

# EFEITOS DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE DE OVELHA

A seleção assistida por marcadores genéticos associados com a produção e qualidade do leite, e a sua aptidão à coagulação permitirá adaptar processos de fabrico e potenciar a qualidade dos produtos protegidos pelas diversas DOP e IGP de queijos tradicionais portugueses.

A fileira do leite dos pequenos ruminantes tem um elevado défice de rentabilidade em Portugal, agravado nos últimos 10 anos (2009-2019), com a quebra de produção de 14% do leite de ovelha, a qual se reflete no abandono da atividade, e inclusive na diminuição do fabrico de produtos qualificados (DOP e IGP). A reduzida valorização dos produtos e dos coprodutos de origem ovina tem limitado o desenvolvimento do setor. Aumentar o conhecimento sobre a aptidão tecnológica do leite das raças exóticas, que atualmente é utilizado em Portugal, e implementar programas de melhoramento das raças com base em marcadores genéticos associados à aptidão tecnológica do leite em função da sua utilização são estratégias que poderão contribuir para sustentabilidade da fileira.

As raças ovinas em geral, e ao contrário do que acontece na principal raça bovina de leite, a Holstein, preservam uma diversidade genética que permite estabelecer critérios de seleção em função do destino do leite. A seleção precoce de animais (Figura 1) com potencial de produção de leites de elevada qualidade nutricional e funcionalmente mais adequados à produção de queijo permitirá incrementar a diferenciação e a qualidade nutracêutica dos produtos, introduzindo mais valor acrescentado na fileira e potenciando a sustentabilidade dos sistemas de produção de ovinos de leite.



**Figura 1** – Seleção precoce de reprodutores assistida por marcadores genéticos.

Marques, M.R.; Ribeiro, J.M.B.; Martins, A.P.; Belo, C.C.;  
Belo, A.T.

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária





**Figura 2** – Rebanho de ovelhas Assaf a caminho da ordenha da tarde.

### A raça

Para melhorar os produtos lácteos e desenvolver novos produtos é necessário um aprofundado conhecimento das características do leite<sup>[1]</sup>. O teor em gordura e proteína afetam significativamente a aptidão tecnológica dos leites para a produção de queijo<sup>[2]</sup>. O fator raça influencia marcadamente a composição do leite e a sua aptidão tecnológica para o fabrico de queijo. Martins *et al.*<sup>[2]</sup> investigaram o efeito das raças Merino, Saloia e Assaf (Figura 2) na composição e nas propriedades de coagulação do leite, na região de produção do queijo de Niza. Concluíram que as raças Merino e Saloia apresentaram leites com maior teor em sólidos totais, o que se refletiu numa produção potencial de queijo superior em 75% e 27% em relação à raça Assaf, respetivamente. Os autores<sup>[2]</sup> observaram diferenças nos parâmetros de coagulação do leite: a firmeza da coalhada foi maior no leite da raça Merino e menor no de ovelhas Assaf. A taxa de endurecimento também foi menor no leite da raça Assaf, sendo superior para o leite das ovelhas da raça Saloia. Os resultados realçam a necessidade de se equacionar a relação entre as características do leite de cada raça e o produto potencial que pode ser obtido em função da tecnologia de fabrico.

### A alimentação

Os produtores que têm animais de uma determinada raça podem melhorar a composição do leite através da alimentação (Figura 3). A gordura é um constituinte importante que contribui para a qualidade nutricional do leite e produtos lácteos<sup>[3]</sup>. As características físicas e químicas da forragem e o tipo de suplemento oferecido às ovelhas leiteiras afetam a composição dos ácidos gordos da gordura do leite<sup>[4-6]</sup>. Ovelhas leiteiras, com alta necessidade de energia e proteína para a produção de leite, devem receber forragem de alta qualidade com baixos



**Figura 3** – Ovelhas Assaf em pastoreio.

níveis de NDF\* e alta digestibilidade e teor em proteína. Quando a qualidade da erva diminui, a produção de leite também diminui e a composição do leite altera-se<sup>[4]</sup>.

As proteínas do leite de ovelha são compostas principalmente por caseínas e proteínas do soro (lactalbumina e lactoglobulina). Estas proteínas são responsáveis pelas propriedades únicas do leite de ovelha para o fabrico de queijo e outros produtos lácteos. A sua produção é controlada por fatores genéticos, sendo difícil de alterar através da manipulação das dietas dos animais.

## O genótipo

A produção e a composição do leite são reguladas por um conjunto alargado de genes (Figura 4) que exercem a sua ação funcional ao nível do desenvolvimento da glândula mamária, diferenciação e renovação celular, síntese e secreção do leite, promovendo o aumento da absorção de nutrientes necessários para a síntese do leite, o aumento da atividade das células secretoras e a sua manutenção. O efeito do genótipo sobre a produção, a composição do leite e a sua aptidão à coagulação em ovinos foi avaliado em diversos estudos<sup>[7]</sup>.

Os estudos iniciais nesta área centraram-se sobre os efeitos de polimorfismos nos genes que codificam para as caseínas (Cn), que representam 76–83% das proteínas contidas no leite de ovelha<sup>[8, 9]</sup>. O leite de ovelha tem quatro tipos de caseínas,  $\alpha$ 1-Cn,  $\alpha$ 2-Cn,  $\beta$ -Cn e  $\kappa$ -Cn, e seus genes codificadores (CSN1S1, CSN1S, CSN2 e CSN3, respetivamente) estão agrupados numa região do cromossomo 6 ovino (OAR6)<sup>[10, 11]</sup>. Polimorfismos nas regiões codificantes dos genes da caseína foram associados com efeitos na produção de leite<sup>[12, 13]</sup>, nos teores em gordura<sup>[13]</sup> e proteína do leite<sup>[11, 13, 14]</sup>, e nas propriedades tecnológicas, como o tempo de coagulação e a firmeza da coalhada<sup>[11]</sup>.

Entre os genes com efeitos sobre a regulação endócrina da produção de leite estão os genes da

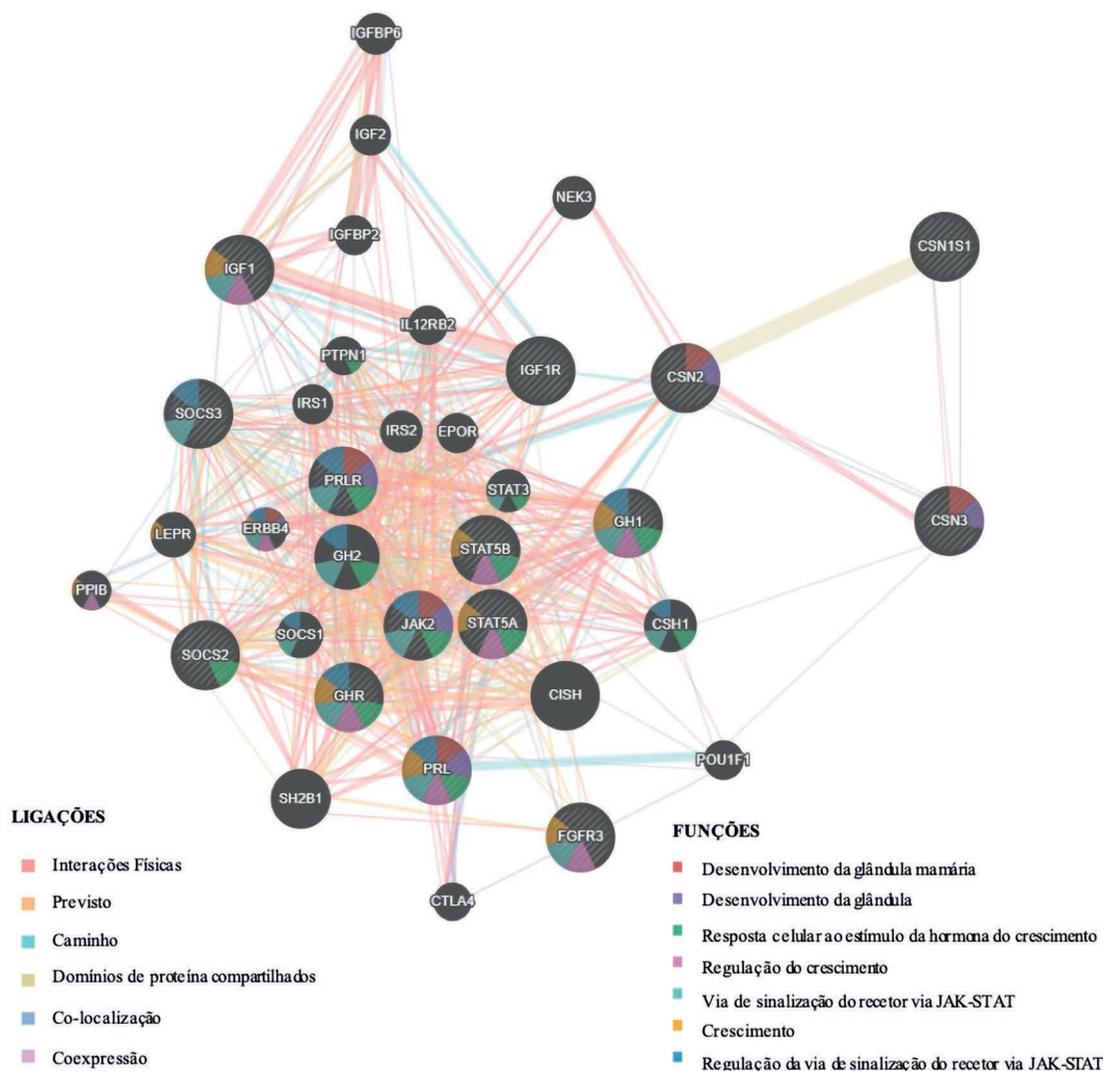
hormona do crescimento (GH). O gene da GH apresenta-se duplicado em ovinos, tendo sido encontrados polimorfismos em ambas as cópias (GH2-N e GH2-Z)<sup>[15–18]</sup>, os quais foram associados com a produção de leite nas raças Serra da Estrela<sup>[16]</sup>, Saloia e Assaf<sup>[17]</sup>, e Sarda<sup>[19, 20]</sup>, com a qualidade do leite<sup>[16, 20]</sup> e com a sua aptidão tecnológica na raça Serra da Estrela<sup>[18]</sup>. Mais recentemente, com a evolução das ferramentas moleculares e bioinformáticas, por um lado, e com a redução dos custos de sequenciação dos genomas, foi possível estudar um grande número de polimorfismos distribuídos por todo o genoma e identificar vários genes candidatos nas raças ovinas leiteiras e não leiteiras<sup>[21–24]</sup>, incluindo, entre outros, a fosfoproteína 1 secretada (SPP1), a proteína O-fucosiltransferase 1 (POFUT1), o recetor de prolactina (PRLR), o enzima acetil-CoA carboxilase (ACACA), a  $\alpha$ -lactalbumina (LALBA), o recetor da hormona do crescimento (GHR), o recetor da hormona liberadora da hormona do crescimento (GHRHR) e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1).

Na sequência dos estudos desenvolvidos no INIAV<sup>[16, 18]</sup> e de evidências que apontam para a associação significativa entre os polimorfismos dos genes do eixo somatotrópico e a produção e a qualidade do leite e a sua aptidão tecnológica, surgiu o projeto GenPrOv\*\* com o objetivo de identificar SNPs em genes candidatos para as referidas características na raça Assaf.



\* NDF – fibra detergente neutro.

\*\* Projeto GenPrOv – Marcadores GENéticos para a PRodução e qualidade do leite em OVelhas da raça Assaf (ALT20-03-0145-FEDER-000019) cofinanciado pelo programa Alentejo2020 através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional.



**Figura 4** – Interações entre os genes do eixo somatotrófico com possíveis efeitos sobre a produção e a qualidade do leite.

Nota: Genes estudados no projeto GenPrOv: GH1 – hormona do crescimento 1; GH2 - hormona do crescimento 1; GHR – recetor da GH; PRL – prolactina, PRLR – recetor da PRL; IGF1 – fator de crescimento semelhante à insulina 1; IGF2 – fator de crescimento semelhante à insulina 2; IGF1R – recetor do fator de crescimento semelhante à insulina 1; JAK2 – Janus kinase 2; STAT3 – transdutor de sinal e ativador de transcrição 3; STAT5A – transdutor de sinal e ativador de transcrição 5A; STAT5B – transdutor de sinal e ativador de transcrição 5B; SOCS2 – supressor do sinal da citocina 2; SOCS3 – supressor do sinal da citocina 3; FGFR3 – recetor do fator de crescimento do fibroblasto 3. Fonte: GeneMANIA (<https://genemania.org>).

Inicialmente foram estudados através de análises bioinformáticas 202 polimorfismos de uma única base (SNPs) distribuídos por 22 genes que causam substituições de aminoácidos (aa) nas cadeias das respetivas proteínas. Destes, foram escolhidos para genotipar por SNaPshot® os 65 cuja alteração de aa se previu poder afetar mais significativamente a estrutura e a função da respetiva proteína. No Quadro 1 são apresentados os 14 SNPs que afetam significativamente os parâmetros leiteiros estudados.

Verificaram-se efeitos dos SNPs *per se*, ou em conjunto (haplótipos), sobre alguns dos parâmetros e também sobre a evolução dos mesmos ao longo da lactação. Encontraram-se SNPs associados com a produção de leite nos genes GH2-N, PRL, PRLR e IGF1 e com a quantidade de gordura nos genes IGF1 e IGF1-R. Da observação do Quadro 1 levanta-se a hipótese dos haplótipos potenciarem efeitos não observáveis na análise individual dos SNPs como fica evidente para os haplótipos da GH2-N e GHR,

**Quadro 1 – Efeitos dos polimorfismos de uma única base (SNPs) encontrados em genes do eixo somatotrópico associados a caracteres leiteiros em ovelhas da raça Assaf**

Gene	Nome	Chr.	SNP	Aminoácido	Efeito sobre <sup>a)</sup>	P-value	
GH2-N	Hormona do crescimento	11	g.597T>C	Leu11Pro	Evolução da firmeza da coalhada (AR) ao longo da lactação	**	
			g.1024T>C	Phe78Leu		*	
			g.597T>C + g.1024T>C	Leu11Pro; Phe78Leu		Produção média diária de leite	*
						Evolução do TP ao longo da lactação	*
						Evolução do TST ao longo da lactação	*
						Evolução da firmeza da coalhada (AR) ao longo da lactação	**
GHR	Recetor da hormona do crescimento	16	rs1086611503	Ser380Pro	Evolução do TP ao longo da lactação	*	
			rs597181420	Ala529Thr	Evolução do TST ao longo da lactação	*	
					pH	*	
					Tempo de coagulação (R)	*	
					Tempo de coagulação (R)	*	
rs1086611503+ rs595567866+ rs597181420	Ser380Pro; Lys392Glu; Ala529Thr	Firmeza da coalhada (AR)	**				
PRL	Prolactina	20	rs412263261	Val7Gly	Produção de leite aos 150 d	*	
			rs406266481	Arg75=	Produção total de leite	*	
					Produção total de leite	*	
					Duração da lactação	*	
					TSTiMG	*	
g.23731G>T	-	Tempo de coagulação (R)	*				
PRLR	Recetor da prolactina	16	rs604784916	Arg351Trp	Produção total de leite	*	
			rs600947105	Pro528Leu	Duração da lactação	*	
					TP	*	
Evolução da firmeza da coalhada (AR20) ao longo da lactação	**						
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1	3	rs401028781	-	Duração da lactação	*	
			rs161082711	-	Quantidade de gordura	†	
IGF1-R	Recetor do fator de crescimento semelhante à insulina 1	18	rs1094731965	Met534Arg	Persistência da lactação	†	
					Quantidade de gordura	*	
					Quantidade de sólidos totais	*	
Evolução da quantidade de Ureia-N ao longo da lactação	*						
FGFR3	Recetor do fator de crescimento dos fibroblastos 3	6	g.128784747A>C	Val559Glu	Evolução do TP ao longo da lactação	†	

<sup>a)</sup> TP – teor em proteína; TST – teor em sólidos totais; TSTiMG – teor em sólidos totais isentos de matéria gorda. † – P<0,05; \* – P<0,05; \*\* – P<0,01.

os quais foram associados como alterações do teor proteico e em sólidos totais do leite e com a firmeza da coalhada e tempo de coagulação no caso da GH2-N. Resultados similares foram observados no

gene da GH na raça Serra da Estrela<sup>[18]</sup> e em outros SNPs do gene do GHR na raça Sarda<sup>[24]</sup>. O gene da PRL está localizado na imediação dum loci associado a caracteres de produção de leite<sup>[25]</sup>.

Foram descritas duas variantes alélicas neste gene, cujos efeitos sobre a produção e a qualidade do leite são controversos. Ramos *et al.*<sup>[12]</sup> verificaram que o genótipo PRL BB apresenta não apenas os maiores teores de proteína e gordura, mas também a maior produção de leite em ovelhas Serra da Estrela. Pelo contrário, em ovelhas da raça Frísia Oriental, o genótipo PRL AA foi o que apresentou forte associação com a produção de leite<sup>[26]</sup>. Em relação ao SNP rs406266481, polimórfico e associado significativamente com a produção de leite, a duração da lactação e o teor em sólidos totais isentos de matéria gorda na raça Assaf (Quadro 1), este polimorfismo não foi encontrado na raça Sarda<sup>[27]</sup>. Assim, como referiu Staiger *et al.*<sup>[26]</sup>, essas associações com a produção e qualidade do leite requerem validações adicionais, sendo fortemente dependentes das raças, da fase de lactação e dos sistemas de produção. A PRLR é uma proteína membrana da superfamília dos recetores das citocinas (tal como o GHR) cuja expressão diferencial varia em função das fases da lactação. Polimorfismos do PRLR foram associados a alterações da glândula mamária ao longo da lactação<sup>[28]</sup>, ao teor em lactose, ao nível de células somáticas, tempo de coagulação da coalhada e taxa de endurecimento da coalhada<sup>[24]</sup>.

Uma vez que a síntese da lactose do leite é mediada pelo sistema PRL/PRLR<sup>[29]</sup>, seria de esperar que polimorfismos nestes genes afetassem significativamente não só a produção de leite, mas também o teor em lactose do leite, o que não se verificou.

Por outro lado, os efeitos observados sobre os parâmetros de aptidão à coagulação do leite eram expectáveis, pois a expressão dos genes das caseínas é mediada por fatores de transcrição ativados pela ligação GH-GHR e PRL-PRLR.

Muitos dos efeitos galactopoiéticos da GH são mediados pelo IGF-1<sup>[30]</sup>, o qual é produzido em vários tecidos, mas principalmente no fígado, em resposta à estimulação da GH. Em ovelhas, polimorfismos no gene IGF-1 influenciam a persistência da lactação<sup>[31]</sup>, o que está de acordo com os resultados observados na raça Assaf (Quadro 1). Em ambas as raças, foram estudados SNPs na região 5' não transcrita do gene onde se localizam locais de ligação putativos de

PUBLICIDADE  
1/2 página

fatores de transcrição que influenciam a atividade funcional do gene do IGF-1.

A evolução do teor de proteína do leite ao longo da lactação foi também influenciada por um polimorfismo no gene do recetor do fator de crescimento dos fibroblastos 3 (FGFR3). Um polimorfismo neste gene foi associado, na sua forma homozigótica à síndrome do borrego aranha<sup>[32]</sup>, e na forma heterozigótica a um maior crescimento esquelético dos animais, sendo apontado como um possível marcador genético para aumentar a produção de carne, sendo esta a primeira vez que é reportada a sua associação com caracteres leiteiros.

### Perspetivas futuras

No âmbito do projeto GenPrOv, estão em fase de conclusão a associação genótipos/haplótipos destes e de outros genes do eixo somatotrópico e os caracteres fenotípicos para a produção, a qualidade do leite e o rendimento queijeiro, com o objetivo de encontrar, na raça Assaf, marcadores genéticos para a produção de leite de qualidade para o fabrico de queijo. 🍷

### Bibliografia

- [1] Balthazar, C.F. et al. (2017). *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **16**:247–262.
- [2] Martins, A.P.L. et al. (2009). *Options Méditerranéennes*, **91**:221–225.
- [3] Ferlay, A. et al. (2017). *Biochimie*, **141**:107–120.
- [4] Marques, M.R. et al. (2005). *Options Méditerranéennes*.
- [5] Nudda, A. et al. (2019). *Small Rumin. Res.*, 106015.
- [6] Nudda, A. et al. (2020). *Animals*, **10**:1290.
- [7] Pazzola, M. (2019). *Anim. Open Access J. MDPI*, **9**.
- [8] Hinrichs, J. (2004). *Eur. J. Nutr.*, **43**:1.
- [9] Park, Y.W. (2007). *Small Rumin. Res.*, **68**:73–87.
- [10] Barillet, F. et al. (2005). *Genet. Sel. Evol.*, **37**:S109.
- [11] Noce, A. et al. (2016). *Anim. Genet.*, **47**:717–726.
- [12] Ramos, A.M. et al. (2009). *Small Rumin. Res.*, **82**:117–121.
- [13] Corral, J.M. et al. (2010). *Livest. Sci.*, **129**.
- [14] Giambra, I.J. et al. (2014). *Small Rumin. Res.*, **121**:382–394.
- [15] Ofir, R. & Gootwine, E. (1997). *Mamm. Genome*, **8**:770–772.
- [16] Marques, M.R. et al. (2006). *J. Dairy Res.*, **73**:394–405.
- [17] Marques, M.R. et al. (2018). *Rev. Port. Zootec.*, **III**:139–146.
- [18] Marques, M.R. et al. (2014). *Options Méditerranéennes*, 345–348.
- [19] Vacca, G.M. et al. (2013). *Mol. Biol. Rep.*, **40**:5285–5294.
- [20] Dettori, M.L. et al. (2015). *J. Dairy Res.*, **82**:169–176.
- [21] Gutiérrez-Gil, B. et al. (2014). *PloS One*, **9**:e94623–e94623.
- [22] García-Fernández, M. et al. (2010). *Small Rumin. Res.*, **90**:34–40.
- [23] García-Gámez, E. et al. (2012). *PLoS ONE*, **7**:e47782.
- [24] Dettori, M.L. et al. (2018). *J. Dairy Sci.*, **101**:9978–9986.
- [25] Gutiérrez-Gil, B. et al. (2009). *Anim. Genet.*, **40**:423–434.
- [26] Staiger, E.A. et al. (2010). *J. Dairy Sci.*, **93**:1736–1742.
- [27] Dettori, M.L. et al. (2020). *Anim. Open Access J. MDPI*, **10**:1216.
- [28] Szczesna, M. et al. (2020). *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.*, **55**:21–28.
- [29] Bole-Feysot, C. et al. (1998). *Endocr. Rev.*, **19**:225–268.
- [30] Bauman, D.E. (1999). *Domest. Anim. Endocrinol.*, **17**:101–116.
- [31] Scatà, M.C. et al. (2010). *Small Rumin. Res.*, **89**:7–11.
- [32] Beever, J.E. et al. (2006). *Anim. Genet.*, **37**:66–71.