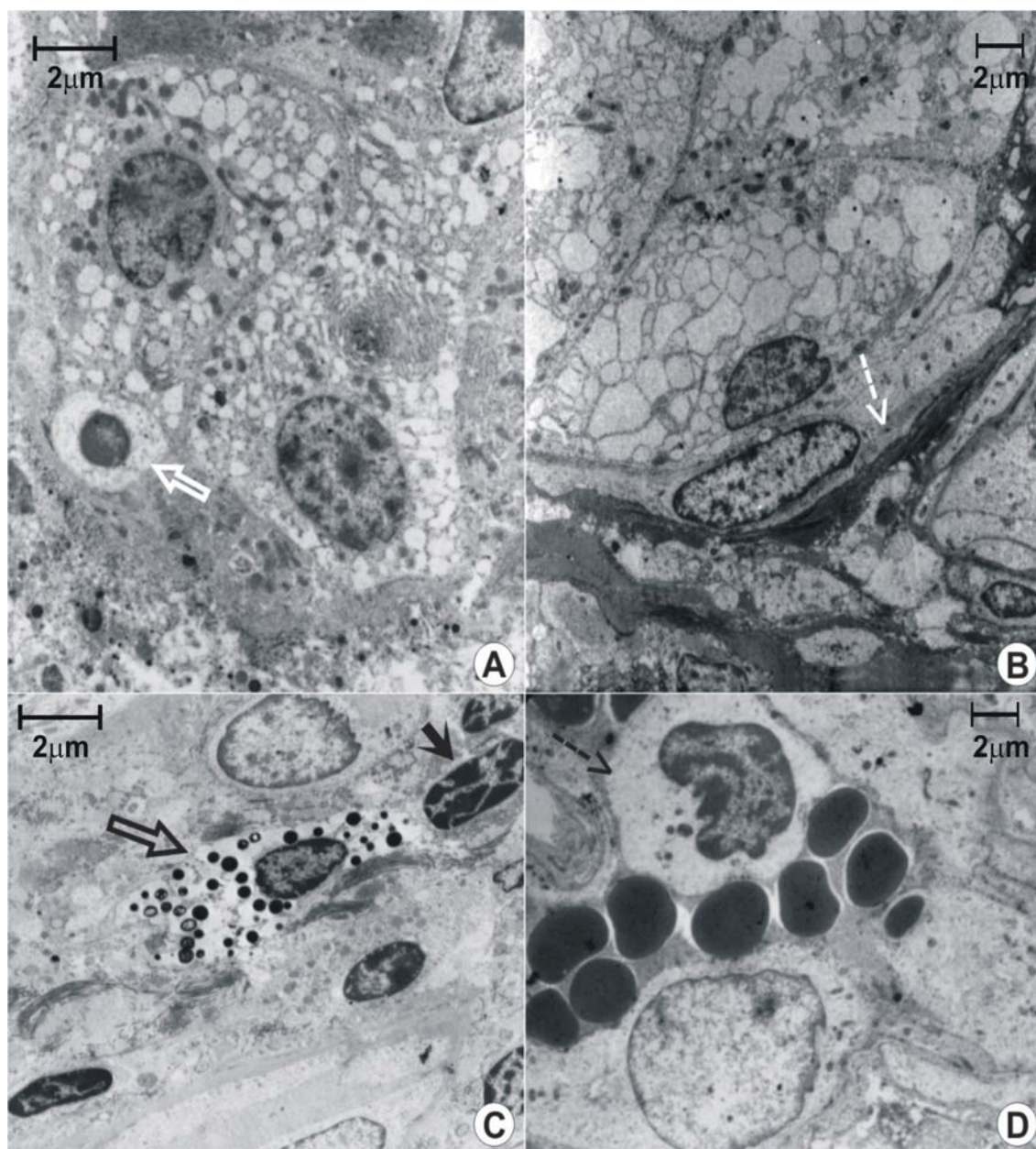


Figura 2 – Microscopia eletrônica de transmissão da glândula mamária de cabras lactantes. Na imagem **A** presença de células epiteliais colunares secretoras e, em destaque, célula branca indiferenciada. Em **B** presença de célula mioepitelial (seta pontilhada branca), em **C** encontra-se destacada a presença de um mastócito (seta com borda preta) e um plasmócito (seta preta) no estroma conjuntivo interlobular e em **D** um vaso sanguíneo com hemácias e um polimorfonuclear (seta pontilhada escura). A magnitude dos aumentos em **A** e **C** foi de 6278x e em **B** e **D** de 4334x.

A metodologia utilizada para a preparação do material destinado às análises por microscopia eletrônica de transmissão, apesar de ter diminuído a definição das membranas celulares permitiu a visualização das estruturas de interesse para diferenciar as características das células secretoras dos genótipos considerados (AA, EE, EF e AF).

Os resultados morfológicos obtidos serão apresentados em duas etapas. A primeira delas refere-se aos padrões histológico e ultra-estrutural que mostraram-se comuns aos genótipos analisados. A segunda refere-se à análise das diferenças apresentadas entre os genótipos considerados, principalmente, com ênfase nas células secretoras.

3.2. Organização geral do estroma e dos alvéolos

O parênquima mamário das cabras de todos os genótipos analisados apresentou características semelhantes de organização histológica dos alvéolos, estroma intersticial e lúmen alveolar.

Histologicamente, o espaço inter-alveolar mostrou-se constituído pelo estroma mamário, no qual vasos sanguíneos e mastócitos puderam ser facilmente identificados, enquanto que a análise ultra-estrutural possibilitou a avaliação de tipos celulares presentes nos vasos sanguíneos (células endoteliais, hemácias e células de linhagem branca) e no interstício (mastócitos e plasmócitos) puderam ser identificados. A matriz extracelular mostrou-se bem preservada, com fibras e feixes de colágeno.

Os mastócitos foram observados com certa facilidade no estroma da glândula mamária das cabras em todos os genótipos estudados, tanto na análise histológica (Figura 1-D) como ultra-estrutural (Figura 2-C). Histologicamente e ultra-estruturalmente, o citoplasma dos mastócitos mostrou-se preenchido pelos típicos grânulos citoplasmáticos eletrondensos e metacromáticos, respectivamente. Apesar dos mastócitos apresentarem-se com morfologia variável, mas predominantemente elípticos, a análise detalhada evidenciou que o limite celular é desprovido de projeções citoplasmáticas.

Além dos mastócitos, plasmócitos foram identificados na análise ultra-estrutural do estroma mamário, graças ao padrão característico de condensação da cromatina no núcleo destas células (Figura 2-C).

Os alvéolos mostraram-se constituídos por células epiteliais secretoras, células indiferenciadas e células mioepiteliais. As células indiferenciadas apresentaram-se localizadas entre as células secretoras, acima das mioepiteliais sem atingir a superfície luminal. O alvéolo pode ser delimitado nas preparações ultra-estruturais através da localização da lâmina basal, a qual se mostrou bem definida e situada abaixo das células mioepiteliais. O padrão de desenvolvimento do epitélio secretor apresentou-se variável,

com diferenças na altura das células e grau de diferenciação, em todos os animais de cada um dos genótipos analisados.

As células mioepiteliais, são alongadas e circundam os alvéolos secretores, formando uma estrutura que lembra uma rede. Este tipo celular foi observado em todos os genótipos estudados tanto na microscopia óptica quanto na microscopia eletrônica de transmissão (Figuras 1D e 2B).

A localização das células indiferenciadas mostrou-se invariável entre os genótipos e estas se apresentaram isoladas ou formando pequenos grupos. Estas células exibiram pleomorfismo com relação ao seu tamanho e forma, podendo ser grandes ou pequenas, no entanto sempre menores que as células secretoras. A forma predominante observada foi a triangular, com bordas mais ou menos arredondadas, sugerindo uma conformação tridimensional piramidal. O citoplasma das células indiferenciadas apresentou-se muito eletrólucido e de granulação fina, com raras organelas membranosas e poucas mitocôndrias com formas arredondadas (Figura 3).

Vale ressaltar que estas células apresentam núcleos polimórficos, tendendo a regular. Em muitas células indiferenciadas, o núcleo mostrou-se com uma invaginação, com uma dobra ou bilobulado, sugerindo, talvez, a presença de um retículo nucleoplasmático. Nas células indiferenciadas maiores e menores, o padrão de condensação da cromatina tende a ser eucromático (Figuras 3E-F) e heterocromático (Figuras 3A-D), respectivamente.

Na Figura 3E observa-se um par heterogêneo de células indiferenciadas, com sugestões de que estas passaram recentemente por uma divisão celular mitótica assimétrica, a qual resultou na formação de duas células com quantidades diferentes de citoplasma.

3.3. Células secretoras

O citoplasma das células epiteliais secretoras de cabras do genótipo AA apresentou-se basófilo e representativo da elevada atividade de secreção, a qual é atribuída a este genótipo (Figura 4).

As células secretoras apresentaram-se colunares ou cubóides, com núcleos situados na região basal, presença massiva de organelas membranosas e mitocôndrias eletrondensas, alongadas com cristas não muito bem preservadas. Os núcleos destas células possuem nucléolos evidentes e cromatina descondensada compatíveis com a

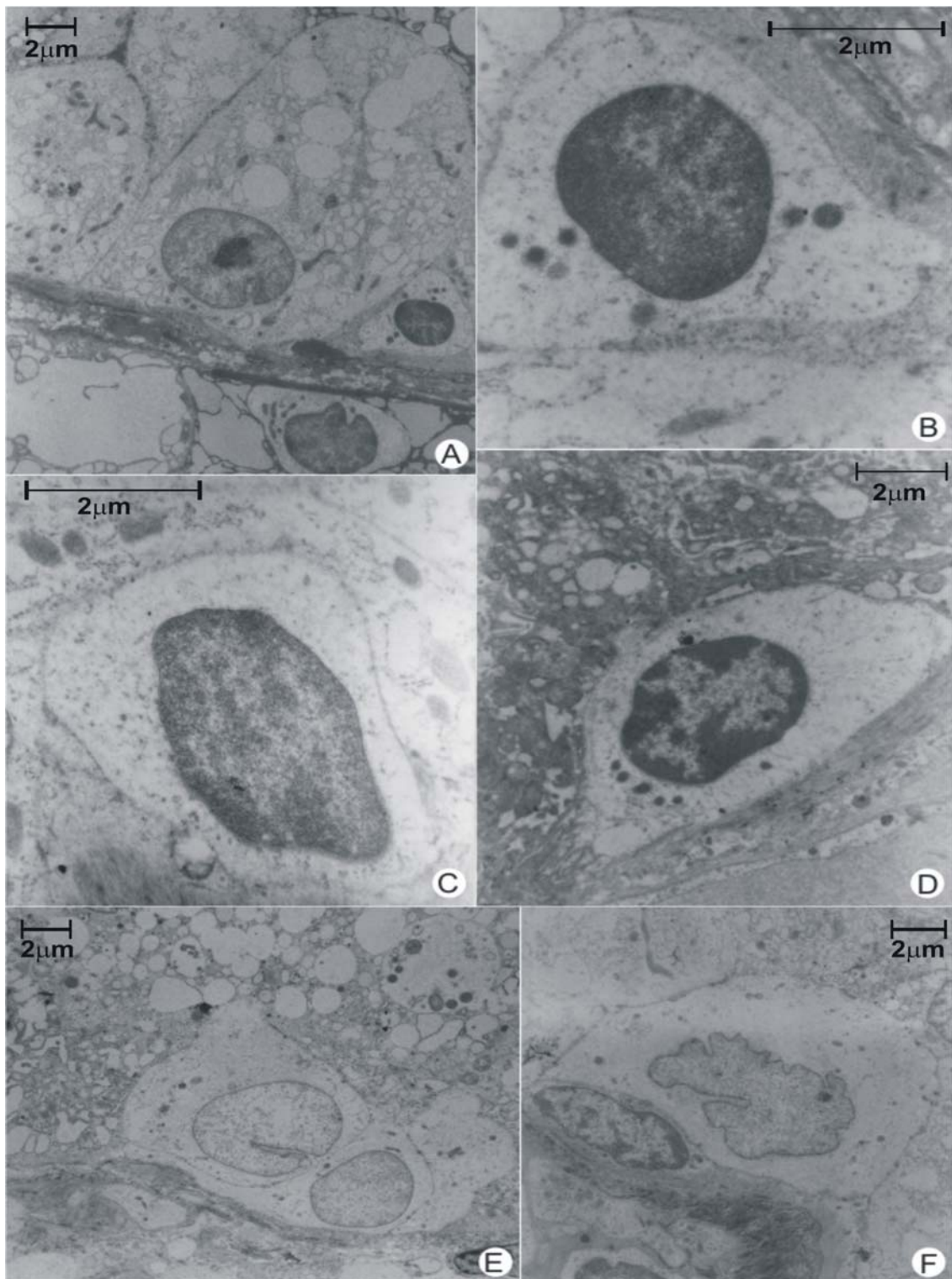


Figura 3 – Micrografias de células indiferenciadas do parênquima mamário de cabras. A magnitude dos aumentos em A e E foi de 4334x, B e C de 18495x, D de 9720x e em F de 6278x. A micrografia B mostra detalhe de A em maior aumento.

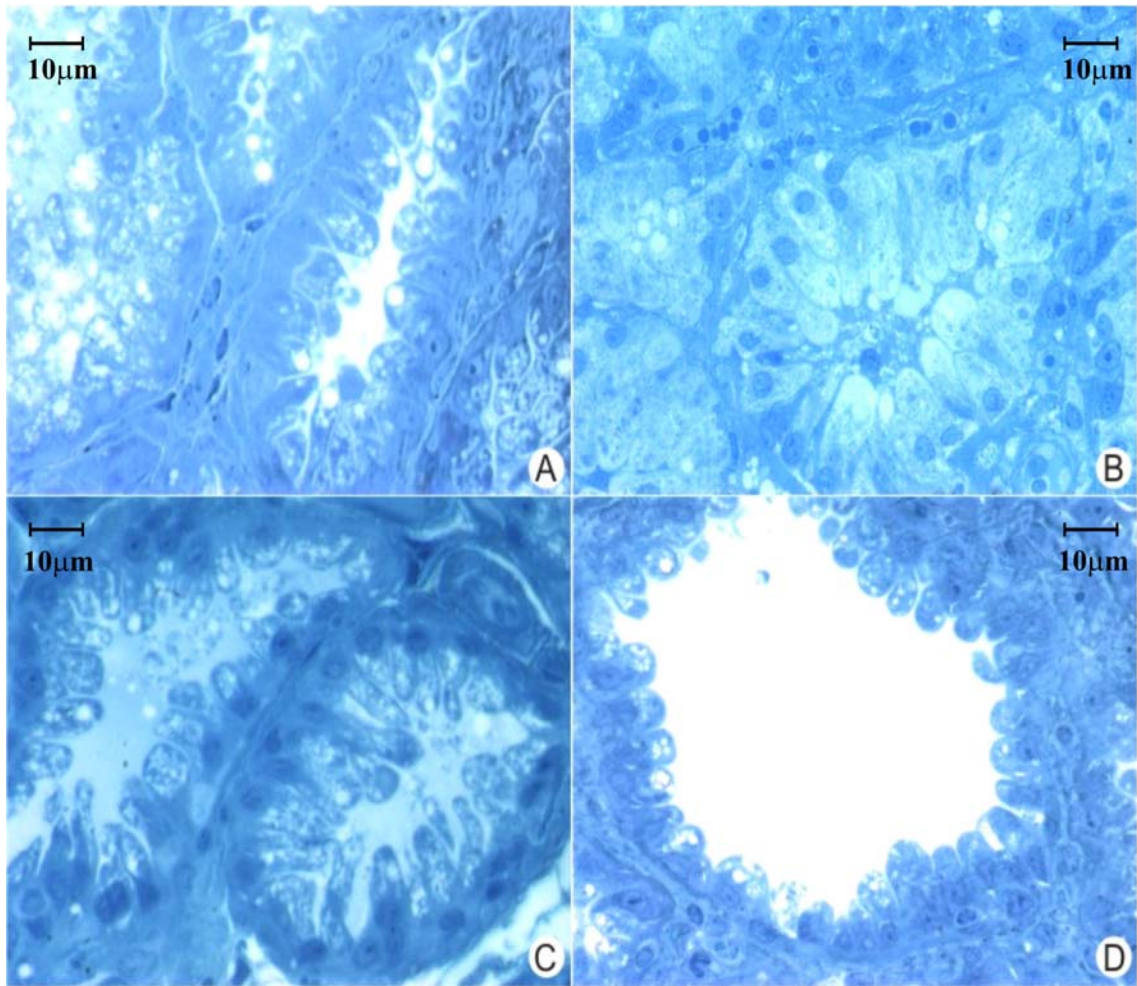


Figura 4 – Parênquima mamário de cabras pertencentes ao genótipo AA. Todas as imagens contêm cortes histológicos semifinos com coloração Richardson. Magnitude dos aumentos em A, B, C e D de 80x.

atividade de síntese exercida por estas células. Microvilosidades curtas e cilíndricas foram observadas na superfície apical das células secretoras, no entanto, estas se apresentaram mais freqüentes nas adjacências do perímetro apical das células (Figura 5A, 9D e 9E).

O citoplasma das células epiteliais secretoras com este genótipo revelou um citoplasma preenchido quase que totalmente preenchido por retículo endoplasmático rugoso e vesículas típicas do Aparelho de Golgi, além de numerosas mitocôndrias (Figura 5).

Ultra-estruturalmente, o citoplasma das células epiteliais secretoras das cabras com genótipo AA mostrou-se diferente daqueles observados nas células secretoras de cabras com genótipos EE, EF e AF, por apresentarem dilatação da luz do sistema de endomembranas do retículo endoplasmático rugoso e Golgi.

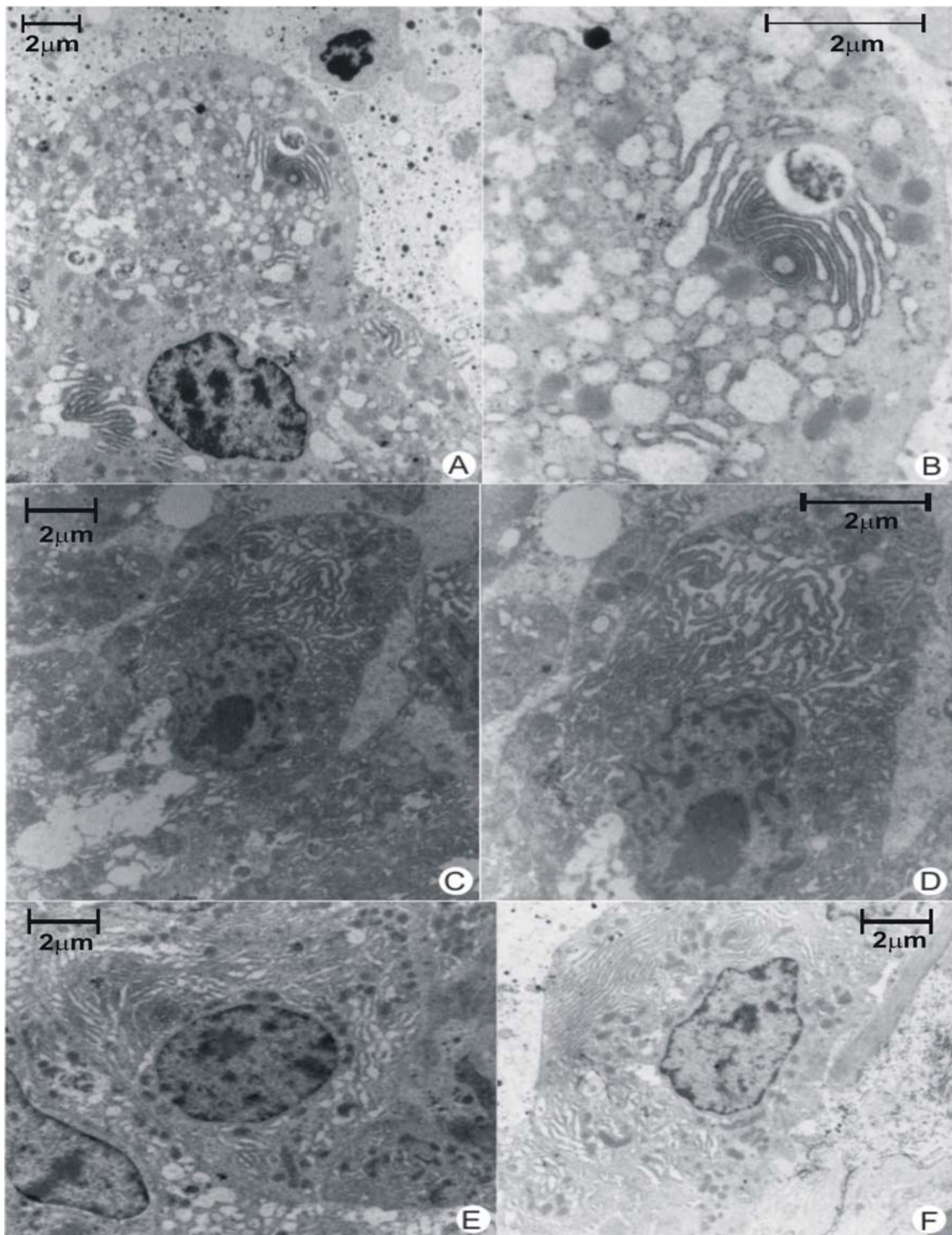


Figura 5 – Micrografias de células epiteliais secretoras do parênquima mamário de cabras pertencentes ao genótipo AA. Magnitude dos aumentos em A, C, E e F de 6278x, em B 18495x e em D 9720x. B mostra detalhe do Aparelho de Golgi de A em maior aumento.

Na glândula mamária de cabras do genótipo EE observou-se a presença de vesículas citoplasmáticas grandes e pequenas, localizadas principalmente nas regiões basal e apical do citoplasma, respectivamente (Figura 6-B). Com o intuito de pesquisar a natureza protéica destas vesículas utilizaram-se as colorações de azul de bromofenol e Xylidine Ponceau. Na coloração de rotina Toluidine-Pironine obteve-se uma coloração relativamente uniforme do citoplasma destas células (Figura 6-C e 6-D).

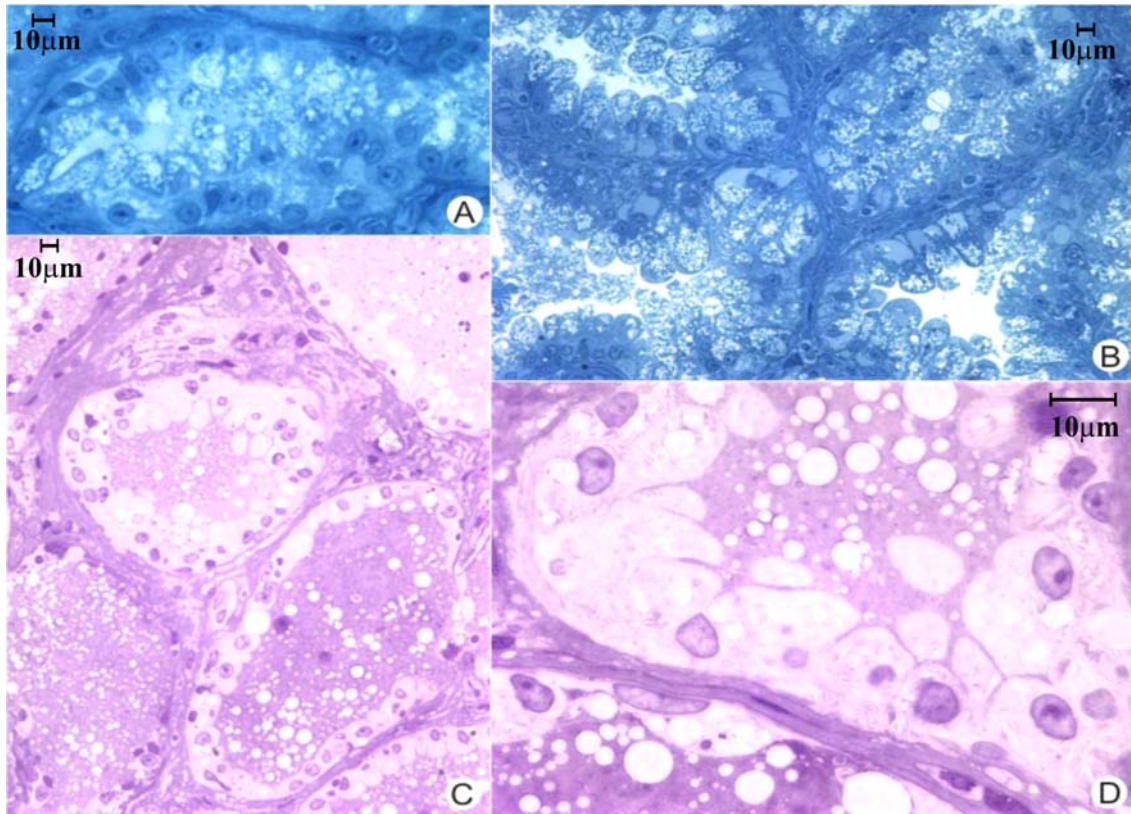


Figura 6 – Parênquima mamário de cabras pertencentes ao genótipo EE. As imagens A e B contêm cortes histológicos semifinos com coloração Richardson e C e D coloração Toluidine-pironine. Magnitude dos aumentos em A de 80x, B e C de 40x, D de 125x.

Nas das células epiteliais secretoras do genótipo EE observou-se a presença de pefis de retículo endoplasmático rugoso e de cisternas de Golgi dilatadas espalhadas pelo citoplasma (Figura 7). Em alguns casos, observaram-se diferenças de eletrondensidade do conteúdo presente na luz dilatada destas estruturas (Figura 7-A) indicando possíveis diferenças na natureza química das mesmas.

Nas células epiteliais secretoras de cabras com genótipos heterozigotos EF e AF observaram-se elementos do sistema de endomembranas com luz dilatada, e este padrão morfológico difere daquele encontrado nos genótipo AA.

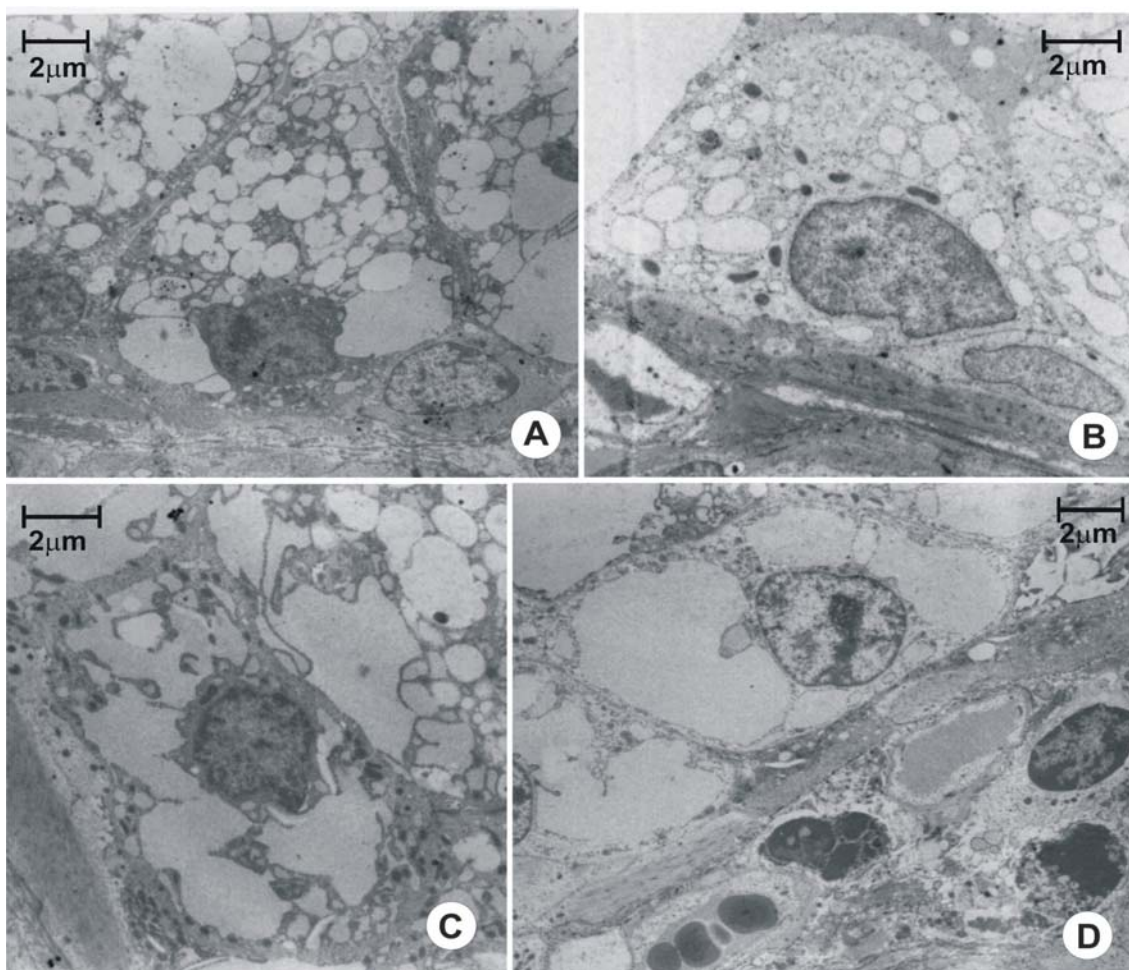


Figura 7 – Ultra-estrutura das células epiteliais secretoras do parênquima mamário de cabras pertencentes ao genótipo EE. Magnitude dos aumentos em A e D de 4334x e B e C de 6278x.

Na glândula mamária de cabras do genótipo EF à semelhança do genótipo EE, as células secretoras apresentaram porções de retículo endoplasmático rugoso com luz dilatada que lembram vesículas grandes, principalmente localizadas na porção basal do citoplasma. Este padrão morfológico também difere do observado no genótipo AA. Neste genótipo, observou-se a presença de gotas com coloração acinzentada na região apical do citoplasma sugestivas da presença de lipídeos no seu conteúdo.

No lúmen alveolar observou-se a presença de partículas citoplasmáticas anucleadas com morfologia similar à do citoplasma das células secretoras no lúmen dos alvéolos, sendo estes indicativos do processo de secreção apócrina do leite descrito para esta espécie (Figura 8).

A ultra-estrutura das células epiteliais secretoras do parênquima mamário das cabras do genótipo EF, revelou a presença de vesículas citoplasmáticas grandes

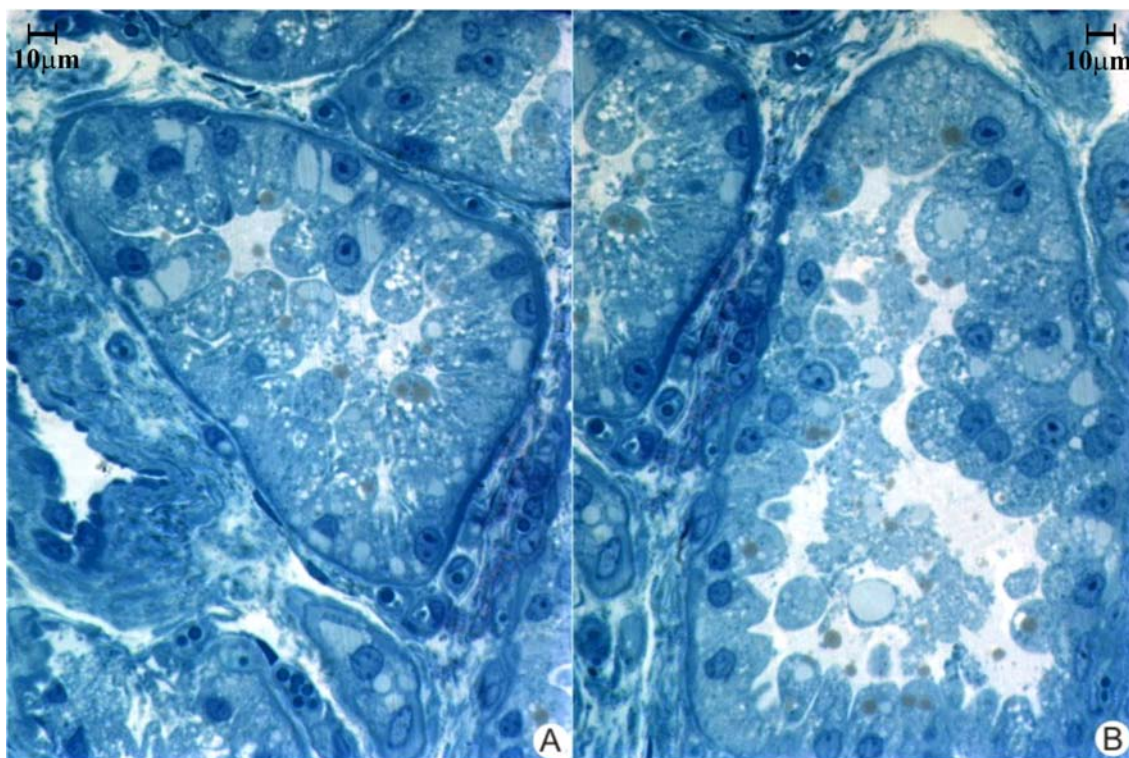


Figura 8 – Morfologia das células epiteliais secretoras do parênquima mamário de cabras pertencentes ao genótipo EF. Todas as imagens contêm cortes histológicos semifinos com coloração Richardson. Magnitude dos aumentos em A e B de 80x.

distribuídas por quase toda a totalidade do citoplasma (Figura 9). A presença de vesículas fortemente contrastadas no citoplasma de algumas células (Figura 9A-D) e outras contendo caseínas (Figura 9A-D-F) também foram visualizadas neste genótipo.

A presença de dilatações na luz do retículo endoplasmático rugoso e Golgi nos genótipos EE e EF dificultaram a visualização da morfologia característica destas organelas e desta forma, o citoplasma apresentou-se repleto destas estruturas semelhantes a vesículas.

Nos animais com o genótipo heterozigoto AF, o padrão morfológico apresentado pelas células epiteliais secretoras do epitélio da glândula mamária mostrou-se intermediário ao apresentado pelos animais dos genótipos AA e EE/EF.

A ultra-estrutura das células epiteliais secretoras da glândula mamária de cabras do genótipo AF mostrou um padrão de vesículas citoplasmáticas ligeiramente dilatadas e também se observou presença de grânulos de caseínas em vesículas citoplasmáticas (Figura 11A-B).

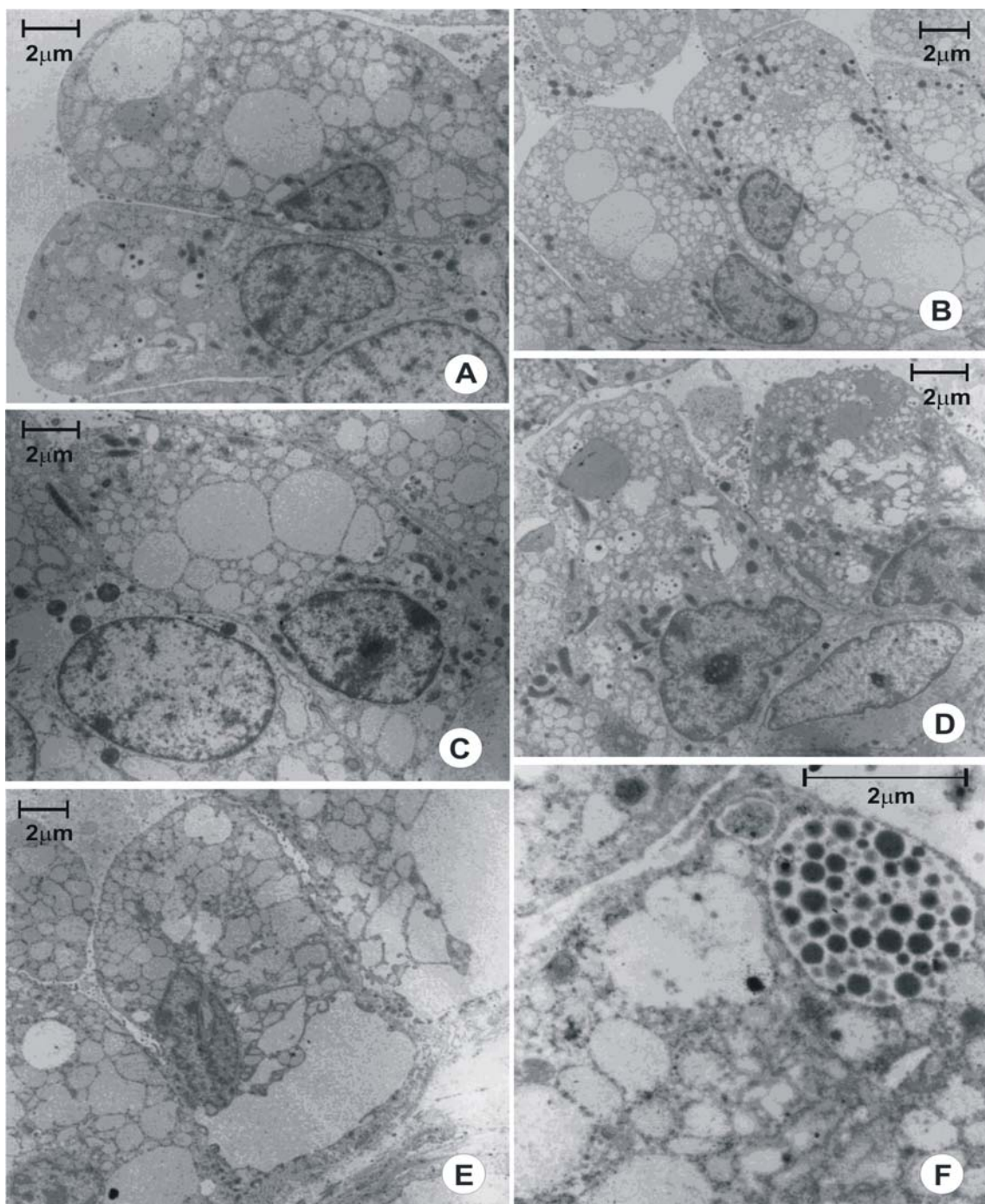


Figura 9 – Ultra-estrutura das células epiteliais secretoras do parênquima mamário de cabras pertencentes ao genótipo EF. Magnitude dos aumentos em A, C, D e E de 6278x, B de 4334x e F de 18495x.

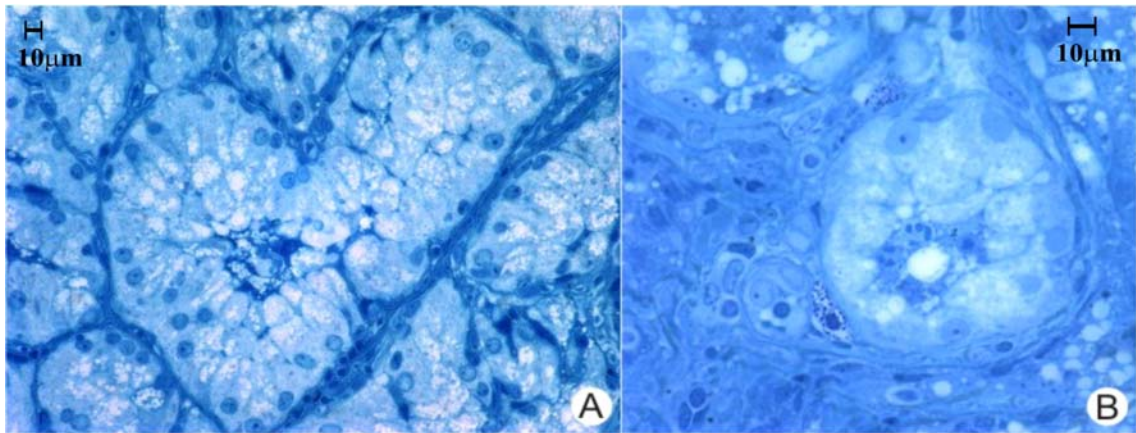


Figura 10 – Morfologia das células epiteliais secretoras do parênquima mamário de cabras pertencentes ao genótipo AF. Todas as imagens contêm cortes histológicos semifinos com coloração Richardson. Magnitude dos aumentos em A de 60x e de B de 80x.

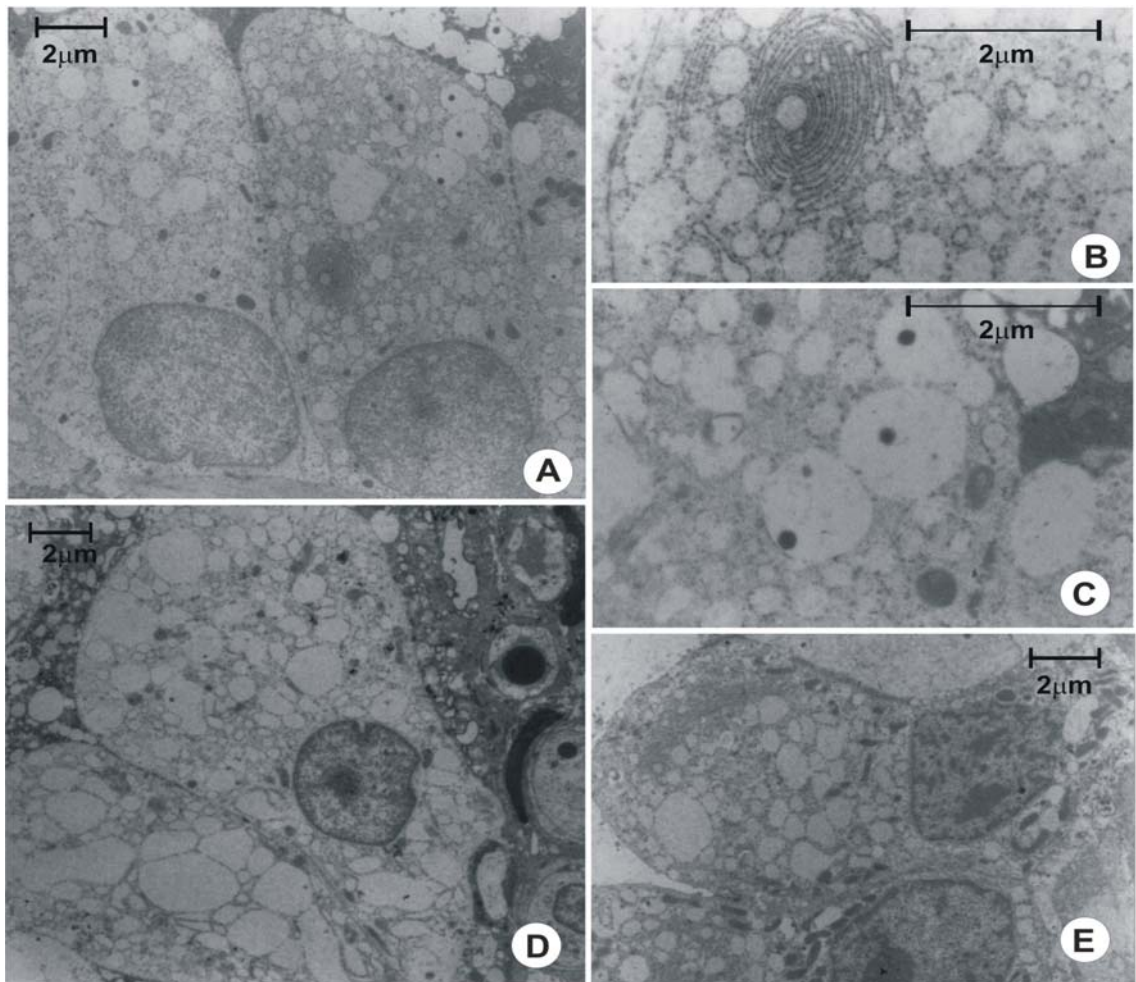


Figura 11 – Ultra-estrutura das células epiteliais secretoras do parênquima mamário de cabras pertencentes ao genótipo AF. Magnitude dos aumentos em A, e E de B e C de 18495x e D de 4334x. B e C contêm detalhes ampliados da micrografia A.

4. Discussão

O padrão organizacional observado nas análises histológicas da glândula mamária de cabras adultas e lactantes, independente dos genótipos para α_{s1} -caseína, e a presença diferentes estágios de diferenciação celular e alveolar nas diferentes amostras analisadas de um mesmo animal mostraram-se compatível com a ativa capacidade de regeneração do epitélio mamário durante a lactação (Ellis e Capuco, 2002; Smith e Boulanger, 2002).

A presença de mastócitos no interstício interlobular do parênquima mamário é compatível com as descrições sobre a localização deste tipo celular em tecidos conjuntivos de órgãos que, como a glândula mamária, possuem contato com o ambiente. As funções específicas deste tipo celular estão relacionadas ao seu papel de efetor nas reações alérgicas e em outras respostas imunológicas associadas a doenças auto-imunes, processos de tolerância periférica e de resposta a patógenos (Mekori e Metcalfe, 2000; Galli *et al.*, 2005; Metz e Maurer, 2007).

Os plasmócitos, que também foram observados no estroma interlobular conjuntivo da glândula mamária de cabras, são células que se diferenciam a partir de linfócitos B através de um processo de diferenciação plasmocítica e sua presença está relacionada com a resposta imune humoral, ou seja, síntese e secreção de imunoglobulinas (Lin *et al.*, 2003).

A presença de células indiferenciadas, multipotentes no epitélio alveolar mamário de cabras lactantes foi descrita por Li *et al.* (1999), por meio do emprego de técnicas de imuno-histoquímica e microscopia óptica. Estes autores denominaram estas células como células claras que exibem formato cubóide, e que não se estendem até o lúmen alveolar e situando-se na região basal das células epiteliais colunares secretoras dos alvéolos.

Neste trabalho a identificação da população de células indiferenciadas através de análises histológicas, mesmo sem a utilização de marcadores imuno-histoquímicos para este tipo celular, foi possível considerando-se apenas a ausência de coloração no citoplasma destas células que é resultante da pouca diferenciação citológica das mesmas como observado anteriormente por Ellis e Capuco (2002) e Woodward *et al.* (2005).

A análise ultra-estrutural de tecidos com capacidade de crescimento e regeneração, como o tecido epitelial mamário, possibilitou a identificação e caracterização das células indiferenciadas específicas (Smith *et al.*, 2002). Estas células

são consideradas progenitoras, ou células-tronco, pois podem se autorenovar e dar origem a outras linhagens de células teciduais. Por definição são consideradas como “células-tronco” aquelas que mantêm suas características indiferenciadas enquanto servem como fonte de células que quando sofrem diferenciação perdem suas características de divisão e adquirem funções especializadas (Chepko e Smith, 1999).

As principais funções atribuídas às “células-tronco” presentes no parênquima mamário consistem em: promoção do desenvolvimento da glândula mamária, permitir a expansão tecidual e o remodelamento da glândula mamária durante os múltiplos ciclos de gestação, lactação e involução e servir como reserva para reparos de lesões teciduais (Woodward *et al.*, 2005).

As observações descritas quanto ao pleomorfismo apresentado pelas células indiferenciadas no parênquima mamário de cabras assemelham-se àquelas relatadas em glândula mamária de ratas por Chepko e Dickson (2003). Chepko e Smith (1997) classificaram as células indiferenciadas do epitélio mamário de ratas com base no tamanho e características de diferenciação em células claras pequenas, células claras grandes indiferenciadas e células claras grandes diferenciadas.

A presença de pares homogêneos ou heterogêneos de células indiferenciadas no epitélio foi relacionada a processo de mitoses simétricas e assimétricas por Chepko e Smith (1997).

As diferenças morfológicas evidenciadas no citoplasma das células epiteliais secretoras nos genótipos AA, EE, EF e AF para o gene da α_{s1} -caseína refletiram as diferentes expressões deste gene nestes genótipos e seus reflexos na atividade de secreção destas células. No genótipo AA, o citoplasma das células epiteliais secretoras apresentou-se basófilo e representativo da elevada atividade de secreção, a qual é atribuída a este genótipo.

A presença de dilatações na luz do retículo endoplasmático rugoso e cisternas de Golgi, nos genótipos EE e EF, reforça os achados de Chanat *et al.* (1999) que observaram estas peculiaridades morfológicas no citoplasma das células epiteliais secretoras, em animais homocigotos para os alelos O, F, G e E, as quais são sugestivas de disfunção nos mecanismos de secreção das caseínas do leite na presença de alelos com expressão intermediária, baixa ou nula de α_{s1} -caseína.

O padrão de vesículas fortemente dilatadas que observamos no genótipo EE difere do apresentado por Chanat *et al.* (1999) que descreve dilatação moderada das vesículas do retículo endoplasmático nas células epiteliais secretoras deste genótipo.

Estes mesmos autores concluíram com base em dados de microscopia eletrônica que a secreção das caseínas pelo retículo endoplasmático é dependente da α_{s1} -caseína. Sabendo-se que a agregação das caseínas, para a formação das micelas, inicia-se dentro das vesículas do complexo de Golgi, após a fosforilação das mesmas, e é dependente da concentração de α_{s1} -caseína, o perfil de grandes vesículas citoplasmáticas é compatível com estas possíveis falhas nos processos de secreção dos constituintes do leite.

Considerando os resultados histológicos obtidos com as colorações específicas para proteínas, pode-se inferir que a natureza das porções dilatadas do retículo endoplasmático rugoso e das cisternas de Golgi observadas no genótipo EE e EF não é exclusivamente protéica. Na ultra-estrutura das células secretoras deste genótipo também foram observadas diferenças de eletrondensidade em vesículas situadas principalmente na região apical (Figura 7-A e 9D) corroborando com possíveis diferenças na natureza química das mesmas, possivelmente incluindo a presença de lipídeos. Segundo Evers (2004) as vesículas contendo os glóbulos de gordura formam-se na região basal e tendem a se fundir com vesículas do complexo de Golgi à medida que migram para a região apical das células secretoras do epitélio mamário.

Devido a particularidades da metodologia utilizada para a preparação do material destinado às análises por microscopia eletrônica de transmissão, a diferenciação entre as porções dilatadas do retículo endoplasmático rugoso e cisternas de Golgi foi prejudicada pela dificuldade de visualização de ribossomos ligados a membrana do retículo endoplasmático rugoso.

Os padrões histológico e ultra-estrutural apresentados pelas células epiteliais secretoras do genótipo heterozigoto AF contendo vesículas citoplasmáticas ligeiramente dilatadas mostraram-se intermediários àqueles apresentados pelos animais dos genótipos AA e EE/EF, sendo compatível com a presença de um alelo de alta expressão e um de baixa expressão para o gene da α_{s1} -caseína.

5. Conclusão

O padrão de organização geral do parênquima mamário de cabras em lactação e os tipos celulares presentes não variam em função dos genótipos para α_{s1} -caseína analisados AA, EE, EF e AF.

A morfologia e a ultra-estrutura das células epiteliais secretoras da glândula mamária de cabras estão fortemente associadas ao genótipo para α_{s1} -caseína. Os

genótipos EE e EF são os que mais diferem do padrão morfológico apresentado pelo genótipo AA devido a presença de dilatações nas vesículas do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, enquanto o padrão das células epiteliais dos animais AF mostrou-se intermediário.

Literatura Citada

BEVILACQUA, C.; FERRANTI, P.; GARRO, G.; VELTRI, C.; LAGONIGRO, R.; LEROUX, C. E.; ADDEO, F.; PILLA, F.; CHIANESE, L.; MARTIN, P. Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new alpha (s1) casein variant found in goat species. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 4, p. 1293-1303, 2002.

BHATTACHARYYA, J.; DAS, K. P. Molecular Chaperone-like properties of unfolded protein, α_{s1} -casein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 22, p. 15505-15509, 1999.

BOULANGER, A.; GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M. F. Polymorphisme des caséines α_{s1} et α_{s2} de la chèvre (*Capra hircus*). **Génétique Sélection Evolution**, v. 16, p. 157-175, 1984.

BOUTINAUD, M.; JAMMES, H. Potential uses of milk epithelial cells: a review. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 133-147, 2002.

BRAMANTI, E.; SORTINO, C.; ONOR, M. Separation and determination of denatured alpha(s1)-, alpha(s2)-, beta- and kappa-caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses. **Journal of Chromatography A**, n. 994, v. 1-2, p. 59-74, 2003.

BRIGNON, G.; MAHE, M. F.; RIBADEAUDUMAS, B. Two of the three genetic-variants of goat alpha-s1-casein which are synthesized at a reduced level have an internal deletion possibly due to altered RNA splicing. **European Journal of Biochemistry**, v. 193, n. 1, p. 237-241, 1990.

BRIGNON, G.; MAHE, M.-F.; GROSCLAUDE, F. Sequence of caprine α_{s1} -CN and characterization of those of its genetic variants which are synthesized at a high level, α_{s1} -CN A, B and C. **Protein Sequences and Data Analysis**, v. 2, p. 181-188, 1989.

CHANAT, E.; MARTIN, P.; OLLIVIER-BOUSQUET, M. α_{s1} -casein is required for the efficient transport of β and κ casein from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 3399-3412, 1999.

CHEPKO, G.; SMITH, G. H. Mammary epithelial stem cells: Our current understanding. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 4, n. 1, p. 35-52, 1999.

CHEPKO, G.; DICKSON, R. B. Ultrastructure of putative stem cell niche in rat mammary epithelium. **Tissue e Cell**, v. 35, p. 83-93, 2003.

CHEPKO, G.; SMITH, G. H. Three division-competent, structurally-distinct cell populations contribute to murine mammary epithelial renewal. **Tissue e Cell**, v. 29, n. 2, p.239-253, 1997.

COZENZA, G.; ILLARIO, R.; RANDO, A.; DI GREGORIO, P.; MASINA, P.; RAMUNNO, L. Molecular characterization of the goat *CSN1S101* allele. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 237-240, 2003.

DAVID, V. A.; DEUTCH, A. H. Detection of bovine α_{s1} -casein genomic variants using the allele-specific polymerase chain reaction. **Animal Genetics**, v. 23, p. 425-429, 1992.

DYKSTRA, M. J. **A manual of applied techniques for biological electron microscopy**. New York and London, 1993. 253 p.

ELLIS, S.; CAPUCO, A. V. Cell proliferation in bovine mammary epithelium: identification of the primary proliferative cell population. **Tissue e Cell**, v. 34, n. 3, p. 155-163, 2002.

EVERS, J. M. The milk fat globule membrane-compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 661-674, 2004.

FARRELL JR., H. M.; MALIN, E. L.; BROWN, E. M.; QI, P. X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid e Interface Science**, v. 11, p. 135-147, 2006.

GALLI, S. J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nature Immununology**, v. 6, n. 2, p. 135-142, 2005.

GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M. F.; BRIGNON, G.; Di STASIO, L.; JEUNET, R. A. Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat α_{s1} -casein. **Génétique Sélection Evolution**, v. 19, p. 399-412, 1987.

GROSCLAUDE, F.; RICORDEOU, G.; MARTIN, P.; REMEUF, F.; VASSAL, L.; BOULLON, J. Du gène au fromage: Le polymorphisme de la caséine α_{s1} caprine, ses effets son evolution. **INRA Prodctions Animales**, v. 7, p. 3-19, 1994.

- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.
- LEROUX, C.; MARTIN, P.; MAHÉ, M. F.; LEVÉZIEL, H.; MERCIER, J. C. Restriction fragment length polymorphism identification of goat α_{s1} -casein alleles: a potential tool in selection of individuals carrying alleles associated with a high level protein synthesis. **Animal Genetics**, v. 21, p. 341-351, 1990.
- LI, P.; WILDE, C. J.; FINCH, L. M. B.; FERNIG, D. G.; RUDLAND, P. S. Identification of cell types in the developing goat mammary gland. **The Histochemical Journal**, v. 31, p. 379-393, 1999.
- LIN, K-I.; CHAINARONG, T.; KATHRYN, C. Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation. **Immunological Reviews**, v. 194, n. 19-28, 2003.
- MAHÉ, M. F.; GROSCLAUDE, F. α_{s1} CND another allele associated with a decreased synthesis rate at the caprine α_{s1} -casein locus. **Génétique Sélection Evolution**, v. 21, p. 127-129, 1989.
- MARTIN, P. Polymorphism génétique des lactoprotéines caprines. **Lait**, n. 73, p. 511-532, 1993.
- MARTIN, P.; OLLIVIER-BOUSQUET, M.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of caseins: a tool to investigate casein micelle organization. **International Dairy Journal**, v. 9, n., p. 163-171, 1999.
- MEKORI, Y. A.; METCALFE, D. D. Mast cells in innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 173, p. 131-140, 2000.
- METZ, M.; MAURER, M. Mast cells – key effector cells in immune responses. **Trends in Immunology**, 2007 (in press).
- MORGAN, F.; MICAULT, S.; FAUQUANT, J. Combined effect of whey protein and α_{s1} -casein genotype on the heat stability of goat milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 2, p. 64-68, 2001.
- MORGAN, P. E.; TREWEEK, T. M.; LINDNER, R. A.; PRICE, W. E.; CARVER, J. A. Casein protein as molecular chaperones. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 2670-2683, 2005.
- NEVEU, C.; RIAUBLANC, A.; MIRANDA, G.; CHICH, J.F.; MARIN, P. Is the milk secretion process observed in the goat species rooted in the perturbation of the intracellular transport mechanism induced by defective alleles at the α_{s1} -CN locus? **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p.163-172, 2002.

RAMUNNO, L.; COZENZA, G.; PAPPALARDO, M.; PASTORE, N.; GALLO, D.; Di GREGORIO, P.; MASINA, P. Identification of the goat *CSNIS1F* allele by means of PCR-RFLP method. **Animal Genetics**, v. 31, p. 342-343, 2000.

RAMUNNO, L.; COZENZA, G.; RANDO, A.; ILLARIO, R.; GALLO, D.; Di BERNARDINO, D.; MASINA, P. The goat α_{s1} -casein gene: gene structure and promoter analysis. **Gene**, v. 334, p. 105-111, 2004.

SHENNAN, D. B.; PEAKER, M. Transport of milk constituents by the mammary gland. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 925-951, 2000.

SMITH, G. H.; BOULANGER, C. A. Mammary stem cell repertorie: new insights in aging epithelial populations. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 123, p. 1505-1519, 2002.

SMITH, G. H.; STRICKLAND, P.; DANIEL, C. W. Putative epithelial cell loss corresponds with mammary growth senescence. **Cell Tissue Research**, v. 310, p. 313-320, 2002.

STRUM, J. M. A mammary gland whole mount technique that preserves cell fine structure for electron microscopy. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 1271-1274, 1979.

TIEDT, L. R.; JOOSTE, W. J.; HAMILTON-ATTWELL, V. L. Techniques preserving aerial fungus structures for scanning electron microscopy. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n. 3, p. 420-421, 1987.

WOODING, F. B. P. The mechanism of secretion of the milk fat globule. **Journal of Cell Science**, v. 9, p. 805-821, 1971.

WOODING, F. B. P.; PEAKER, L. J. Theories of milk secretion evidence from electronmicroscopic examination of milk. **Nature**, v. 226, p. 762-764, 1970.

WOODWARD, W. A.; CHEN, M. S.; BEHBOD, F.; ROSEN, J. M. On mammary stem cells. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 9585-9594, 2005.