

Carla Sofia Rodrigues Leal

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RAÇA
BOVINA BARROSÃ**

Estudos de genética bioquímica, familiar e populacional

Dissertação de Mestrado em Ecologia
Aplicada apresentada à Faculdade de Ciências
da Universidade do Porto.

Porto

1998



Agostino
Autuoni © 97

Agradecimentos

Quero aqui apresentar o meu agradecimento à ajuda prestada por certas pessoas, sem a qual não era possível a realização do presente trabalho.

Ao Prof. Doutor Nuno Ferrand de Almeida, agradeço a oportunidade e o apoio constante que demonstrou durante a realização deste trabalho, as indicações que forneceu na estruturação e elaboração do mesmo, pela cedência de bibliografia, bem como as críticas e sucessivas revisões do manuscrito.

Ao Prof. Doutor Paulo Alexandrino quero agradecer o apoio na realização deste mesmo trabalho, assim como todas as indicações que forneceu para a sua realização prática.

Ao Prof. Doutor Jorge Eiras, pelas facilidades concedidas na utilização do laboratório de Bioquímica do Departamento de Zoologia e Antropologia, e ao ICETA pelas facilidades concedidas na utilização dos laboratórios de Genética Animal.

À comissão do Mestrado, na figura da Prof. Dra. Leonor Fidalgo e ao respectivo corpo docente, os importantes conhecimentos transmitidos durante o ano curricular deste mestrado.

À AMIBA (Associação do Minho dos Criadores de Bovinos de Raça Barrosã), principalmente ao Sr. Miguel Machado e Dr. José Leite, pelo apoio dado, pela ajuda na recolha de amostras de sangue e pelo simpático acolhimento que demonstraram na sua associação, estando sempre prontos a dispensar os seus serviços.

À D.R.A.E.D.M. (Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho), em especial ao Sr. Eng.º Corte Real Santos (Estação de Produção Animal da Zona Agrária do Vale do Ave), agradeço todo o apoio e encorajamento que demonstrou.

Quero também agradecer a colaboração e o tempo despendido nas várias saídas de campo, aos funcionários do Livro Genealógico (ao Sr. Guilherme em especial) e aos funcionários das brigadas de Sanidade Animal de Vieira do Minho e Póvoa de Lanhoso.

A todos os colegas de mestrado e de laboratório, pela amizade, pelo apoio e pelo ambiente de camaradagem existente entre todos, em especial à Madalena Branco, ao João Alexandrino, ao Agostinho Antunes, à Graça Lopes, ao Filipe Castro e à Rita Campos.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT) agradeço a Bolsa de Mestrado (PRAXIS XXI/BM/8799/96) que me foi concedida, o que possibilitou a minha disponibilidade para a realização da parte prática de investigação deste trabalho.

Aos meus amigos, em especial à Dra. Graça Loureiro, ao Dr. Armando Loureiro e à Dra. Filipa Carvalho pela paciência, pelo apoio constante que revelaram ao longo deste trabalho e pelas suas críticas ao manuscrito.

À minha mãe e ao meu marido, que tornaram possível este percurso que me conduziu até aqui. A eles, dedico todo este trabalho.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - A DOMESTICAÇÃO	3
1.1.1 - Evidência histórica da domesticação do gado bovino	3
1.1.2 - Paleontologia / arqueozoologia	4
1.1.3 - Análise genética	7
1.2 - A DIVERSIDADE DAS RAÇAS BOVINAS	10
1.2.1 - As raças ibéricas	10
1.2.2 - A raça Barrosã	11
Aspectos históricos da dispersão e evolução do efectivo populacional	11
Aspectos morfológicos	15
Origem	15
2 - MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 - AMOSTRAGEM E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS	17
2.1.1 - Amostragem	17
2.1.2 - Obtenção e conservação das amostras de sangue	17
2.2 - BATERIA DE MARCADORES GENÉTICOS SELECIONADOS	18
2.3 - TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	24
2.4 - MÉTODOS DE SEPARAÇÃO	26
2.5 - MÉTODOS DE DETECÇÃO	34
2.6 - MÉTODOS DE CÁLCULO	38
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1 - ANÁLISE DOS MÉTODOS DE SEPARAÇÃO	39
3.2 - ANÁLISE FAMILIAR	51
3.3 - ANÁLISE POPULACIONAL <i>LOCUS A LOCUS</i>	54
3.4 - ANÁLISE POPULACIONAL CONJUNTA	72
3.4.1 - Diversidade genética na raça Barrosã	72
3.4.2 - Comparação com outras raças Ibéricas	74
3.4.3 - Diferenciação genética	77
4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
5 - CONCLUSÕES	88
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

ANEXO

1 - INTRODUÇÃO

O crescente interesse demonstrado pelas raças bovinas autóctones permitiu o aparecimento, nos últimos anos, de uma conjuntura política e económica claramente favorável à sua conservação. Este interesse reflecte-se, por exemplo, na criação de incentivos à produção (ajudas comunitárias e medidas agroambientais) ou no apelo ao consumo de produtos de qualidade certificada. Estas circunstâncias implicam, contudo, a necessidade de uma maior capacidade de produção que, em sistemas agrícolas tecnicamente pouco desenvolvidos, poderá estar associada a programas de melhoramento genético e, conseqüentemente, a eventuais perdas de diversidade genética (FAO, 1994; LOFTUS *et al.*, 1994; FERNANDES, 1996).

Em Portugal existe um número considerável de raças bovinas autóctones que se encontram, ainda, pouco estudadas. Na verdade, a maior parte dos trabalhos sobre elas realizados envolve análises fenotípicas, estando ainda por investigar a estrutura genética das suas populações, o seu grau de proximidade, a sua origem e evolução recente.

No seio das raças nacionais, a raça Barrosã apresenta um conjunto de características morfológicas muito peculiares, que incluem um perfil côncavo da cabeça, uma saliência das arcadas orbitárias e cornos em forma de lira alta. Este conjunto de particularidades tem suscitado opiniões controversas sobre a sua origem (GONÇALVES GARCIA, 1964; GARCIA *et al.*, 1981; LEAL, 1995). Por outro lado, é claramente uma raça emblemática da região noroeste de Portugal, associada a uma agricultura de subsistência e a um património cultural que se torna necessário conservar (GONÇALVES GARCIA, 1964; GARCIA *et al.*, 1981; LEAL, 1995).

A sua área de distribuição abrange apenas 17 concelhos pertencentes a 4 distritos: Vila Real, Viana do Castelo, Braga e Porto. Actualmente, a existência de problemas de produção é responsável pela progressiva diminuição de alguns núcleos populacionais, apesar dos esforços de certas entidades para o evitar (MARTINS, 1982; LEAL, 1995).

Em face do exposto, torna-se necessário alargar a investigação sobre esta raça bovina, nomeadamente através da sua caracterização genética. Espera-se, assim, poder contribuir para o estabelecimento de um plano de conservação da Barrosã e, simultaneamente, aprofundar o estado actual do conhecimento sobre a genética das suas populações.

1.1. - A DOMESTICAÇÃO

1.1.1. - Evidência histórica da domesticação do gado bovino

Há cerca de 15.000 anos, verificavam-se profundas mudanças climáticas na Terra. Os glaciares recuaram para Norte, a temperatura tornou-se mais amena, uma maior área geográfica tornou-se habitável. O Homem teve então de vencer dificuldades impostas pela Natureza, inventando a agricultura e a criação de gado, passando de caçador nómada a agricultor e a pastor (SARAIVA, 1993).

O início da agricultura e a primeira domesticação de animais por parte do Homem está datada de 10.000 anos a.C. (final do Paleolítico), numa região conhecida por Crescente Fértil, no Próximo Oriente. O primeiro animal domesticado terá sido o cão, seguindo-se a ovelha, a cabra e o gado bovino já no Neolítico (8.000 anos a.C.) (HEMMER, 1990; CLUTTON-BROCK, 1992).

A domesticação do gado bovino foi, provavelmente, um processo gradual. É natural que, no princípio, apenas alguns animais (essencialmente fêmeas) fossem retirados das manadas de auroques selvagens e criados isoladamente, não levando de imediato ao aparecimento de diferenças morfológicas claras. Esta hipótese é apoiada por registos arqueozoológicos, onde a forma “proto-domesticada” não se distingue da forma selvagem (LOFTUS *et al.*, 1994).

A expansão neolítica em direcção à Europa terá levado milhares de anos, seguindo uma via marítima (mar Mediterrâneo) e uma via continental (através dos Balcãs e pelo curso do Danúbio). Da Sicília, a revolução neolítica espalhou-se por toda a bacia mediterrânea ocidental, atingindo a Península Ibérica e a costa atlântica e trazendo consigo a arte, a agricultura e a criação de gado. Desta forma, só no 5.º milénio a.C., chegaram à Península Ibérica as práticas agrícolas e a pastorícia (SARAIVA, 1993).

Desde o Neolítico que o gado bovino domesticado (*Bos taurus*) tem um papel muito importante para o Homem. As grandes civilizações da Antiguidade dão-nos testemunhos escritos e trabalhos artísticos indicando a sua importância na alimentação (carne, leite), nos trabalhos agrícolas, na guerra, na arquitectura e mesmo na religião.

Durante o período compreendido entre o início do Neolítico até às idades do Cobre e do Bronze, a domesticação dos bovinos levou a uma contínua diminuição do tamanho corporal dos animais na Europa. Posteriormente, este processo terá sido interrompido com a introdução de gado bovino trazido de Roma, e muitas raças extinguíram-se após a queda do Império Romano (EPSTEIN & MASON, 1984).

Esta tendência continuou a observar-se durante a Idade Média e só com a Revolução Industrial e a necessidade de abastecer as grandes cidades se produziu um incremento na criação de gado (EPSTEIN & MASON, 1984).

Neste domínio, a modernização da agricultura e a produção intensiva de alimentos terá originado uma contínua diminuição dos efectivos populacionais de muitas raças autóctones, evidente sobretudo durante a última metade deste século. Estas circunstâncias determinaram, assim, a sensibilização da sociedade para as consequências do empobrecimento de diversidade genética do gado bovino, permitindo o estabelecimento de linhas de investigação destinadas à sua gestão e conservação (BROWN *et al.*, 1993; FAO, 1996).

1.1.2. – Paleontologia / arqueozoologia

De acordo com os actuais dados paleontológicos, o mais antigo ruminante do “Velho Mundo” terá aparecido no Mioceno (*Gelocus*), caracterizando-se pela ausência de incisivos na mandíbula superior e possuindo já uma conformação do esqueleto idêntica à dos bovinos actuais (IGLESIAS, 1989 e GARCIA *et al.*, 1992). Esta forma viria a originar, posteriormente, os quatro géneros actuais de ruminantes: *Ovis*, *Capra*, *Antilope* e *Bos* (IGLESIAS, 1989).

A evidência paleontológica indica, também, que terão existido na Europa diferentes espécies de bovídeos, actualmente extintas. Destas, apenas o auroque sobreviveu até à Idade Média, havendo documentos escritos que se referem ao local e data da morte do último exemplar (Polónia, 1627) (LOFTUS *et al.*, 1994).

As primeiras representações de bovinos feitas pelo Homem devem, precisamente, referir-se a auroques, sendo um dos exemplos mais conhecidos constituído pelas pinturas rupestres das grutas de Lascaux (França) (figura 1.1.1).



Figura 1.1.1: Pintura rupestre nas paredes de grutas em Lascaux, França. Datando de há cerca de 15.000 anos. Reproduzido de FORBES (1986).

Só mais tarde surge a evidência de que o processo de domesticação se poderá ter iniciado. De facto, alguns achados neolíticos (8.000 a 5.500 anos a.C.) provenientes da Anatólia, parecem indicar a presença de animais já domesticados. Esta região do Sudoeste Asiático poderá, assim, constituir o centro de domesticação do gado bovino a partir de populações selvagens da subespécie asiática do auroque (*Bos primigenius namadicus*) (EPSTEIN & MASON, 1984).

Outra evidência adicional é fornecida pela descoberta de ossos e dentes de um animal sensivelmente mais pequeno do que o auroque (Irão, 5.000 anos a.C.), bem como por um primeiro testemunho escrito onde se descreve, em placas de argila, uma cabeça de vaca (Mesopotâmia, 5.000 anos a.C.) (ROGERSON, 1991).

Muitos outros achados arqueológicos e paleontológicos foram encontrados na Mesopotâmia (4.000 anos a.C.) e no vale do rio Nilo (4.000 anos a.C.), mostrando um bovino totalmente domesticado e de longos cornos (EPSTEIN & MASON, 1984).

A consolidação do processo de domesticação é, a partir desta altura, inquestionável, tornando-se abundantes os registos de bovinos domesticados na Mesopotâmia e vale do Nilo. A este respeito, devem referir-se especialmente as numerosas esculturas, relevos, pinturas e textos em papiro que relatam pormenores da vida quotidiana do povo egípcio e onde aparecem diversas cenas que mostram a importância do gado bovino na agricultura e na alimentação (figura 1.1.2).

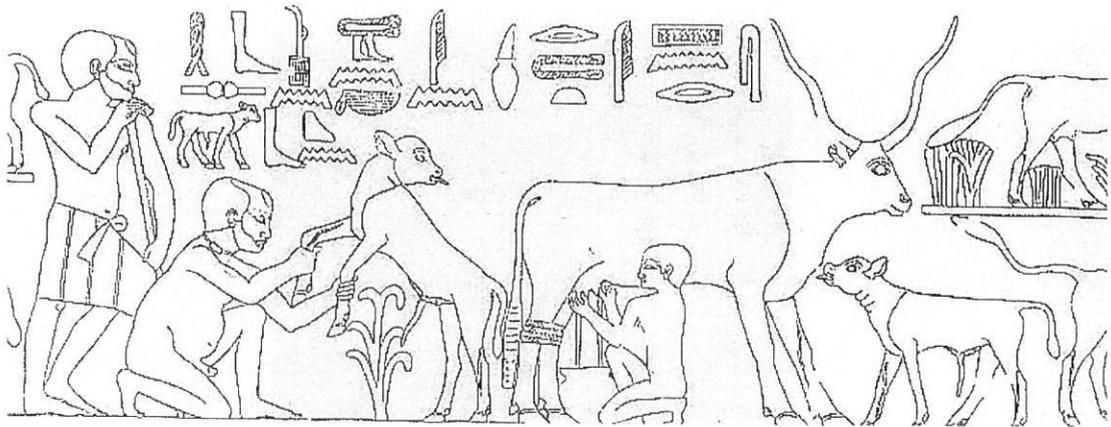


Figura 1.1.2: Desenho ilustrativo de uma ordenha, 5ª dinastia. Reproduzido de BAINES & MÉLEK (1980).

A partir desta altura, as descobertas arqueozoológicas são testemunho de uma expansão do gado bovino. Assim, existem registos datados de há cerca de 2.000 e 3.000 anos a.C. que sugerem a ocorrência, no Norte de África, de animais de enormes cornos em forma de lira (EPSTEIN & MASON, 1984).

Tal expansão dá-se, também, pela Turquia, indo até ao Cáucaso e à Rússia, e chega também à Europa, onde nas regiões do Norte foram encontrados objectos de arte da idade do Cobre e do Bronze que representam bovinos e datam do início do Cristianismo (EPSTEIN & MASON, 1984).

A migração para oriente está, também, bem documentada através de numerosos restos arqueozoológicos descobertos em toda a Ásia. É, contudo, nesta região geográfica que se pode observar a transição de gado bovino sem bossa (*Bos taurus*) para outro com bossa (*Bos indicus*). Segundo alguns autores, as raças de *Bos indicus*, ou gado zebu, derivariam das raças de *Bos taurus*, ou gado taurino, através de um processo de selecção (EPSTEIN & MASON, 1984). Alternativamente, estes dados podem também ser interpretados como a ocorrência de dois processos de domesticação independentes, seguidos do contacto entre as duas populações domésticas de gado bovino.

Adicionalmente, deve salientar-se que a evidência descrita é ainda muito incompleta, pelo que a interpretação dos dados deve ser feita com bastante precaução. A título de exemplo, refiram-se os achados arqueozoológicos efectuados na Península dos Balcãs e na

Macedónia Grega (6.200 anos a.C.). Segundo EPSTEIN & MASON (1984) estes achados sugerem que o Sul da Europa poderia constituir o primeiro centro de domesticação do gado bovino, a partir de onde se teria iniciado a sua expansão em direcção ao resto do continente europeu, Rússia e Sudoeste Asiático.

1.1.3. - Análise genética

A investigação sobre a genética das diferentes raças de gado bovino tem contribuído de forma muito significativa para a compreensão da sua história, dos padrões de diversidade que actualmente as caracterizam, e do seu grau de parentesco. Os resultados actualmente disponíveis reportam-se a três domínios principais: grupos sanguíneos, variação genética de proteínas e polimorfismos do DNA (DNA mitocondrial e microsatélites).

Grupos sanguíneos

A primeira tentativa para avaliar o grau de diferenciação genética entre raças bovinas e caracterizar a sua diversidade data do início de década de 70, e envolveu precisamente o estudo dos diferentes grupos sanguíneos que iam sendo descritos (RUSSELL, 1996; USHA, 1996). Contudo, a maior parte dos resultados não permitiu a obtenção de conclusões definitivas pelo facto de se trabalhar com um número relativamente reduzido de *loci* que, adicionalmente, era pouco polimórfico. Deve, porém, referir-se que se dispõe actualmente de uma considerável quantidade de informação no que se refere à distribuição da variabilidade dos grupos sanguíneos nas diferentes raças bovinas, conferindo a este conjunto de dados uma importância não desprezível no estudo de eventuais alterações da estrutura genética de populações de gado bovino nos últimos vinte anos (RUSSELL, 1996; USHA, 1996).

Proteínas

A introdução de técnicas electroforéticas de separação de proteínas permitiu aumentar de forma muito considerável o número de sistemas genéticos polimórficos conhecidos nas raças bovinas, em especial no que se refere a proteínas do sangue e do leite (USHA, 1996).

A análise da sua distribuição populacional veio demonstrar a ocorrência de dois grupos principais de bovinos, ou duas subespécies (*Bos primigenius taurus* e *Bos primigenius*

indicus), cada um deles caracterizado pela presença de diversos alelos privativos em vários *loci* (BRAEND, 1971).

Estes resultados estão, de uma maneira geral, de acordo com dados morfológicos, históricos e ainda com a distribuição geográfica conhecida dos principais grupos (EPSTEIN & MASON, 1984). No entanto, o acréscimo de informação fornecido por este tipo de marcadores foi, ainda, insuficiente para resolver muitas das interpretações contraditórias publicadas sobre o tema.

Polimorfismo do DNA

A introdução das técnicas de análise genómica directa e, em especial, a descoberta do polimorfismo do DNA-mitocondrial (mtDNA) e dos microssatélites, forneceram os instrumentos necessários a uma detalhada caracterização genética das raças bovinas.

A análise da variação da molécula de mtDNA permitiu verificar que *Bos primigenius taurus* e *Bos primigenius indicus* terão divergido há cerca de 210.000 anos, uma data muito anterior à indicada pelos dados arqueológicos para o início do processo de domesticação. É, assim, muito provável que tenham ocorrido duas domesticações independentes a partir de duas subespécies diferentes do auroque: *Bos primigenius namadicus* terá dado origem ao gado zebu, na Ásia (Vale do Indu), e *Bos primigenius primigenius* ao gado europeu, vindo do Próximo Oriente (LOFTUS *et al.*, 1994a, 1994b).

Muito recentemente, BRADLEY *et al.* (1996) e MACHUGH *et al.* (1997) sugerem, ainda, uma terceira domesticação independente, ocorrida em África. Esta evidência resulta, também, de análise do polimorfismo do mtDNA, indicando uma separação entre os ancestrais do gado europeu e africano anterior à domesticação (22.000 - 26.000 anos). Este terceiro processo de domesticação ter-se-ia, assim, efectuado a partir da subespécie africana do auroque (*Bos primigenius opisthonomus*).

A descoberta dos microssatélites e do seu elevado grau de polimorfismo data do fim da década de 80 (LITT & LUTY, 1989; WEBER & MAY, 1989) e constitui, provavelmente, a metodologia mais adequada para estudar a história recente da diversificação das raças bovinas (MACHUGH *et al.*, 1994; ARRANZ *et al.*, 1996). Os primeiros resultados que envolvem uma caracterização em larga escala de diferentes populações permitiram distinguir mais claramente a estrutura genética dos dois grandes grupos de gado bovino (*Bos taurus* e *Bos indicus*), e constituem a base para futuros estudos mais específicos.

Por outro lado, os microssatélites permitiram, também, o início do projecto de cartografia do genoma bovino que, no fim de 1994, contabilizava 202 marcadores genéticos (dos quais 144 eram microssatélites) regularmente espaçados em 90% do seu comprimento. Cerca de um ano depois existiam, já, mais de 400 microssatélites (USHA *et al.*, 1995), levando EGGEN *et al.* (1995) a apresentar um trabalho de revisão e consolidação de informação já existente para evitar a ocorrência de possíveis redundâncias.

A aplicação deste tipo de marcadores não se restringe apenas à análise da diversidade genética populacional e à construção de mapas genéticos. De facto, são actualmente escolhidos para a realização de testes de paternidade (GLOWATZKI-MULLIS *et al.*, 1995; USHA *et al.* 1995; ARRANZ *et al.*, 1996), detecção de *loci* que determinam a expressão de características quantitativas (QTL) (RON *et al.*, 1994), determinação do sexo em embriões, selecção animal assistida, entre outros.

No seu conjunto, estes resultados têm permitido um avanço notável na compreensão da evolução das actuais raças bovinas. A prossecução desta via de investigação poderá levar ao esclarecimento definitivo do número de domesticações independentes que terá ocorrido (EPSTEIN & MASON, 1984; LOFTUS *et al.*, 1994a, 1994b; BRADLEY *et al.*, 1996; MACHUGH *et al.*, 1997) a partir das populações selvagens de auroque. Seguidamente, é legítimo esperar que venha a ser possível analisar a uma escala mais fina o grau de parentesco genético entre raças que ocupem áreas geográficas mais reduzidas. Neste particular, será extremamente interessante incluir as populações ibéricas e, em especial, a raça Barrosã.

1.2. - A DIVERSIDADE DAS RAÇAS BOVINAS

A domesticação resultou na criação de milhares de raças de animais domésticos, geneticamente diferentes e adaptadas às necessidades humanas e a uma grande variedade de condições ambientais (FAO, 1993).

1.2.1. - As raças ibéricas

A grande diversidade de raças bovinas da Península Ibérica poderá dever-se, em parte, à introdução de outras raças domésticas, que se cruzaram entre si e com bovinos já existentes na Península. A introdução de outras raças terá sido feita de duas formas distintas:

1 - através dos movimentos migratórios, acompanhando as várias invasões de povos vindos do oriente, como é o caso dos Fenícios (séc. X a.C.), Gregos (séc. VII a.C.), e Romanos (séc. III a.C.). Estes últimos dominaram completamente a Península durante 7 séculos e terão contribuído para a diversificação do gado bovino pelo facto de introduzirem animais de características diferentes. Supõe-se que do seu cruzamento com os bovinos ibéricos se terão originado os troncos aquitânico e ibérico (MIRANDA do VALE, 1949);

2 - através da introdução de animais do Norte de África na sequência da invasão de povos como os Cartagineses (séc. V a.C.) e, já na era cristã, os Mouros (711 d.C.). Estes terão introduzido descendentes de *Bos primigenius opisthonomus*, que poderá ter influenciado a formação de várias raças ibéricas, nomeadamente as raças Barrosã e Cachena (APARICIO, 1960, *in* IGLESIAS, 1989, EPSTEIN & MASON, 1984). Estas poderão, assim, constituir uma linha que descende do tronco mauritânico (MIRANDA do VALE, 1949).

Adicionalmente, é provável que povos oriundos do Norte da Europa, nomeadamente os Visigodos, possam ter introduzido gado bovino dessa região. Contudo, a sua eventual contribuição para a diversidade de raças bovinas da Península Ibérica está por esclarecer.

1.2.2. - A raça Barrosã

Aspectos históricos da dispersão e evolução do efectivo populacional

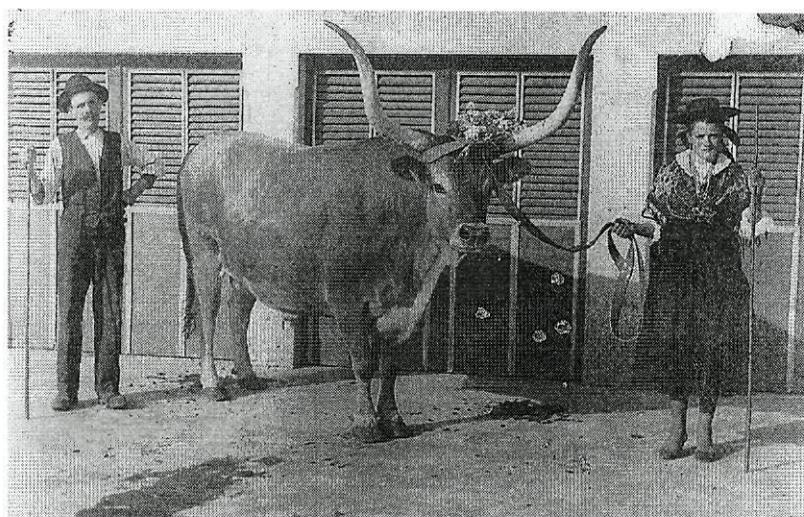
O centro de criação da raça Barrosã situa-se actualmente na zona do planalto da Serra do Barroso, abrangendo os actuais concelhos de Montalegre, Boticas, Vieira do Minho (freguesias de Campos e Ruivães) e Cabeceiras de Basto (freguesia de Gondiaães). Esta região não possui condições agro-climáticas que permitam grandes explorações agrícolas, pelo que uma parte importante da população se dedica à criação de gado (GARCIA *et al.*, 1981; FERNANDES, 1996).

Vivendo sobretudo em zonas montanhosas, a Barrosã é utilizada, essencialmente, como força de trabalho e na produção de carne de excelente qualidade, motivo pelo qual a União Europeia a reconhece com denominação de Origem Protegida (FERNANDES, 1996).

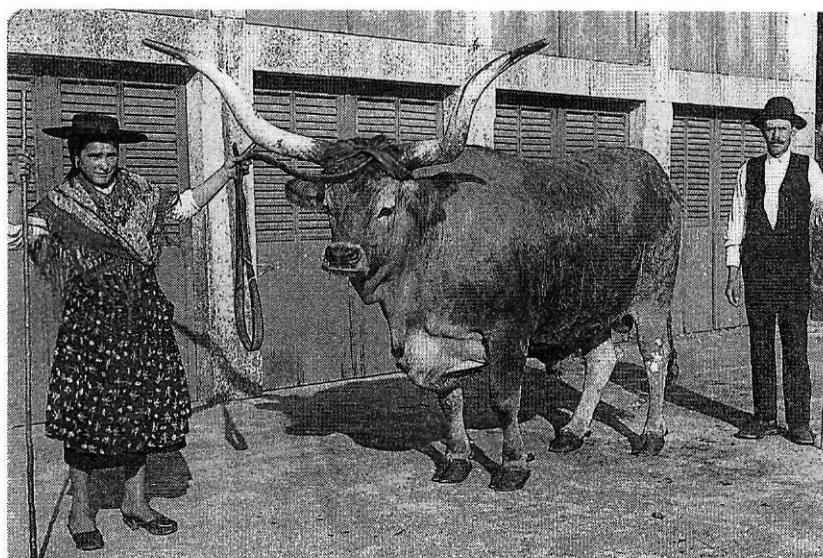
No século passado e início do século XX existia um grande incentivo para a criação desta raça devido à procura da sua carne, muito apreciada em Inglaterra. Este incentivo contribuiu, indirectamente, para que a estatura dos animais se elevasse (GARCIA *et al.*, 1981), e para que a zona de criação se dispersasse pelas áreas submontanhosas e pelas planícies do Entre Douro e Minho até à orla marítima, chegando mesmo ao concelho de Vila Nova de Gaia (figura 1.2.1). Nestas zonas fazia-se a criação de novilhos para exploração como bois de trabalho e para produção de carne. Tal exploração está bem patente nos painéis de azulejos da estação de caminhos de ferro de S. Bento, no Porto, e mesmo nos desenhos das calçadas nas principais avenidas desta cidade.



A



B



C

Figura 1.2.1: A) Junta de bois de trabalho de raça Barrosã, B) Fêmea adulta Barrosã, C) Macho adulto Barrosã. Fotografias datadas de 1949, gentilmente cedidas pela Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho - Centro de Produção Animal (D.R.A.E.D.M.).

Porém, a necessidade de maiores produções de carne foi conduzindo, durante a segunda metade deste século, a um progressivo declínio no efectivo populacional da raça Barrosã, tornando-se mesmo raro poder observar uma junta de bois. Recentemente, as alterações verificadas na política agrária e ambiental da União Europeia terão permitido alguma recuperação. Nesse contexto, a criação, em 1981, do Livro Genealógico da raça Barrosã constitui um passo importante para a certificação dos animais e o aumento do seu valor. Actualmente, o seu efectivo populacional tem crescido continuamente, e essa tendência parece estável.

Segundo dados fornecidos pelo Registo Zootécnico e pela Associação do Minho dos Criadores de Bovinos de Raça Barrosã (AMIBA), existiam, em 1996, 38.002 fêmeas reprodutoras inscritas e 375 touros de cobrição (tabela 1.2.2.1), distribuídos por vários concelhos dos distritos de Viana do Castelo, Braga, Vila Real e Porto (figura 1.2.2).

Tabela 1.2.2.1: Movimento do Registo Zootécnico relativo à raça Barrosã.

Anos	Vacas Inscritas			Postos de Cobrição			Vitelos Inscritos
	Abatidas	Registadas	Inscritas	Encerrados	Recenseados	Existências	
1981	0	4884	4882	1	25	24	0
1982	19	6169	11032	6	42	60	532
1983	31	4436	15437	14	35	81	1593
1984	72	866	16231	13	14	82	2151
1985	47	604	16788	15	15	82	1767
1986	106	1027	17709	18	13	77	2414
1987	72	1186	18823	2	14	89	2632
1988	122	1192	19877	5	7	91	2574
1989	138	718	20506	14	26	103	2532
1990	89	1017	21440	8	7	102	2404
1991	159	1309	22590	14	26	114	2531
1992	52	1902	24440	6	17	125	3203
1993	0	4205	28645	37	87	175	4077
1994	0	6248	34893	58	111	228	4679
1995	340	2447	37000	0	112	340	5759
1996	120	1122	38002	26	61	375	5901

Fonte: Registo Zootécnico (cedido pela AMIBA).

Apesar desta situação favorável, não se pode considerar que a raça Barrosã não corra, ainda, perigo de extinção. Na verdade, são vários os factores que têm contribuído para a diminuição da sua área de criação, ou mesmo para a alteração das características destes animais. De entre esses factores deve salientar-se *i*) a substituição de Barrosã por outras raças, autóctones (Minhota, Mirandesa, Maronesa) ou importadas (Frísia, Gelbvieh e Parda Suíça),

que fornecem ao agricultor um rendimento superior, *ii*) a progressiva mecanização da agricultura e a diminuição das áreas de pastagem, *iii*) o pequeno número de machos reprodutores associado a um efectivo idoso, *iv*) uma baixa fertilidade média, grandes intervalos entre partos e elevado número de abortos, e *v*) desmotivação dos produtores mesmo em face das actuais condições de comercialização.

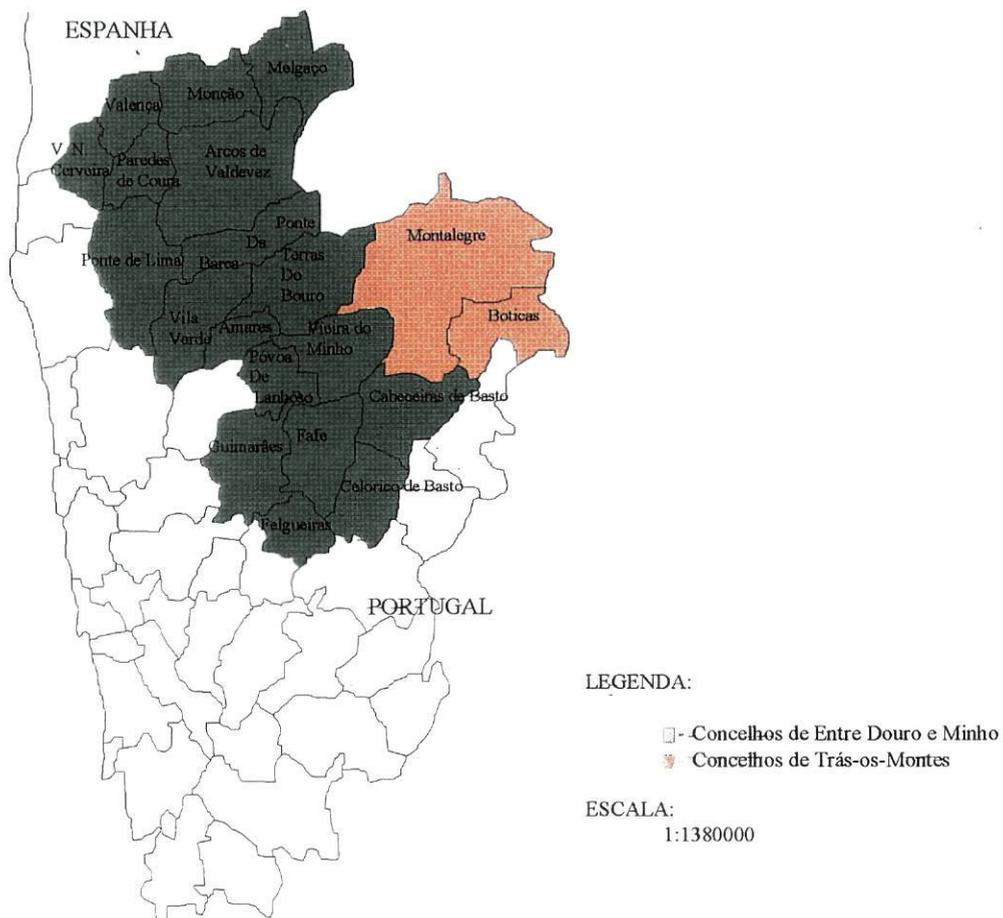


Figura 1.2.2: Mapa de distribuição do actual efectivo Barrosã.

Aspectos morfológicos

O bovino Barrosã apresenta uma estatura mediana, com 121-130 cm de altura à cernelha e pelagem de cor castanha (variando entre a cor de palha até a cor acerejada) (LEAL, 1995). A cabeça é curta e larga, encimada por uma cornamenta em forma de lira alta; os cornos são muito compridos e espessos, de cor branca suja, com pontas escuras; o conjunto ocular é saliente, dando-lhe o aspecto de olhos de sapo; as orelhas são de tamanho médio; os membros são curtos e pouco ossudos e o pescoço é curto, bem ligado à cabeça e com garrote largo (MARTINS, 1982).

É uma raça com caracteres sexuais secundários bem diferenciados. Os touros são normalmente mais escuros, particularmente no terço anterior, com maior corpulência do que as fêmeas, mais robustos, com barbela mais desenvolvida, cabeça mais curta e mais larga, cornos mais grossos e ligeiramente mais curtos (GARCIA *et al.*, 1981; MARTINS, 1982).

Esta raça apresenta duas particularidades morfológicas que a distinguem de todas as outras raças: grande desenvolvimento córneo e perfil côncavo da cabeça com acentuado prognatismo mandibular. O elevado crescimento córneo poderá estar relacionado com a selecção dos animais. De facto, nas populares chegas de touros, o animal que sai vencedor será o touro cobridor das vacas da aldeia. Este processo terá permitido a primazia de touros de maior ossatura capital, mais potente musculatura céfalo-cervical, maior força no ângulo társico e, conseqüentemente, grande desenvolvimento dos cornos (MIRANDA do VALE, *in* GONÇALVES GARCIA, 1964; ARAÚJO, 1986). No que se refere ao acentuado prognatismo mandibular, é possível que, em parte, esteja relacionado com o grande desenvolvimento córneo. Este terá exigido um desenvolvimento correlativo de certos ossos cranianos e o atrofiamento dos ossos da face (GONÇALVES GARCIA, 1964).

Origem

A origem da raça Barrosã e o seu enquadramento com as outras raças da Península Ibérica está ainda por explicar, constatando-se uma grande heterogeneidade na opinião de diversos autores a este respeito (MARTINS, 1982).

Alguns autores referem a existência, no Norte de África (vale do Nilo), de um gado com características morfológicas semelhantes à actual raça Barrosã, em especial no que se refere à forma, tamanho e espessura dos cornos. Este gado é normalmente associado à

designação subespecífica *Bos primigenius opisthonomus* (embora também se refira como *Bos primigenius mauritanicus* e como *Bos taurus desertorum*), e terá chegado à Península Ibérica através de várias rotas migratórias dos povos norte-africanos. A raça Barrosã poderia, assim, ser incluída no tronco mauritânico, tendo como ancestral *Bos primigenius mauritanicus* (GARCIA *et al.*, 1981).

Neste contexto, poderá admitir-se que o gado que corresponde a este grupo se tenha instalado na Península Ibérica, provavelmente durante a longa ocupação Moura (GONÇALVES GARCIA, 1964). Posteriormente, a raça Barrosã terá sido desalojada pelos troncos ibérico e aquitânico, restando apenas um núcleo populacional confinado às zonas planálticas do Barroso, onde permaneceu até hoje (GONÇALVES GARCIA, 1964).

Esta hipótese não é, contudo, partilhada por outros autores, que lhe criticam a escassa evidência (forma e tamanho dos cornos) e, portanto, uma clara ausência de base científica (IGLESIAS, 1989).

Perante o exposto, pode verificar-se que a raça Barrosã apresenta aspectos morfológicos e histórico-evolutivos muito peculiares, sendo ainda hoje difícil proceder ao seu enquadramento no seio das restantes raças bovinas ibéricas. O aprofundamento da investigação sobre a estrutura genética das suas populações poderá ser, assim, uma via para o esclarecimento das muitas questões que permanecem por responder. Nestas condições, este trabalho pretende ser uma contribuição para o conhecimento da genética das populações da raça bovina Barrosã através da consecução dos seguintes objectivos:

1. estudo da variabilidade genética da raça Barrosã ao nível das proteínas eritrocitárias e plasmáticas;
2. desenvolvimento e afinação de técnicas de separação de proteínas por electroforese e focagem isoelectrica e sua detecção específica (histoquímica e imunológica);
3. análise familiar dos polimorfismos encontrados;
4. avaliação do grau de diferenciação genética existente entre a raça Barrosã e outras raças bovinas.

2. - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. - AMOSTRAGEM E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

2.1.1. - Amostragem

Foram recolhidas 356 amostras de sangue correspondente a 294 indivíduos de raça Barrosã (dos quais 141 estavam inscritos no Livro Genealógico), e 62 indivíduos de raça Minhota. As colheitas efectuaram-se em zonas de intensa criação da Barrosã, designadamente nos concelhos de Arcos de Valdevez, Cabeceiras de Basto, Fafe, Póvoa de Lanhoso e Monção, em finais de 1993, durante o ano de 1994 e ainda no período de 1996/ 1997, em Vieira do Minho.

A recolha de sangue em indivíduos de raça Minhota foi efectuada com a finalidade de servir como termo de comparação genética, uma vez que se realizam cruzamentos entre esta raça e a Barrosã.

2.1.2. - Obtenção e conservação das amostras de sangue

O sangue foi colhido da veia jugular, em tubos contendo 0,1 ml de EDTA (ácido etilnodiaminotetracético) dissódico a 10% ou em tubos heparinados.

As amostras de sangue foram centrifugadas (10 minutos a 13000 rpm), separando-se em seguida o plasma dos eritrócitos. Aos eritrócitos foi adicionado meio de glicerol (seis partes de uma solução 5% de citrato trissódico 2H₂O adicionados a quatro partes de glicerol) numa proporção aproximada de 2:1; as amostras foram conservadas a -20°C.

2.2. - BATERIA DE MARCADORES GENÉTICOS SELECIONADOS

No presente trabalho foi escolhida uma bateria de 12 marcadores genéticos, dispersos no genoma do bovino (figura 5): HB (Hemoglobina), CAII (Anidrase carbónica), PEPB (Peptidase B), DIA (Diaforase), NP (Fosforilase nucleosídica), MDH (Desidrogenase do malato), PGD (Desidrogenase do ácido fosfogluconico), GPI (Isomerase da fosfoglucose), MPI (Isomerase da manose-6-fosfato), ALB (Albumina), TF (Transferrina) e GC (Componente específico de grupo).

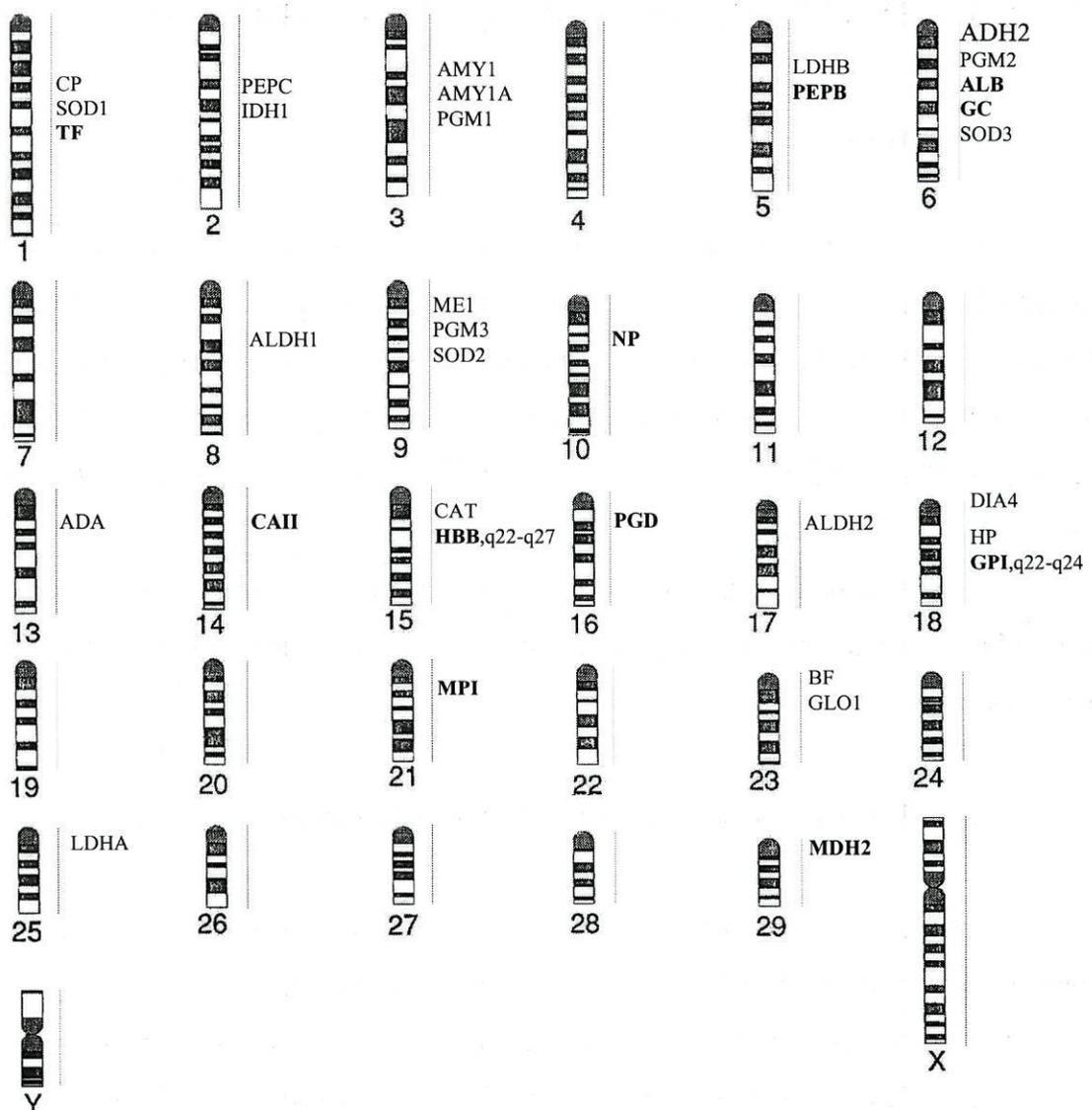


Figura 2.2.1: Localização de vários loci proteicos no genoma de *Bos taurus*. Com um tom mais carregado, indicam-se os marcadores estudados neste trabalho. Adaptado de FRIES *et al.* (1993).

- HB

A hemoglobina é responsável pelo transporte do oxigénio dos pulmões para os tecidos. A sua estrutura é tetramérica, tendo cada uma das quatro subunidades um grupo prostético - heme - com um átomo de ferro no centro. A fracção principal da hemoglobina de mamíferos adultos é composta por duas cadeias α e duas cadeias β (BRAEND, 1971; CECCHINI & NIJS, 1986).

O *locus* da HB foi um dos primeiros a ser estudado, apresentando polimorfismo em vários mamíferos (CECCHINI & NIJS, 1986; BRAEND *et al.*, 1988; CLARKE *et al.*, 1989; WANG *et al.*, 1990; SELVARAJ *et al.*, 1991). Em 1955, CABANNE & SERAIN (*in* BRAEND, 1988), descrevem pela primeira vez o polimorfismo da HB em bovinos do Norte da África. Posteriormente, muitos estudos foram efectuados descrevendo-se 13 variantes (raros na sua maioria), com diferenças apenas nas cadeias beta (CECCHINI & NIJS, 1986; BRAEND, 1988).

- CAII - E.C.4.2.1.1

A CAII é uma metaloenzima com grande distribuição nos animais e nas plantas (TASHIAN, 1989). Catalisa de forma reversível a hidratação do CO_2 em H_2CO_3 (CECCHINI & NIJS, 1986; TASHIAN, 1989). O seu papel fisiológico ainda não é bem conhecido mas é possível que tenha participação na manutenção do balanço osmótico (TASHIAN, 1989).

A ocorrência de variação genética na CAII está descrita em muitas espécies de mamíferos, tendo sido descritos dois *loci* polimórficos (CAI e CAII) (TASHIAN & CARTER, 1976; CLARKE *et al.*, 1989; SELVARAJ *et al.*, 1991).

SARTORE *et al.* (1969) foram os primeiros a detectar polimorfismo electroforético da anidrase carbónica em bovinos domésticos e búfalos americanos. Nos eritrócitos de bovinos apenas se exprime a anidrase carbónica II que apresenta geralmente 2 alelos codominantes autossómicos (CAII*F e CAII*S) (SARTORE *et al.*, 1969; TASHIAN & CARTER, 1976). Mais tarde, foram encontrados 3 novos alelos (C, Z e X) (CECCHINI & NIJS, 1986).

- PEPB - E.C.3.4.12.

As peptidases formam um conjunto de enzimas capazes de hidrolisar di- e tripéptidos, caracterizando-se pela sua especificidade em relação a diversos substratos, bem como através da sua distribuição tecidual.

A PEPB apresenta uma estrutura monomérica, tendo sido descrita como polimórfica em algumas raças brasileiras de bovinos de origem europeia e indiana (DEL LAMA *et al.*, 1992).

- DIA - E.C.1.6.4.3.

A enzima monomérica DIA (NADH - Methemoglobina redutase), também conhecida por citocromo b₅ redutase, faz parte de um grupo de enzimas que catalisam a redução da methemoglobina (IGLESIAS, 1989; VIEIRA, 1993; ARANA *et al.*, 1986).

O seu polimorfismo genético foi detectado em várias espécies de Ungulados, incluindo os bovinos (CLARKE *et al.*, 1989; IGLESIAS, 1989; SELVARAJ *et al.*, 1991; TATE & MCEWAN, 1992).

- NP - E.C.2.4.2.1.

A enzima NP encontra-se distribuída por vários tecidos e órgãos e catalisa reversivelmente a fosforólise dos nucleosídeos purínicos, levando à formação das respectivas bases e ribose-1-fosfato (IGLESIAS, 1989).

O polimorfismo genético desta enzima foi detectado em várias espécies de mamíferos, incluindo os bovinos (ANSAY, 1973; HARRIS & HOPKINSON, 1978; TUKER & YOUNG, 1988; CLARKE *et al.*, 1989; IGLESIAS, 1989; FERRAND, 1995).

- MDH - E.C.1.1.1.37

A MDH é uma oxirredutase dimérica na maioria dos mamíferos, responsável pela oxidação do L-malato em oxoglutarato, com NAD como aceitador. A reacção é reversível em presença de NADH e oxaloacetato. A enzima diz-se NAD específica pelo facto da reacção só ocorrer na presença deste cofactor (MORAIS, 1992; PEREIRA, 1997).

A ocorrência de variação genética neste *locus* foi descrita para vários mamíferos (HARRIS & HOPKINSON, 1978; TUÑÓN *et al.*, 1989; SELVARAJ *et al.*, 1991). Contudo, relativamente aos bovinos, não foi possível encontrar referências quanto ao seu polimorfismo.

- PGD - E.C.1.1.1.44

A PGD é uma enzima dimérica envolvida na via das pentoses-fosfato, catalisando a conversão de 6-fosfogluconato em ribose-5-fosfato.

O polimorfismo genético do *locus* PGD está descrito em diversas espécies de Ungulados (HERZOG, 1988; PENEDO *et al.*, 1988; BEKENEV & ORLOVA, 1991; KUROSAWA & TANAKA, 1991; JANZEN & COTHRAN, 1991; FERNDAL *et al.*, 1992). Contudo, relativamente aos bovinos, não foi possível encontrar referências quanto ao seu polimorfismo.

- GPI - E.C.5.3.1.9

A isomerase da fosfoglucose cataliza a reacção reversível de conversão de glucose-6-fosfato em frutose-6-fosfato (HARRIS & HOPKINSON, 1978; PRETSCH *et al.*, 1990).

É uma enzima dimérica com polimorfismo genético em várias espécies de mamíferos, nomeadamente no cão (ARNOLD & BOUW, 1989), no porco (VAN DE WEGHE *et al.*, 1988; BEKENEV & ORLOVA, 1991), na ovelha (RASERO *et al.*, 1993), em lamas e alpacas (PENEDO *et al.*, 1988) e no Homem (HARRIS & HOPKINSON, 1978).

- MPI - E.C.5.3.1.8

A MPI é uma enzima monomérica de acção catalítica que permite a isomerização de D-manose-6-fosfato em D-frutose-6-fosfato.

Em diversas espécies de mamíferos, nomeadamente no Homem (RITTER *et al.*, 1974), em babuínos (RITTER & SCHMITT, 1973) e ratos (NICHOLS *et al.*, 1973; VANDEBERG & AIVALIOTIS, 1990), esta enzima não apresenta actividade em eritrócitos, sendo porém detectada em diversos tecidos como rim, fígado e o músculo. Mais tarde, demonstrou-se a possibilidade de proceder a esta detecção em hemolisados de cavalos, coelhos e lebres (HALL *et al.*, 1991; VIEIRA & FERRAND, 1995; SANTOS, 1995).

O polimorfismo genético de MPI em bovinos foi descrito por ANSAY (1973), apresentando três alelos autossómicos codominantes (MPI*A, MPI*B e MPI*C).

- ALB

A albumina é a proteína mais abundante no plasma dos mamíferos e apresenta uma estrutura monomérica. A sua função está relacionada com processos de transporte e de regulação do balanço osmótico (CECCHINI & NIJS, 1986; CARTER *et al.*, 1989).

O polimorfismo genético da albumina está descrito em várias espécies de Ungulados (STORMONT *et al.*, 1963; BOWLING & CLARK, 1988; PENEDO *et al.*, 1988; ERHARDT, 1991; SELVARAJ *et al.*, 1991; CRISTOFALO *et al.*, 1992; ERHARDT & SIMIANER, 1993).

EFREMOV e ASHTON em 1965 (*in* CECCHINI & NIJS, 1986) descrevem pela primeira vez polimorfismo genético em raças bovinas inglesas. Inicialmente encontraram-se dois alelos (ALB*A ou ALB*F, e ALB*B ou ALB*S), por electroforese ácida. Mais tarde, descreveram-se outros alelos em raças britânicas (ALB*H e ALB*G), e em raças africanas (ALB*D, ALB*E e ALB*F) (CECCHINI & NIJS, 1986). ABE *et al.* em 1971 descrevem, o alelo ALB*X (*in* CECCHINI & NIJS, 1986).

- TF

A transferrina é uma β -globulina sérica responsável pelo transporte do ferro. Possui uma estrutura monomérica glicosilada (CECCHINI & NIJS, 1986; WELCHS, 1990; PENHALLOW *et al.*, 1991; CUNHA, 1994).

O polimorfismo genético desta proteína foi detectado em várias espécies de Ungulados (KRISTJANSSON, 1963; STORMONT *et al.*, 1963; ASHTON, 1965; GAHNE *et al.*, 1977; CECCHINI & NIJS, 1986; ERHARD, 1986; KUROSAWA & TANAKA, 1988; PENEDO *et al.*, 1988; CLARKE *et al.*, 1989; HERZOG, 1989; JUNEJA *et al.*, 1989; TSUJI *et al.*, 1989; SCHNEIDER *et al.*, 1990; STRATIL *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 1990; SELVARAJ *et al.*, 1991; DRATCH *et al.*, 1992; VANKAN & BELL, 1992a; ČÍŽOVÁ *et al.*, 1993; ERHARD *et al.*, 1993).

ASHTON em 1965 descreveu, pela primeira vez, o polimorfismo genético de TF em bovinos, estando actualmente descritos sete alelos: TF*A, TF*B, TF*D1, TF*D2, TF*E, TF*F e TF*G (CECCHINI & NIJS, 1986). A subdivisão do alelo TF*D em TF*D1 e TF*D2 foi descrita por KRISTJANSSON & HICKMAN (1965).

Nos bovinos, os *loci* TF e CP encontram-se ligados, como tem sido descrito para várias espécies de mamíferos (JUNEJA *et al.*, 1989).

- GC

A GC apresenta uma estrutura monomérica e o seu polimorfismo genético está descrito em várias espécies de Ungulados (GAHNE, 1963; KRISTJANSSON, 1963; JUNEJA *et al.*, 1987; PENEDO *et al.*, 1988; PENEDO & JUNEJA, 1989; KALÁB *et al.*, 1990; ERHARDT, 1991; VANKAN & BELL, 1992b; STERN *et al.*, 1992; ERHARDT & SIMIANER, 1993; STRATIL *et al.*, 1995).

Nos bovinos, o polimorfismo genético da GC foi inicialmente descrito por GAHNE (1963) e ASHTON (1963) (*in* GAHNE *et al.*, 1977), mas só mais tarde foi possível obter frequências génicas para este *locus* (alelos GC*A e GC*B) em diferentes raças europeias (GAHNE *et al.*, 1977). A utilização de novas técnicas de separação permitiu distinguir um terceiro alelo, GC*C (VAN DE WEGHE, 1982).

A existência de ligação factorial entre os *loci* ALB e GC foi demonstrada no Homem, em primeiro lugar, e depois nos cavalos, nos bovinos e na ovelha (VAN DE WEGHE, 1982; ERHARDT & SIMIANER, 1993).

2.3. - TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

- HB

A separação da molécula HB por focagem isoelectrica foi feita mediante a utilização de hemolisados diluídos 1:8 em água bidestilada.

- CAII

A separação electroforética de CAII foi realizada em gel de amido e em focagem isoelectrica. No primeiro caso, as amostras foram simplesmente tratadas com tolueno, enquanto no segundo se procedeu, ainda, à sua redução com uma solução de ditioneitol (DTT) 120 mM (100 µl de amostra não diluída e 20 µl de DTT 120 mM) durante 1 h a 37°C.

Quando se utilizou focagem isoelectrica, além do tratamento já referido, foi necessário realizar uma diluição final de 1:10 com água bidestilada.

- PEPB; DIA; NP; MDH; PGD; GPI e MPI

As separações electroforéticas de PEPB, DIA, NP, MDH, PGD, GPI e MPI em gel de amido foram efectuadas com hemolisados não diluídos, submetidos ao mesmo tratamento descrito para CAII quando separada por electroforese convencional.

- ALB

Na separação de ALB por focagem isoeléctrica utilizaram-se amostras de plasma diluídas com água bidestilada na proporção de 1:70.

- TF

Na separação de TF efectuada por focagem isoeléctrica utilizaram-se amostras de plasma submetidas a vários tipos de tratamento, para comparação dos padrões de bandas obtidos:

1. Remoção dos resíduos de ácido siálico da molécula de TF
diluição 1:3 com neuraminidase, durante 1 h a 37 °C.
2. Remoção do *Fe* da molécula de TF
diluição 1:3 com EDTA-dissódico (20%) 2 h antes da aplicação para remoção dos átomos de *Fe* da molécula de TF.
3. Saturação em *Fe* da molécula de TF
 - 3.1 - diluição 1:3 com solução de sulfato de amónio férrico 0,15% (p/v) em ácido cítrico 60 mM, seguida de incubação à temperatura ambiente 18 h. A utilização de uma razão ligante / *Fe* de 20:1 permite uma rápida saturação da molécula de TF (FERRAND, 1995).
 - 3.2 - diluição 1:3 com solução de sulfato de amónio ferroso 0,15% (p/v) em ácido cítrico 60 mM, seguida de incubação à temperatura ambiente 18 h.
 - 3.3 - diluição 1:3 com solução de citrato de amónio férrico 0,15% (p/v) em ácido cítrico 60 mM, seguida de incubação à temperatura ambiente 18 h.
 - 3.4 - diluição 1:3 com solução de citrato férrico 0,15% (p/v) em ácido cítrico 60 mM, seguida de incubação à temperatura ambiente 18 h.
 - 3.5 - diluição 1:3 com solução de cloreto de ferro 0,15% (p/v) em ácido cítrico 60 mM, seguida de incubação à temperatura ambiente 18 h.

Antes da inserção, as amostras foram parcialmente purificadas através da adição de 5 volumes de uma solução de rivanol 0,6% (p/v) em tampão Tris / HCl 0,05 M (ajusta-se o pH para valores de 9,1 com Tris 1 M), seguida de centrifugação.

- GC

A fim de proceder à remoção dos resíduos de ácido siálico existente nas cadeias de hidratos de carbono ligadas à molécula GC, as amostras de plasma foram submetidas a uma incubação com uma solução de neuraminidase (*Clostridium perfringens*, SIGMA type V, 1,8 U/ml) na proporção de 1:3 durante 18 h a 37°C, acrescentando-se posteriormente água bidestilada até à obtenção de uma diluição final de 1:4. Paralelamente, procedeu-se a uma diluição das amostras com água bidestilada (1:9) para comparação dos padrões de bandas obtidos.

2.4. - MÉTODOS DE SEPARAÇÃO

Electroforese convencional

Nas técnicas de electroforese convencional, foram utilizados vários sistemas de tampão para os geis e para as pontes, conforme a proteína em estudo.

Focagem isoelectrica

Os sistemas de focagem isoelectrica utilizados na separação de proteínas foram realizados em matrizes de poliacrilamida (T = 5%; C = 3%) com dimensões 230x100x0,3mm. Os geis foram aplicados sobre uma película de suporte GELFIX (SERVA), permitindo o seu manuseamento adequado.

A adição de soluções de TEMED 10% (p/v) e persulfato de amónio (PSA) 10% (p/v) permitiu a polimerização do gel à temperatura ambiente (24 horas) ou a 37 °C durante 1 h.

As separações por focagem isoelectrica decorreram sobre placa de arrefecimento a aproximadamente 10°C (8 - 12°C).

- **HB**

A separação da molécula de HB foi realizada por focagem isoelectrica em gradiente de pH livre, segundo a técnica descrita por FERRAND (1995), com algumas modificações.

A composição da solução de polimerização e os parâmetros eléctricos utilizados estão indicados nas tabelas 2.4.1 e 2.4.2, respectivamente.

Tabela 2.4.1: Solução de polimerização utilizada para a separação da molécula nativa de HB por focagem isoelectrica.

Componentes da solução	Quantidades
Acrilamida 28% (p/v)	1,8 ml
Bisacrilamida 2% (p/v)	0,8 ml
Sacarose	2 g
Anfólitos 5-8 (SIGMA)	300 µl
7-9 (PHARMACIA)	300 µl
Água bidestilada	até 10 ml volume final
TEMED 10% (v/v)	10 µl
PSA 10% (p/v)	70 µl

Tabela 2.4.2: Parâmetros eléctricos utilizados na focagem isoelectrica de HB.

	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Tempo (T)
Pré focagem	1500	25	1	30 min
			2	15 min
			3	15 min
Focagem	1500	25	15	2h 30 min

As soluções para os eléctrodos foram ácido aspártico 0,04 M (ânodo) e NaOH 0,1 M (cátodo). As amostras foram aplicadas a 1,5 cm do cátodo, tendo sido inseridas com o auxílio de um aplicador de borracha silicone (SERVA).

- CAII

A separação de CAII fez-se em gel de amido (15% p/v, SIGMA) conforme o descrito por AMORIM (1983), com algumas modificações, e ainda por focagem isoelectrica em gradiente de pH livre.

Utilizam-se os seguintes sistemas tampão para a separação por electroforese em gel de amido:

Tampão das Pontes:	Tris	0,250 M
pH = 7,6	Ácido cítrico	0,067 M
Tampão do Gel:	Diluição 1:10 do tampão das pontes	
pH = 7,6		

As amostras foram inseridas em meio Sephadex G-200 (PHARMACIA) na proporção de 1:1. As electroforeses foram realizadas em placa de arrefecimento (8°C) e com um gradiente de potencial de 5 V/cm durante 16 h.

A técnica utilizada para a separação de CAII por focagem isoelectrica foi a descrita por BOWLING *et al.* (1990), com algumas modificações. A composição da solução de polimerização e os parâmetros eléctricos utilizados estão indicados nas tabelas 2.4.3 e 2.4.4, respectivamente.

As soluções para os eléctrodos foram ácido aspártico 0,04 M (ânodo) e NaOH 0,1 M (cátodo). As amostras foram inseridas com o auxílio de um aplicador de borracha silicone (SERVA) colocado a 1,5 cm do cátodo.

Tabela 2.4.3: Solução de polimerização utilizada na separação de CAII por focagem isoelétrica.

Componentes da solução	Quantidades
Acrilamida 28% (p/v)	1,8 ml
Bisacrilamida 2% (p/v)	0,8 ml
Sacarose	2 g
Anfólitos 4-6,5 (PHARMACIA)	500 μ l
Anfólitos 3,5-10 (PHARMACIA)	100 μ l
Água bidestilada	até 10 ml volume final
TEMED 10% (v/v)	10 μ l
PSA 10% (p/v)	70 μ l

Tabela 2.4.4: Parâmetros elétricos utilizados na separação de CAII por focagem isoelétrica.

	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Tempo (T)
Pré focagem	1500	25	1	30 min
			3	15 min
			5	15 min
Focagem	2500	25	8	30 min
			10	30 min
			12	30 min

- PEPB

A separação da PEPB foi realizada em gel de amido (15% p/v, SIGMA) de acordo com a técnica descrita por POVEY *et al.* (1972), com algumas modificações.

Utilizou-se o seguinte sistema tampão:

Tampão das Pontes:	Tris	0,1 M
pH = 7,4	NaH ₂ PO ₄	0,1 M
Tampão do Gel:	Diluição 1:10 do tampão das pontes	
pH = 7,4		

As amostras são inseridas em meio Sephadex G-200 (PHARMACIA) na proporção de 1:1. As electroforeses foram realizadas em placas de arrefecimento (8°C) e com um gradiente de potencial de 5 V/cm durante 16 h.

- DIA

No caso da separação de DIA, a técnica é idêntica à utilizada para CAII: electroforese em gel de amido (15% p/v, SIGMA) conforme o descrito por AMORIM (1983), com algumas modificações.

- NP, MDH, PGD, GPI e MPI

As separações das enzimas NP, MDH, PGD, GPI e MPI fizeram-se em simultâneo por electroforese em gel de amido (15% p/v, SIGMA) conforme o descrito por AMORIM *et al.* (1982), com algumas modificações.

Utilizou-se o seguinte sistema tampão:

Tampão das Pontes:	NaOH	1,130 M
pH = 6,0	Ácido cítrico	0,400 M
Tampão do Gel:	His/HCl	0,020 M
pH = 6,0	NaOH	0,010 M

As amostras foram inseridas em meio Sephadex G-200 (PHARMACIA) na proporção de 1:1. As electroforeses foram realizadas em placas de arrefecimento (8°C) e com um gradiente de potencial de 8 V/cm durante 15 h.

- ALB

Nas tabelas 2.4.5 e 2.4.6 indicam-se, respectivamente, a composição da solução de polimerização para a separação de ALB por focagem isoelectrica, segundo a técnica descrita por ROCHA *et al.* (1991), com algumas modificações, e os parâmetros eléctricos.

Tabela 2.4.5: Solução de polimerização utilizada para a separação de ALB por focagem isoelectrica.

Componentes da solução	Quantidades
Acrilamida 28% (p/v)	1,8 ml
Bisacrilamida 2% (p/v)	0,8 ml
Ureia	4,8 g
Anfólitos 5-6 (PHARMACIA)	250 µl
Anfólitos 5-8 (PHARMACIA)	250 µl
Anfólitos 6-8 (PHARMACIA)	125 µl
Água bidestilada	até 10 ml volume final
TEMED 10% (v/v)	30 µl
PSA 10% (p/v)	70 µl

Tabela 2.4.6: Parâmetros eléctricos utilizados na separação de ALB por focagem isoelectrica.

	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Tempo (T)
Pré focagem	1500	25	1	30 min
			2	15 min
			3	15 min
Focagem	1500	25	4	3 h
			5	30 min

As soluções para os eléctrodos foram ácido aspártico 0,04 M (ânodo) e NaOH 1 M (cátodo). As amostras foram aplicadas a 1,5 cm do cátodo, com o auxílio de um aplicador de borracha silicone (SERVA).

- TF

A separação da molécula de TF foi efectuada por focagem isoelectrica. A composição da solução de polimerização e os parâmetros eléctricos utilizados estão indicados nas tabelas 2.4.7 e 2.4.8, respectivamente.

Tabela 2.4.7: Solução de polimerização utilizada para a separação da TF por focagem isoelectrica.

Componentes da solução	Quantidades
Acrilamida 28% (p/v)	1,8 ml
Bisacrilamida 2% (p/v)	0,8 ml
Sacarose	2 g
Anfólitos 3,5-5(LKB)	100 µl
Anfólitos 4-6,5 (PHARMACIA)	500 µl
Água bidestilada	até 10 ml volume final
TEMED 10% (v/v)	30 µl
PSA 10% (p/v)	70 µl

Tabela 2.4.8: Parâmetros eléctricos utilizados na separação de TF por focagem isoelectrica.

	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Tempo (T)
Pré focagem	1500	25	1	20 min
			2	10 min
			3	10 min
Focagem	2500	25	8	30 min
			10	30 min
			12	30 min

As soluções para os eléctrodos foram de ácido aspártico 0,04 M (ânodo) e de NaOH 1 M (cátodo). As amostras foram aplicadas a 1,5 cm do cátodo, com o auxílio de um aplicador de borracha silicone (SERVA).

- GC

Nas tabelas 2.4.9 e 2.4.10 apresenta-se, respectivamente, a composição da solução de polimerização e os parâmetros eléctricos utilizados na focagem isoelectrica de GC.

Tabela 2.4.9: Solução de polimerização utilizada para a separação da GC por focagem isoelectrica.

Componentes da solução	Quantidades
Acrilamida 28% (p/v)	1,8 ml
Bisacrilamida 2% (p/v)	0,8 ml
Sacarose	2 g
Anfólitos 4,5-5,4 (PHARMACIA)	437 μ l
Anfólitos 4-6 (LKB)	188 μ l
Água bidestilada	até 10 ml volume final
TEMED 10% (v/v)	10 μ l
PSA 10% (p/v)	70 μ l

Tabela 2.4.10: Parâmetros eléctricos utilizados na separação de GC por focagem isoelectrica.

	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Tempo (T)
Pré focagem	1500	25	1	30 min
			2	15 min
			3	15 min
Focagem	1500	25	4	3 h
			5	30 min

Para os eléctrodos, foram utilizadas soluções de ácido aspártico 0,04 M (ânodo) e de NaOH 0,2 M (cátodo). As amostras foram inseridas com o auxílio de um aplicador de borracha silicone (SERVA), colocado a 1,5 cm do cátodo.

2.5. - MÉTODOS DE DETECÇÃO

Após a separação das proteínas, os padrões electroforéticos foram geralmente obtidos por detecção específica, aproveitando a actividade catalítica das enzimas. Noutros casos, a revelação foi feita por coloração geral de proteínas.

- HB

A visualização da HB foi obtida mediante coloração geral de proteínas, segundo o seguinte procedimento:

Fixação:

Imersão do gel numa solução de ácido tricloroacético 12,5% (p/v), durante 10 minutos.

Coloração geral de proteínas:

Coloração com uma solução de Coomassie R-250 0,115% (p/v) numa mistura de ácido acético/etanol/água destilada (4:25:71) após aquecimento, seguida de filtração, durante 5-10 minutos. A descoloração é feita com ácido acético, etanol e água destilada, aquecida a cerca de 60°C, até se obter o contraste desejado.

- CAII

Após separação por electroforese em gel de amido, visualizou-se a CAII pela sua actividade esterásica, adicionando-se diacetato de fluoresceína (em quantidades vestigiais que

foram previamente dissolvidas em 200 µl de acetona) a uma solução de incubação tamponada (pH = 6,6). Esta solução de incubação é composta por ácido cítrico 27 mM e Na₂HPO₄ 116 mM, e foi aplicada sobre o gel de amido com o auxílio de papéis de filtro Whatman nº1. Em seguida, incubou-se durante 30 minutos a 37°C. A observação das bandas de CAII (devido à sua capacidade esterásica) é feita sob luz ultravioleta.

Após separação por focagem isoelectrica, utilizou-se uma coloração geral de proteínas para visualização da CAII, segundo o método descrito para a HB, sem fixação.

- PEPB

A detecção da PEPB após a separação electroforética foi feita através da aplicação, sobre o gel de amido, de papéis de filtro Whatman nº1 embebidos numa solução de coloração, seguindo-se uma incubação de 30 minutos a 37°C.

A solução de coloração contém o substrato da PEPB, L-leucilglicil-glicina 0,004 M, veneno de cobra da espécie *Agkistrodon piscivorus piscivorus* 0,4% (p/v), MTT 2,4 mM e metosulfato de fenazina (PMS) 0,3 mM num tampão de pH = 8,0 (Tris/ HCl 0,05 M).

- DIA

Após a separação por electroforese em gel de amido, a identificação da DIA foi obtida pela adição de uma solução de coloração a uma fatia do gel. A incubação decorreu durante 2 horas a 37°C.

A solução de coloração foi realizada em duas fases:

1º - colocou-se 2,6-diclorofenol-indofenol (DCIP) 0,1 mM com um tampão de pH = 8,5 (Tris/ HCl 0,05M), adicionando-se à mistura água bidestilada até perfazer 50 ml. Em seguida filtrou-se a solução.

2º - à solução filtrada adicionou-se MTT 0,3 mM e NADH 0,2 mM e agitou-se antes de verter sobre a fatia de gel de amido.

- NP

A detecção da enzima NP, após a separação por electroforese, foi feita através da aplicação, sobre o gel de amido, de papéis de filtro Whatman nº1 embebidos com a solução de coloração. Em seguida, incubou-se durante 15 minutos a 37°C.

A solução de incubação contém inosina 3,7 mM, MTT 2,4 mM, XOD 0,004 U/ml, uma gota de azul de Meldola (SIGMA) (10 %, v/v em água bidestilada) e uma solução de tampão de incubação pH = 7,5 constituída por KH_2PO_4 0,05 M e NaOH 0,04 M.

- MDH

Na detecção da actividade enzimática de MDH foi utilizado o método de *sandwich*, após a sua separação electroforética em gel de amido. Em seguida, incubou-se durante 15 minutos a 37°C. O método de *sandwich* consiste na aplicação de uma fatia de gel de amido entre duas folhas de papel de filtro Whatman nº1 embebido com a solução de coloração.

A solução de coloração utilizada na detecção da MDH contém NAD 1 mM, MTT 2 mM e piruvato de sódio (quantidades vestigiais). Esta solução foi feita com um tampão de incubação pH = 7,4 constituído por ácido málico 0,222 M, Tris 0,50 M e MgCl_2 0,02 M.

- PGD

A detecção da actividade enzimática de PGD foi feita pelo método de *sandwich*, após a sua separação electroforética em gel de amido.

A solução de coloração contém quantidades vestigiais de ácido 6-fosfogluónico, NADP, MTT, e uma gota de azul de Meldola (0,5%, p/v em água bidestilada) dissolvidos num tampão de pH = 7,4 constituído por Tris 0,1 M, His/HCl 0,1 M, Imidazol 0,015 M e MgCl_2 0,005 M.

- GPI

A detecção da actividade enzimática de GPI foi feita pelo método de *sandwich*, após a sua separação electroforética em gel de amido.

A solução de coloração contém frutose-6-fosfato 5,5 mM, NADP 2,2 mM, MTT 4 mM, desidrogenase da glucose-6-fosfato (G6PD) 1,4 U/ml e uma gota de azul de Meldola (0,5%, p/v em água bidestilada) dissolvidos num tampão de pH = 7,4 constituído por Tris 0,1 M, His/HCl 0,1 M, Imidazol 0,015 M e MgCl₂ 0,005 M.

- MPI

Detectou-se a actividade enzimática de MPI pelo método de *sandwich*, após a sua separação electroforética em gel de amido.

A solução de coloração contém manose-6-fosfato 4,2 mM, NADP 1,3 mM, MTT 2,4 mM, e uma gota de azul de Meldola (0,5%, p/v em água bidestilada) dissolvidos num tampão de pH = 7,4 constituído por Tris 0,1 M, His/HCl 0,1 M, Imidazol 0,015 M e MgCl₂ 0,005 M. Por fim, adicionaram-se as enzimas isomerase da glucose-6-fosfato (GPI) 3 U/ml e desidrogenase da glucose-6-fosfato (G6PD) 5 U/ml.

- ALB e TF

A detecção de ALB e de TF foi efectuada através do método de coloração geral de proteínas descrito para a HB, utilizando-se Coomasie R-250, sem fixação.

- GC

A visualização de GC efectuou-se por detecção imunoenzimática após transferência da proteína para uma membrana de nitrocelulose (0,45 µm; SCHLEICHER & SCHULL), segundo a técnica descrita por FERRAND (1995).

Após esse processo de transferência, as membranas de nitrocelulose foram lavadas 3 vezes (15 minutos) numa solução de Tween 20 (MERCK) 0,025% (v/v) em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS: Na_2HPO_4 50 mM, KH_2PO_4 18mM, NaCl 147 mM, pH = 7,1), e bloqueadas numa solução de leite em pó magro (5% p/v em PBS) durante 18 h, com agitação permanente e à temperatura ambiente.

Depois da primeira lavagem, aplicou-se o antisoro (anti-GC humana, ATAB 81936), diluído 1:170 em PBS com 1% (p/v) de albumina sérica bovina (SIGMA), durante 1 h à temperatura ambiente.

Repetiu-se novamente a lavagem, segundo o processo já referido, seguindo-se a aplicação do segundo antisoro (anticorpos contra imunoglobulinas caprinas desenvolvidos em coelho, e conjugados com uma peroxidase; ATAB 83806), diluído 1:600 em PBS com 1% (p/v) de albumina sérica bovina (SIGMA), durante 1 h à temperatura ambiente.

Depois de duas lavagens (5 minutos) com Tween 20/PBS, procedeu-se à detecção da GC com uma solução de 9-amino-2-etilcarbazol 0,04% (p/v) e de metanol 20% (v/v) em PBS. As bandas correspondentes à actividade peroxidásica aparecem rapidamente, bloqueando-se a reacção com água bidestilada.

2.6. - MÉTODOS DE CÁLCULO

As frequências génicas foram calculadas por contagem directa de genes a partir da distribuição fenotípica obtida.

O cálculo dos valores de heterozigotia média (H), da proporção de *loci* polimórficos (P), do número médio de alelos por *locus* (n_a), estatísticas F e frequências fenotípicas esperadas segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi efectuado com a utilização do programa BIOSYS versão 1.7 (SWOFFORD & SELANDER, 1989).

O cálculo de distâncias genéticas e obtenção de dendrogramas, foi efectuado com o programa PHYLIP versão 3.5 (FELSENTEIN, 1993).

3. - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. - ANÁLISE DOS MÉTODOS DE SEPARAÇÃO

De entre os 12 *loci* estudados neste trabalho, detectaram-se 5 monomórficos (PEPB, DIA, GPI, MDH e PGD) e 7 polimórficos (HB, CAIL, NP, MPI, ALB, TF e GC).

Loci monomórficos

- PEPB

A utilização de técnicas de electroforese em gel de amido permitiu a detecção de um só fenótipo (figura 3.1.1), correspondente a indivíduos homozigóticos para o alelo PEPB*2, descrito por DEL LAMA *et al.* (1992). No entanto, na raça Minhota detectou-se um indivíduo heterozigótico.

O fenótipo PEPB 2 apresenta um padrão com duas bandas, uma de grande intensidade e outra secundária, mais anódica, de menor intensidade. No indivíduo heterozigótico 2-1 (não representado) observou-se um padrão de três bandas, sendo a terceira mais anódica e menos intensa.

A quase inexistência de PEPB*1 nas raças estudadas está de acordo com o referido em DEL LAMA *et al.* (1992), que sugere a fixação de PEPB*2 na maior parte das populações de bovinos de origem europeia (com excepção das raças italianas Marchigiana e Chianina).



Figura 3.1.1: Fenótipos de PEPB observados por electroforese convencional em gel de amido.

- DIA

Os resultados obtidos para a enzima DIA revelaram ausência de polimorfismo electroforético (figura 3.1.2). Resultados semelhantes foram também obtidos em várias raças autóctones espanholas (GONZALEZ *et al.*, 1987; IGLESIAS, 1989; ARRANZ *et al.*, 1992).

MAKAVEEV (1979 *in* IGLESIAS, 1989) detectou polimorfismo desta enzima em eritrócitos de búfalos da Bulgária e nas raças bovinas Frisia e Simmental, descrevendo dois alelos codominantes, DIA*A e DIA*B.

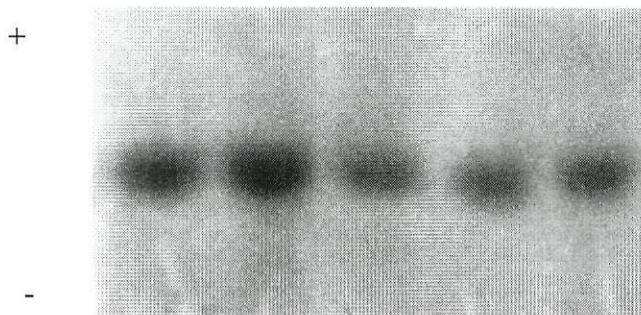


Figura 3.1.2: Padrão de DIA observado por electroforese convencional em gel de amido.

- GPI

Não se detectou variação electroforética para o *locus* GPI. Estes resultados não se podem comparar com os obtidos noutras raças por não ter sido possível consultar outros trabalhos onde se descrevesse variação do *locus* GPI em gado bovino.

A figura 3.1.3 apresenta o padrão obtido para esta enzima, observando-se três bandas, duas com grande intensidade, e uma banda mais anódica de menor intensidade.

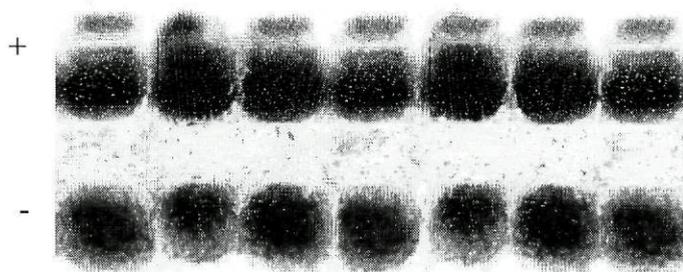


Figura 3.1.3: Padrão de GPI obtido em hemolisados por electroforese convencional em gel de amido.

- MDH

A enzima MDH revelou-se monomórfica. Este resultado é concordante com outros estudos (ARRANZ *et al.*, 1992).

Na figura 3.1.4 observa-se o padrão de bandas detectado por electroforese convencional em gel de amido.

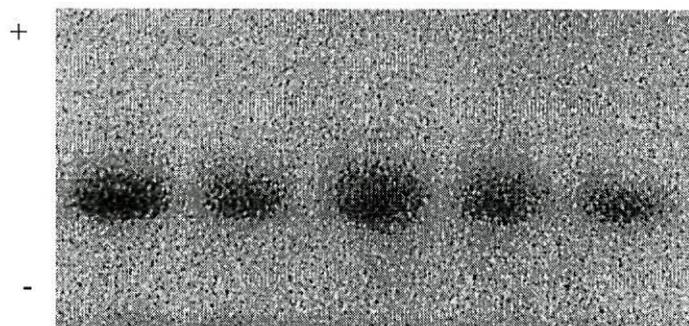


Figura 3.1.4: Padrão de MDH observado por electroforese convencional em gel de amido.

- PGD

A enzima PGD revelou-se monomórfica para as raças Barrosã e Minhota; também neste caso não se encontrou qualquer referência bibliográfica relativa a um possível polimorfismo deste *locus* em gado bovino.

Na figura 3.1.5 observa-se o padrão obtido para esta enzima. Em amostras armazenadas por um longo período de tempo detectaram-se duas bandas, sendo a mais anódica a que revela menor intensidade; as amostras mais recentes apresentam um padrão electroforético com uma só banda.

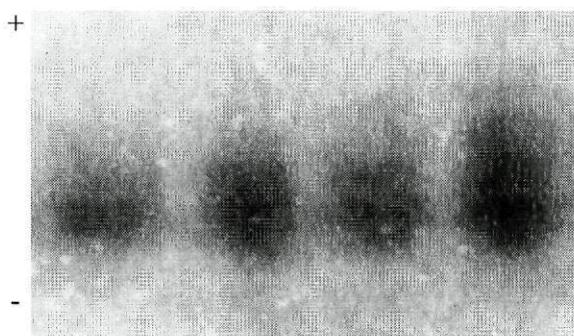


Figura 3.1.5: Padrão de PGD observado por electroforese convencional em gel de amido.

***Loci* polimórficos**

- HB

A electroforese convencional não permite discriminar os electromorfos de HB. No entanto, a utilização de sistemas de focagem isoelectrica conduz à detecção de polimorfismo nesta proteína, observando-se dois fenótipos, HB A e HB AB.

Na figura 3.1.6 observa-se o padrão electroforético desta molécula, resultante da expressão de dois alelos codominantes, HB*A e HB*B. Resultados idênticos estão descritos em raças bovinas da Península Ibérica (VICENTE, 1978; KIDD *et al.*, 1980; IGLESIAS, 1989).

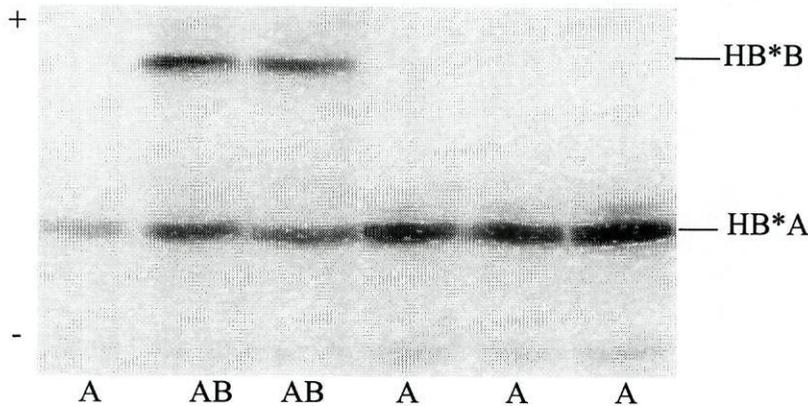


Figura 3.1.6: Separação de hemoglobina nativa por focagem isoeleétrica.

- CAII

A utilização de electroforese em gel de amido e focagem isoeleétrica permitiu identificar três fenótipos, CAII F, CAII FS e CAII S, atribuídos à expressão de dois alelos codominantes, CA*F e CA*S (figuras 3.1.7 e 3.1.8). Porém, a separação por electroforese em gel de amido implica alguma morosidade (tempos de corrida muito longos) e, em amostras coaguladas, o erro de leitura pode ser superior a 20%. Estas dificuldades são minimizadas quando se recorre a focagem isoeleétrica.

Assim, a separação da enzima CAII por focagem isoeleétrica oferece várias vantagens, nomeadamente:

- rapidez e simplicidade de execução;
- utilização de pequenas quantidades de material biológico;
- maior número de amostras fenotipadas por corrida;
- possibilidade de utilização de amostras coaguladas.

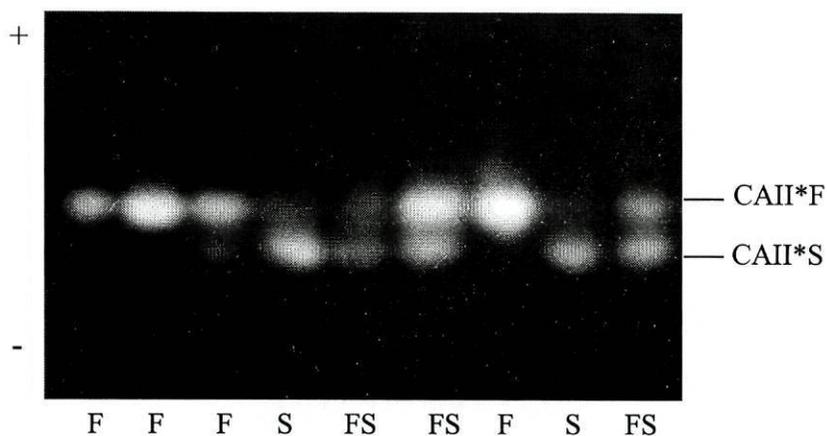


Figura 3.1.7: Fenótipos de CAlI observados sob luz ultravioleta, após separação por electroforese convencional em gel de amido e coloração com diacetato de fluoresceína.

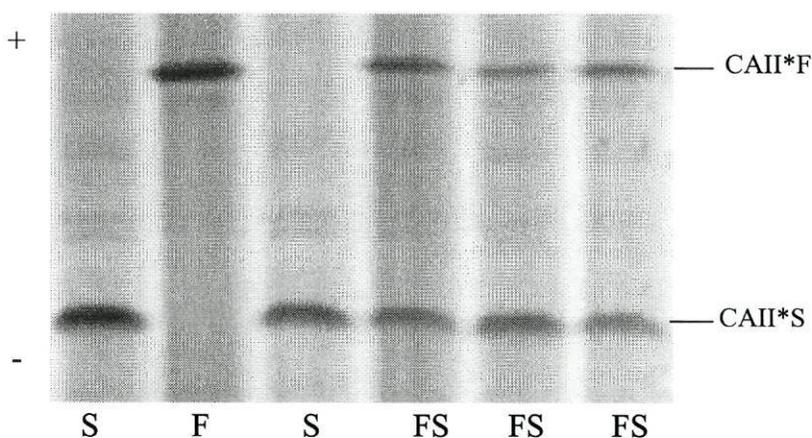


Figura 3.1.8: Fenótipos de CAlI observados por focagem isoeléctrica, após coloração geral de proteínas.

- NP

A expressão fenotípica de NP resulta das combinações possíveis entre um alelo dominante, NP*H, e um recessivo, NP*L (ANSAY, 1973). Este facto implica que apenas em presença do fenótipo NP L é possível fazer corresponder um genótipo (já que o fenótipo NP H pode corresponder aos genótipos H/H e H/L e o fenótipo NP L corresponde ao genótipo L/L).

Na figura 3.1.9 apresenta-se o padrão obtido para a proteína após separação electroforética em gel de amido.

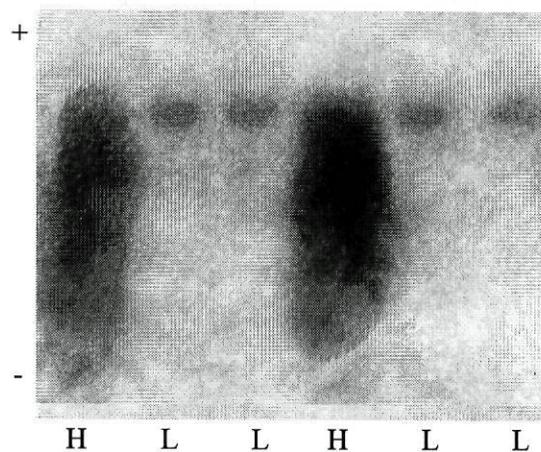


Figura 3.1.9: Fenótipos de NP detectados por electroforese convencional em gel de amido.

- MPI

Na raça Minhota detectaram-se quatro fenótipos, MPI AB, MPI B, MPI BC e MPI C, anteriormente descritos por ANSAY (1973) em bovinos; na raça Barrosã apenas se observam os três últimos fenótipos. De acordo com o mesmo autor, os fenótipos encontrados nesta raça resultam da combinação de dois alelos codominantes, MPI*B e MPI*C, enquanto que MPI*A aparece na raça Minhota com uma frequência reduzida.

Como se pode observar pela análise da figura 3.1.10, MPI*A aparece como o alelo mais anódico, MPI*C como o mais catódico e o alelo mais frequente, MPI*B, situa-se numa posição intermédia em relação aos anteriores. Contudo, a intensidade das bandas é muito fraca, tornando-se quase imperceptível em alguns casos. Esta grande dificuldade em obter um contraste de bandas adequado, mesmo após longos períodos de incubação a 37°C, poderá, eventualmente, levar a uma incorrecta interpretação dos fenótipos. Assim, a utilização de sistemas de focagem isoelectrica na determinação destes fenótipos seria aconselhável, a fim de verificar os resultados obtidos por electroforese convencional.

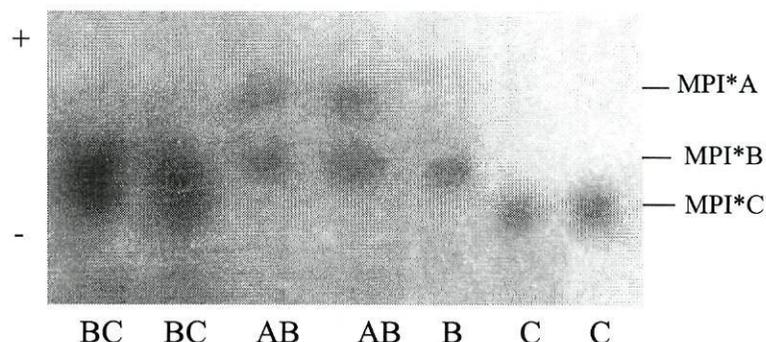


Figura 3.1.10: Fenótipos de MPI observados por electroforese convencional em gel de amido.

- ALB

A separação por focagem isoelectrica permitiu detectar polimorfismo em ALB. Cada indivíduo homozigótico aparece com três bandas: duas de maior intensidade e uma mais acídica, com menor intensidade; os indivíduos heterozigóticos podem apresentar até seis bandas.

Esta heterogeneidade nos padrões de ALB tem sido interpretada como o resultado da capacidade desta proteína se ligar a várias substâncias diferentes (FERRAND, 1995). Com a inclusão de ureia (8M) na matriz de separação, reagente que provoca a desnaturação da proteína levando a uma alteração do seu pI para uma zona mais básica do gradiente, conseguem-se obter padrões de bandas mais simples e mais definidos (KAWAGUCHI, 1973; FERRAND, 1995).

Na figura 3.1.11 apresentam-se os padrões observados que foram interpretados como sendo determinados por três alelos codominantes, ALB*A, ALB*B e ALB*V.

GAHNE *et al.* (1977) e IGLESIAS (1989) detectaram, por electroforese em gel de poliacrilamida e de amido, respectivamente, dois variantes em gado bovino, ALB*A e ALB*B. A utilização de focagem isoelectrica veio confirmar a existência destes dois alelos e acrescentar um terceiro, designado por ALB*V, com uma mobilidade mais acídica do que ALB*A.

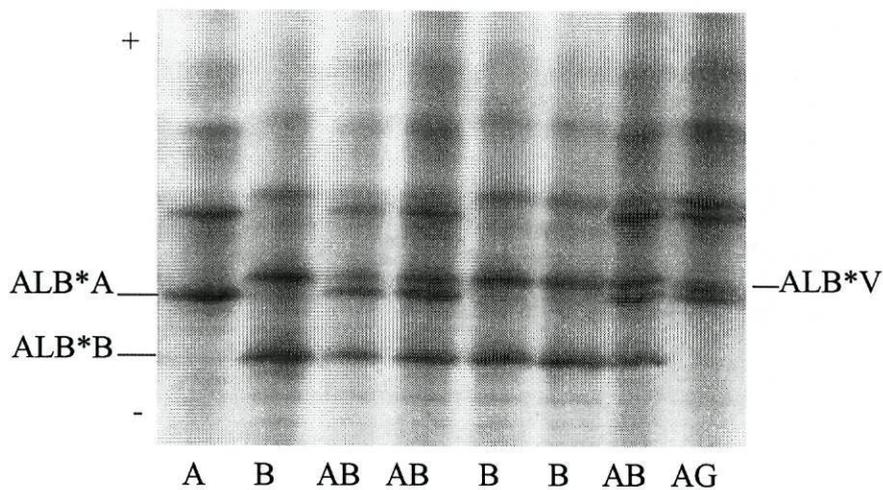


Figura 3.1.11: Fenótipos de ALB determinados em amostras de plasma por focagem isoelétrica na presença de ureia 8M.

ARRANZ *et al.* (1992) revelaram a existência de um outro variante (ALB*D), com mobilidade electroforética intermédia entre ALB*A e ALB*B, ainda não descrito em nenhuma raça autóctone espanhola. Este alelo poderá corresponder ao alelo ALB*V encontrado neste trabalho, apesar de apresentar um pI mais ácido do que ALB*A (ARRANZ, comunicação pessoal).

Desta forma, a técnica de separação por focagem isoelétrica provou ser eficaz na separação dos variantes de ALB, tal como já foi demonstrado no gato (BELL *et al.*, 1994), na ovelha (ERHARDT & SIMIANER, 1993) e no coelho (FERRAND & ROCHA, 1992).

- TF

A transferrina é um dos marcadores mais importantes no estudo e caracterização genética de raças bovinas devido ao seu elevado polimorfismo. No entanto, a sua fenotipagem não é simples, existindo frequentemente problemas de resolução e de separação das bandas (IGLESIAS, 1989).

A fim de averiguar qual a melhor forma de separar os diferentes produtos génicos descritos no *locus* TF, testaram-se vários sistemas electroforéticos em geis de agarose numa vasta gama de sistemas tampão. Esta técnica não ofereceu resultados satisfatórios, pelo que se passou à separação da TF por focagem isoelétrica, recorrendo a matrizes de poliacrilamida

com diferentes concentrações de ureia (6M e 8M); também neste caso não se conseguiram resultados positivos.

Este tipo de dificuldades encontradas na fenotipagem da TF por focagem isoelétrica tinham já sido descritos noutras espécies, nomeadamente na cabra (ERHARDT, 1986) e no coelho (FERRAND, 1995). No entanto, TSUJI *et al.* (1989) demonstraram ser possível fenotipar esta proteína em bovinos, por focagem isoelétrica, sem grandes problemas e sem qualquer aditivo na matriz de poliacrilamida.

Desta forma, a utilização de uma técnica de focagem isoelétrica com um gradiente de pH 3,5-6,5, reforçado em 4,0-6,5, permitiu separar os produtos génicos do *locus* TF. Contudo, os padrões obtidos nem sempre eram definidos, tornando-se dificilmente interpretáveis.

Na tentativa de melhorar os padrões de resolução e de verificar se a variação detectada não resultava de diferenças no estado férrico da molécula de TF, ou ainda da existência de ácidos siálicos ligados à molécula, procedeu-se à sua separação após vários tratamentos das amostras.

A remoção dos ácidos siálicos através do tratamento das amostras com neuraminidase não permitiu a obtenção de bandas definidas; este tratamento não altera significativamente o padrão das bandas de TF de bovinos, como já tinha sido descrito por PENHALLOU *et al.* (1991).

A obtenção de TF no estado apoférrico foi conseguida submetendo as amostras a um tratamento com EDTA-dissódico. Neste caso observa-se que apoTF apresenta uma mobilidade menor e um padrão de bandas mais simples, mas ainda sem uma definição adequada.

A forma Fe₂TF foi obtida mediante vários tratamentos com dadores de Fe (ver capítulo Material e Métodos). Os resultados só se mostraram satisfatórios através da saturação da molécula de TF com uma solução de sulfato de amónio férrico, provavelmente por causar uma maior estabilidade da molécula ao longo da sua separação por focagem isoelétrica com elevadas voltagens, pois, segundo WELCHS (1990), a forma diférrica da transferrina é mais resistente à desnaturação e ao calor do que a forma apoTF.

Estão descritos pelo menos oito alelos no *locus* TF: TF*A1, TF*A2, TF*B, TF*D1, TF*D2, TF*E, TF*F e TF*G; os mais comuns no gado europeu (*Bos taurus*) são TF*A, TF*D1, TF*D2 e TF*E (JAMIESON, 1965). No gado asiático e africano (*Bos indicus*) ocorrem, além das formas anteriores, os alelos TF*B e TF*F.

Na figura 3.1.12 apresenta-se o proteinograma obtido com a utilização de amostras saturadas com *Fe*. Esta técnica permitiu a separação de TF*D em TF*D1 e TF*D2, e a detecção de todos os outros fenótipos descritos em bovinos europeus. Assim, observaram-se quatro alelos codominantes, TF*A, TF*D1, TF*D2 e TF*E.

A expressão fenotípica dos alelos em homozigotia caracteriza-se pela presença de dois dupletos de bandas, aparecendo a banda mais acídica de cada duplete com intensidade mais fraca. Os indivíduos heterozigóticos podem apresentar até oito bandas.

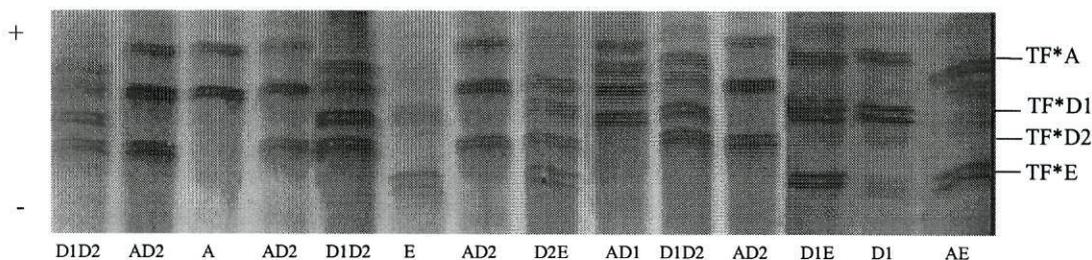


Figura 3.1.12: Fenótipos de TF determinados por focagem isoelectrica apartir de amostras saturadas com uma solução de sulfato de amónio férrico.

IGLESIAS (1989) detectou TF*A e TF*D nas cinco raças de bovinos da Galiza, o variante TF*E na raça Cachena espanhola e um outro variante raro, TF*R, com mobilidade mais lenta, na raça Rubia Galega.

- GC

A GC é uma proteína plasmática que demonstra um elevado grau de heterogeneidade genética em mamíferos (FERRAND, 1995).

A separação de GC em focagem isoelectrica, seguida da utilização de *immunoblotting*, melhorou de forma considerável a capacidade de investigar a variação desta proteína em

diferentes espécies (JUNEJA *et al.*, 1987, PENEDO & JUNEJA, 1989; STRATIL *et al.*, 1990; KALÁB *et al.*, 1990; STERN *et al.*, 1992; VANKAN & BELL, 1992; FERRAND, 1995).

Nas figuras 3.1.13 e 3.1.14 apresentam-se alguns dos fenótipos obtidos na separação da GC por focagem isoeléctrica. Verifica-se que em amostras tratadas com neuraminidase o padrão de bandas se apresenta mais simplificado, surgindo, no entanto, duas bandas (uma mais básica e uma mais acídica) de natureza desconhecida. Os padrões observados foram interpretados como sendo determinados por dois alelos, GC*F e GC*S.

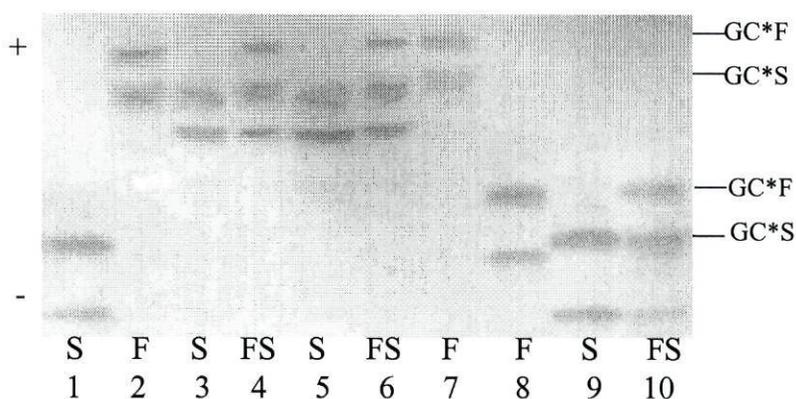


Figura 3.1.13: Fenótipos de GC determinados por focagem isoeléctrica; amostras 1, 8, 9 e 10 tratadas com neuraminidase; amostras 2 a 7 diluídas em água bidestilada.

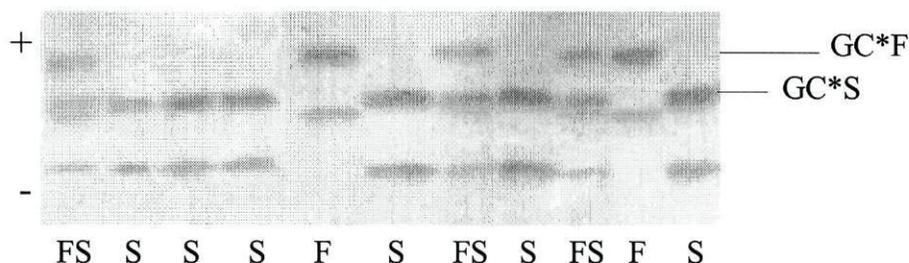


Figura 3.1.14: Fenótipos de GC determinados em amostras de plasma tratados com neuraminidase após focagem isoeléctrica.

Nota-se a existência de dois alelos codominantes, GC*F e GC*S, sendo o segundo mais acídico do que o primeiro.

3.2. - ANÁLISE FAMILIAR

A realização da análise familiar relativo ao conjunto de *loci* polimórficos estudados observa-se no estudo de 27 pares mãe/filho. Esta situação resulta da grande dificuldade existente na obtenção de informação sobre os machos.

Os resultados apresentam-se nas tabelas 3.2.1 a 3.2.6. não foi possível testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg devido ao reduzido tamanho da amostra, bem como ao facto de vários alelos ocorrerem em baixa frequência.

Refira-se que não foi detectado qualquer caso de exclusão mãe/filho.

Tabela 3.2.1: Sistema CAII. Distribuição fenotípica em 27 pares mãe/filho. Os valores esperados segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg estão indicados entre parêntesis.

Mãe \ Filho	Fenótipos			Total
	F	FS	S	
Fenótipos				
F	1 (1,1)	3 (2,1)	—	4 (3,2)
FS	2 (2,1)	10 (6,1)	5 (4,0)	17 (12,2)
S	—	1 (4,0)	5 (7,6)	6 (11,6)
Total	3	14	10	27

Tabela 3.2.2: Sistema NP. Distribuição fenotípica em 27 pares mãe/filho. Os valores esperados segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg estão indicados entre parêntesis.

Mãe \ Filho	Fenótipos		Total
	H	L	
Fenótipos			
H	10 (7,7)	4 (3,7)	14 (11,4)
L	5 (3,7)	8 (11,9)	13 (15,6)
Total	15	12	27

Tabela 3.2.3: Sistema MPI. Distribuição fenotípica em 26 pares mãe/filho. Os valores esperados segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg estão indicados entre parêntesis.

Mãe \ Filho	Fenótipos						Total
	A	AB	AC	B	BC	C	
A	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-	-	-	0 (0,0)
AB	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-	0 (0,0)
AC	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
B	-	0 (0,0)	-	24 (24,2)	1 (0,6)	-	25 (24,8)
BC	-	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,6)	0 (0,6)	0 (0,0)	1 (1,2)
C	-	-	0 (0,0)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	0	0	0	25	1	0	26

Tabela 3.2.4: Sistema ALB. Distribuição fenotípica em 27 pares mãe/filho. Os valores esperados segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg estão indicados entre parêntesis.

Mãe \ Filho	Fenótipos						Total
	A	AB	AV	B	BV	V	
A	24 (25,1)	2 (0,4)	0 (0,2)	-	-	-	26 (25,7)
AB	0 (0,4)	0 (0,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-	0 (0,8)
AG	1 (0,2)	0 (0,0)	0 (0,2)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,4)
B	-	0 (0,0)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	-	0 (0,0)
BG	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
G	-	-	0 (0,0)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	25	2	0	0	0	0	27

Tabela 3.2.5: Sistema TF. Distribuição fenotípica em 27 pares mãe/filho. Os valores esperados segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg estão indicados entre parêntesis.

Mãe \ Filho Fenótipos	Fenótipos										Total
	A	AD1	AD2	AE	D1	D1D2	D1E	D2	D2E	E	
A	6 (5,1)	1 (1,4)	4 (2,1)	1 (0,3)	-	-	-	-	-	-	12 (8,9)
AD1	1 (1,4)	2 (2,4)	0 (0,6)	0 (0,1)	0 (0,4)	0 (0,6)	0 (0,1)	-	-	-	3 (5,6)
AD2	2 (2,1)	0 (0,6)	5 (3,6)	0 (0,1)	-	0 (0,6)	-	2 (0,8)	0 (0,1)	-	9 (7,9)
AE	0 (0,3)	0 (0,1)	0 (0,1)	0 (0,6)	-	-	0 (0,1)	-	0 (0,1)	0 (0,0)	0 (1,3)
D1	-	0 (0,4)	-	-	1 (0,1)	1 (0,2)	0 (0,0)	-	-	-	2 (0,7)
D1D2	-	0 (0,6)	1 (0,6)	-	0 (0,2)	0 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,2)	0 (0,0)	-	1 (2,6)
D1E	-	0 (0,1)	-	0 (0,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,2)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,4)
D2	-	-	0 (0,8)	-	-	0 (0,2)	-	0 (0,3)	0 (0,1)	-	0 (1,4)
D2E	-	-	0 (0,1)	0 (0,1)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,1)	0 (0,2)	0 (0,0)	0 (0,5)
E	-	-	-	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	9	3	10	1	1	1	0	2	0	0	27

Tabela 3.2.6: Sistema GC. Distribuição fenotípica em 27 pares mãe/filho. Os valores esperados segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg estão indicados entre parêntesis.

Mãe \ Filho Fenótipos	Fenótipos			Total
	1	2-1	2	
1	17 (15,6)	2 (3,1)	-	19 (18,7)
2-1	5 (3,1)	2 (3,8)	0 (0,6)	7 (7,5)
2	-	1 (0,6)	0 (0,1)	1 (0,7)
Total	22	5	0	27

3.3. - ANÁLISE POPULACIONAL *LOCUS A LOCUS*

Neste capítulo faz-se a análise populacional dos *loci* polimórficos, e ainda dos *loci* PEPB e DIA, para os quais não se detectou variação na raça Barrosã. A sua inclusão justifica-se pelo facto de serem polimórficos noutras raças bovinas, ou em espécies aparentadas.

- PEPB

O *locus* PEPB revelou-se monomórfico nas três populações de bovinos de raça Barrosã e Minhota, tendo sido detectado um único produto génico, PEPB*2 (observado um indivíduo heterozigótico da raça Minhota). No entanto, este *locus* é referido como polimórfico em raças bovinas criadas no Brasil, onde se detectaram dois alelos codominantes, PEPB*1 e PEPB*2 (DEL LAMA *et al.*, 1992).

O alelo PEPB*2 está fixado nas raças de origem europeia, incluindo as estudadas neste trabalho, excepto nas raças italianas Marchigiana e Chianina, nas quais PEPB*1 apresenta frequências génicas entre 0,11 e 0,14 (tabela 3.3.1).

Tabela 3.3.1: Frequências génicas de PEPB em várias raças bovinas.

	N	Frequências génicas		Referência
		PEPB*1	PEPB*2	
Barrosã inscrita	141	-	1,00	Este trabalho
Barrosã não inscrita	153	-	1,00	“
Minhota	62	0,01 ± 0,003	0,99 ± 0,003	“
Blonde d'Aquitaine	13	-	1,00	DEL LAMA <i>et al.</i> (1992)
Charolesa	118	-	1,00	“
Chianina	83	0,14 ± 0,03	0,86 ± 0,03	“
Hereford	79	-	1,00	“
Frisia	125	-	1,00	“
Jersey	139	-	1,00	“
Limousine	24	-	1,00	“
Marchigiana	85	0,11 ± 0,02	0,89 ± 0,02	“
Simmental	75	-	1,00	“

- DIA

Pela análise da tabela 3.3.2 verifica-se não existir variação genética neste *locus* nas raças bovinas apresentadas, estando fixado o alelo DIA*S; os resultados obtidos estão de acordo com os já publicados por outros autores (GONZALEZ *et al.*, 1987; IGLESIAS, 1989). Por outro lado, nas populações de búfalos, ocorre um segundo alelo, DIA*F, com frequências entre 0,19 e 0,21.

Tabela 3.3.2: Frequências génicas de DIA em várias populações de raças bovinas e búfalos.

	N	Frequências génicas		Referência
		DIA*F	DIA*S	
Portugal				
Barrosã inscrita	141	-	1,00	Este trabalho
Barrosã não inscrita	153	-	1,00	“
Minhota	62	-	1,00	“
Espanha				
Cachena	71	-	1,00	IGLESIAS (1989)
Cadelana	60	-	1,00	“
Frieiresa	33	-	1,00	“
Limiana	39	-	1,00	“
Rubia Gallega	168	-	1,00	“
Vianesa	40	-	1,00	“
Sayaguesa (Zamora)	147	-	1,00	GONZALEZ <i>et al.</i> (1987)
Morucha (Salamanca)	101	-	1,00	“
Alistana Sanabresa	157	-	1,00	“
Blanca Cacerẽña	62	-	1,00	“
Cárdena Andaluza	25	-	1,00	“
Asturiana de los Valles	127	-	1,00	“
Asturiana de la Montaña	106	-	1,00	“
Bulgária				
Búfalo	122	0,19 ± 0,0	0,81 ± 0,0	MAKAVEEV (1984)*
Murrah (Búfalo)	51	0,21 ± 0,0	0,79 ± 0,0	“

*in IGLESIAS (1989)

- HB

Os resultados obtidos no estudo de HB permitiram distinguir dois fenótipos, definidos por dois alelos, HB*A e HB*B (tabela 3.3.3).

Tabela 3.3.3: Distribuição fenotípica de HB em populações das raças Barrosã e Minhota. Os valores esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg estão indicados entre parêntesis.

	N	Fenótipos		
		HB A	HB AB	HB B
Barrosã inscrita	141	141	-	-
Barrosã não inscrita	153	153	-	-
Minhota	62	56 (56,1)	6 (5,8)	0 (0,1)

As frequências génicas das raças estudadas, bem como outras já publicadas referentes a várias raças bovinas europeias e a duas espécies de búfalos, encontram-se discriminadas na tabela 3.3.4.

A elevada frequência do alelo HB*A nas raças estudadas (fixado na raça Barrosã) situam-nas juntamente com outras raças bovinas do centro e sul da Europa, onde este alelo ocorre com frequências entre 0,80-0,98 (VICENTE, 1978). Nas restantes raças europeias, HB*A ocorre com uma ampla margem de variação (0,38 - 1,00) apresentando-se, quase sempre, como o alelo mais frequente.

No caso dos búfalos, observa-se uma inversão nos valores das frequências génicas, sendo o alelo HB*B o mais frequente.

A presença de HB*B nos bovinos europeus, apesar de em baixa frequência, pode ser indicativo de uma origem a partir de raças asiáticas ou africanas, já que é nestes continentes que este alelo ocorre com frequência mais elevadas; as frequências génicas mais elevadas estão descritas no gado zebu da África (BRAEND, 1971; VICENTE, 1978).

Tabela 3.3.4: Frequências gênicas de HB em várias populações de raças bovinas e búfalos.

	N	Frequências gênicas		Referência
		HB*A	HB*B	
Portugal				
Barrosã inscrita	141	1,00	-	Este trabalho
Barrosã não inscrita	153	1,00	-	“
Minhota	62	0,95 ± 0,02	0,05 ± 0,02	“
Mertolenga	147	0,93 ± 0,02	0,07 ± 0,02	KIDD <i>et al.</i> (1980)
Alentejana	155	0,96 ± 0,01	0,04 ± 0,01	“
Mirandesa	107	0,99 ± 0,01	0,01 ± 0,01	NOBRE (s/ data)
Espanha				
Cachena	71	0,91 ± 0,02	0,09 ± 0,02	IGLESIAS (1989)
Caldelana	60	0,97 ± 0,02	0,03 ± 0,02	“
Frieiresa	33	0,95 ± 0,03	0,05 ± 0,03	“
Limiana	39	0,90 ± 0,03	0,10 ± 0,03	“
Rubia Gallega	168	0,93 ± 0,01	0,07 ± 0,01	“
Vianesa	40	0,98 ± 0,02	0,02 ± 0,02	“
Sayaguesa (Zamora)	147	0,83 ± 0,02	0,17 ± 0,02	GONZALEZ <i>et al.</i> (1987)
Morucha (Salamanca)	101	0,84 ± 0,03	0,16 ± 0,03	“
Alistana Sanabresa	157	0,99 ± 0,01	0,01 ± 0,01	“
Blanca Cacereña	62	0,71 ± 0,04	0,29 ± 0,04	“
Cárdena Andaluza	25	0,96 ± 0,03	0,04 ± 0,03	“
Asturiana de los Valles	127	0,91 ± 0,02	0,09 ± 0,02	“
Pirenaica	383	0,84 ± 0,01	0,16 ± 0,01	VICENTE (1978)
Tudanca	42	0,65 ± 0,05	0,35 ± 0,05	“
Morena del N. O.	25	1,00	-	“
Frisona	97	1,00	-	“
Asturiana de la Montaña	106	0,79 ± 0,03	0,21 ± 0,03	“
De Lidia	124	0,79 ± 0,03	0,21 ± 0,03	KIDD <i>et al.</i> (1980)
Retinta	164	0,81 ± 0,02	0,19 ± 0,02	“
Itália				
Chianina	264	0,96 ± 0,01	0,04 ± 0,01	CARENZI <i>et al.</i> (1970)*
Marchigiana	112	0,99 ± 0,01	0,01 ± 0,01	“
Bulgária				
Sofia Brown	173	0,89 ± 0,02	0,11 ± 0,02	MAKAVEEV (1970)*
Búfalo	77	0,09 ± 0,02	0,91 ± 0,02	MAKAVEEV (1984)*
Murrah (Búfalo)	51	0,15 ± 0,04	0,85 ± 0,04	“
G. Bretanha				
Jersey	467	0,38 ± 0,02	0,62 ± 0,02	LARSEN <i>et al.</i> (1974)*

*in IGLESIAS (1989)

A frequência obtida para HB*B na raça Minhota (0,05) aproxima-a das raças do sul da Europa, onde este alelo ocorre com uma frequência de aproximadamente 0,1. Por outro lado, a completa ausência de HB*B na raça Barrosã é um resultado interessante, mas para o qual não é possível fornecer, actualmente, uma explicação satisfatória.

- CAII

A distribuição dos fenótipos observados para o *locus* CAII apresenta-se na tabela 3.3.5.

Tabela 3.3.5: Distribuição fenotípica de CAII em populações das raças Barrosã e Minhota. Entre parêntesis indicam-se os valores esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

	N	Fenótipos			χ^2	g.l.	P
		CA F	CA FS	CA S			
Barrosã inscrita	141	17 (14,9)	58 (62,2)	66 (63,9)	0,651	1	0,420
Barrosã não inscrita	153	20 (20,0)	71 (71,0)	62 (62,0)	0,000	1	0,995
Minhota	62	3 (1,4)	13 (16,2)	46 (44,4)	-	-	-

Os valores do teste de χ^2 nas populações de raça Barrosã demonstram não haver desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, apesar de se observar um ligeiro excesso de homozigóticos F na população de raça Barrosã (inscrita). Para a raça Minhota não foi possível testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na tabela 3.3.6 apresentam-se as frequências génicas de CAII nas populações estudadas, bem como as publicadas por outros autores.

O *locus* CAII apresenta-se polimórfico na maior parte das populações bovinas europeias, sendo o alelo CAII*S o que ocorre com frequência mais elevada.

Tabela 3.3.6: Frequências gênicas de CAII em várias populações de raças bovinas e de búfalos.

	N	Frequências gênicas		Referência
		CA*S	CA*F	
Portugal				
Barrosã inscrita	141	0,68 ± 0,03	0,32 ± 0,03	Este trabalho
Barrosã não inscrita	153	0,64 ± 0,03	0,36 ± 0,03	“
Minhota	62	0,85 ± 0,03	0,15 ± 0,03	“
Mertolenga	147	0,85 ± 0,02	0,15 ± 0,02	KIDD <i>et al.</i> (1980)
Alentejana	155	0,91 ± 0,02	0,09 ± 0,02	“
Mirandesa	107	0,99 ± 0,01	0,01 ± 0,01	NOBRE (s/ data)
Espanha				
Cachena	71	0,77 ± 0,04	0,23 ± 0,04	IGLESIAS (1989)
Caldelana	60	0,96 ± 0,02	0,04 ± 0,02	“
Frieiresa	33	0,94 ± 0,03	0,06 ± 0,03	“
Limiana	39	0,83 ± 0,04	0,17 ± 0,04	“
Rubia Gallega	168	0,89 ± 0,02	0,11 ± 0,02	“
Vianesa	40	0,86 ± 0,04	0,14 ± 0,04	“
Sayaguesa	147	0,72 ± 0,03	0,28 ± 0,03	GONZALEZ <i>et al.</i> (1987)
Morucha	101	0,72 ± 0,03	0,28 ± 0,03	“
Alistana Sanabresa	157	0,92 ± 0,02	0,08 ± 0,02	“
Blanca Cacereña	62	0,67 ± 0,04	0,33 ± 0,04	“
Cárdena Andaluza	25	1,00		“
Asturiana de los Valles	127	0,87 ± 0,02	0,13 ± 0,02	“
Asturiana de la Montaña	106	0,77 ± 0,03	0,23 ± 0,03	“
Tudanca	42	0,76 ± 0,05	0,24 ± 0,05	VICENTE (1978)
Morena del N.O.	25	0,92 ± 0,04	0,08 ± 0,04	“
De Lidia	124	0,61 ± 0,03	0,39 ± 0,03	KIDD <i>et al.</i> (1980)
Retinta	164	0,65 ± 0,03	0,35 ± 0,03	“
Bulgária				
Búfalo	263	0,07 ± 0,01	0,93 ± 0,01	MAKAVEEV (1984)*
Murran (Búfalo)	51	0,20 ± 0,04	0,80 ± 0,04	“
Alemanha				
Frisia	550	0,83 ± 0,01	0,17 ± 0,01	THINNES <i>et al.</i> (1976)*
Suíça				
Simmental	1039	0,79 ± 0,01	0,21 ± 0,01	KÄSTLI <i>et al.</i> (1980)*
Castanha Suíça	546	0,87 ± 0,01	0,13 ± 0,01	“
Friburg	223	0,84 ± 0,02	0,16 ± 0,02	“

*in IGLESIAS (1989)

As frequências alélicas de CAII*S e CAII*F nas raças Cachena espanhola e Barrosã portuguesa são idênticas, o que poderá eventualmente indicar estar-se em presença de uma só raça com designações diferentes nos dois países. Esta hipótese é reforçada pelo facto de não haver diferenças significativas entre dados morfométricos obtidos nas duas raças (LEAL, 1995).

Nos búfalos observa-se, mais uma vez, uma inversão nas frequências dos dois alelos do *locus* CAII em relação aos bovinos, sendo CA*F o mais frequente, com valores situados entre 0,80 e 0,93.

- NP

Pela análise das tabelas 3.3.7 e 3.3.8 verifica-se a presença dos dois alelos descritos neste *locus* nas várias raças bovinas, sendo NP*L o mais frequente nas raças europeias (0,52 e 0,99). Observa-se uma grande similaridade entre os valores das frequências génicas, o que não permite diferenciar as raças estudadas neste trabalho das restantes.

Tabela 3.3.7: Distribuição fenotípica de NP em populações das raças Barrosã e Minhota.

	N	Fenótipos	
		NP H	NPL
Barrosã inscrita	141	69	72
Barrosã não inscrita	153	55	98
Minhota	62	19	43

Tabela 3.3.8: Frequências gênicas para NP em várias populações e raças bovinas.

	N	Frequências gênicas		Referência
		NP*H	NP*L	
Portugal				
Barrosã inscrita	141	0,29 ± 0,03	0,71 ± 0,03	Este trabalho
Barrosã não inscrita	153	0,20 ± 0,02	0,80 ± 0,02	“
Minhota	62	0,17 ± 0,04	0,83 ± 0,04	“
Espanha				
Cachena	71	0,20 ± 0,03	0,80 ± 0,03	IGLESIAS (1989)
Caldelana	60	0,13 ± 0,03	0,87 ± 0,03	“
Frieiresa	33	0,11 ± 0,04	0,89 ± 0,04	“
Limiana	39	0,08 ± 0,03	0,92 ± 0,03	“
Rubia Gallega	168	0,15 ± 0,02	0,85 ± 0,02	“
Vianesa	40	0,13 ± 0,04	0,87 ± 0,04	“
Sayaguesa	147	0,14 ± 0,02	0,86 ± 0,02	GONZALEZ <i>et al.</i> (1987)
Morucha	101	0,20 ± 0,03	0,80 ± 0,03	“
Alistana Sanabresa	157	0,01 ± 0,01	0,99 ± 0,01	“
Blanca Cacerena	62	0,48 ± 0,05	0,52 ± 0,05	“
Cárdena Andaluza	25	0,04 ± 0,03	0,96 ± 0,03	“
Asturiana de los Valles	127	0,28 ± 0,03	0,72 ± 0,03	“
Asturiana de la Montaña	106	0,26 ± 0,03	0,74 ± 0,03	“
Bélgica				
Charolesa	130	0,26 ± 0,03	0,74 ± 0,03	ANSAY & HANSET (1972)*
Frisia	91	0,06 ± 0,02	0,94 ± 0,02	“

*in IGLESIAS (1989)

- **MPI**

A distribuição dos fenótipos observados para o *locus* MPI apresenta-se na tabela 3.3.9.

Das três populações estudadas apenas a raça Minhota apresenta valores observados próximos dos valores esperados, segundo o formalismo de Hardy-Weinberg. Por outro lado, apesar de não ter sido possível testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg nas restantes populações, a aparente diferença entre valores observados e esperados poderá dever-se a um excesso de indivíduos homocigóticos para MPI*C. Este resultado poderá estar relacionado com o processo de amostragem ou com outras causas, como o acasalamento entre indivíduos

aparentados, a existência de sub-populações de tamanho pequeno ou ainda a um reduzido número de machos reprodutores.

Tabela 3.3.9: Distribuição fenotípica de MPI em populações das raças Barrosã e Minhota. Entre parêntesis indicam-se os valores esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

	N	Fenótipos					
		MPI A	MPI AB	MPI AC	MPI B	MPI BC	MPI C
Barrosã inscrita	138	-	-	-	131 (130,1)	6 (7,8)	1 (0,1)
Barrosã não inscrita	152	-	-	-	147 (146,0)	4 (5,9)	1 (0,1)
Minhota	61	0 (0,0)	3 (2,9)	0 (0,1)	56 (56,1)	2 (1,9)	0 (0,0)

A análise da tabela 3.3.10 permite verificar que MPI*B e MPI*C ocorrem nas duas raças de bovinos estudadas, sendo MPI*B o alelo mais comum nas três populações. A ocorrência de MPI*A na raça Minhota contraria o descrito por ANSAY (1973), quando afirma a exclusividade do fenótipo AB na raça Charolesa.

Tabela 3.3.10: Frequências gênicas de MPI nas populações estudadas.

	N	Frequências gênicas		
		MPI*A	MPI*B	MPI*C
Barrosã inscrita	138	-	0,97 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Barrosã não inscrita	152	-	0,98 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Minhota	61	0,02 ± 0,01	0,96 ± 0,02	0,02 ± 0,01

A informação disponível sobre este marcador em anteriores trabalhos de análise genética em bovinos é quase inexistente. Tal poderá dever-se às dificuldades de visualização encontradas na sua fenotipagem por electroforese convencional. A detecção de MPI está descrita em tecidos musculares e em leucócitos; neste trabalho utilizaram-se eritrócitos para o estudo de variação genética desta proteína, mas é provável que a sua expressão ocorra apenas na fracção leucocitária (não separada), o que explicaria precisamente a sua fraca actividade.

- ALB

A distribuição dos fenótipos observados para o *locus* ALB apresenta-se na tabela 3.3.11.

Apesar de não ter sido possível testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, todas as amostras estudadas mostram desvios muito reduzidos entre valores observados e esperados.

Tabela 3.3.11: Distribuição fenotípica de ALB em populações das raças Barrosã e Minhota. Entre parêntesis indicam-se os valores esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

	N	Fenótipos					
		ALB A	ALB AB	ALB B	ALB BV	ALB AV	ALB V
Barrosã inscrita	142	137 (137,0)	3 (3,0)	- (0,0)	- (0,0)	2 (2,0)	- (0,0)
Barrosã não inscrita	153	145 (144,0)	5 (6,8)	1 (0,1)	- (0,1)	2 (2,0)	- (0,0)
Minhota	62	59 (59,0)	-	-	-	3 (3,0)	- (0,0)

Na tabela 3.3.12 estão discriminadas as frequências génicas estimadas para as populações estudadas, bem como as de outras populações de bovinos da Europa e de búfalos da Bulgária.

Verifica-se que ALB*A é o alelo mais comum, encontrando-se aparentemente fixado em várias raças bovinas de origem europeia.

Como já referido para HB, a presença de ALB*B nas raças europeias parece relacionar-se com a sua localização geográfica, verificando-se que, de uma maneira geral, a sua frequência aumenta à medida que nos aproximamos do sul da Europa e de África; é no gado zebu africano que este alelo ocorre com frequências mais elevadas, variando entre 0,30 e 0,60 (VICENTE, 1978). Assim, a presença de ALB*B no gado europeu poderá indicar a passagem, pela Europa, de bovinos oriundos de África (CECCHINI & NIJS, 1986). É de notar que apenas a raça Minhota e algumas das restantes raças da Península Ibérica não apresentam ALB*B.

Tabela 3.3.12: Frequências génicas de ALB em várias populações de raças bovinas e em búfalos.

	N	Frequências génicas			Referência
		ALB*A (F)	ALB*B (S)	ALB*V	
Portugal					
Barrosã inscrita	142	0,98 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	Este trabalho
Barrosã não inscrita	153	0,97 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	“
Minhota	62	0,98 ± 0,01	-	0,02 ± 0,01	“
Mertolenga	147	0,84 ± 0,02	0,16 ± 0,02	-	KIDD <i>et al.</i> (1980)
Alentejana	155	0,94 ± 0,01	0,06 ± 0,01	-	“
Mirandesa	106	0,94 ± 0,02	0,06 ± 0,02	-	NOBRE (s/ data)
Espanha					
Cachena	71	0,98 ± 0,01	0,02 ± 0,01	-	IGLESIAS (1989)
Caldelana	60	0,98 ± 0,01	0,02 ± 0,01	-	“
Frieiresa	33	1,00	-	-	“
Limiana	39	0,97 ± 0,02	0,03 ± 0,02	-	“
Rubia Gallega	201	0,99 ± 0,00	0,01 ± 0,00	-	“
Vianesa	40	0,93 ± 0,03	0,07 ± 0,03	-	“
Sayaguesa	147	0,96 ± 0,01	0,04 ± 0,01	-	GONZALEZ <i>et al.</i> (1987)
Morucha	101	0,89 ± 0,02	0,11 ± 0,02	-	“
Alistana Sanabresa	157	0,90 ± 0,02	0,10 ± 0,02	-	“
Blanca Cacereña	62	0,56 ± 0,05	0,44 ± 0,05	-	“
Cárdena Andaluza	25	1,00	-	-	“
Asturiana de los Valles	127	0,99 ± 0,01	0,01 ± 0,01	-	“
Asturiana de la Montaña	106	0,99 ± 0,01	0,01 ± 0,01	-	“
Pirenaica	265	0,92 ± 0,01	0,08 ± 0,01	-	VICENTE (1978)
Tudanca	42	1,00	-	-	“
Morena del N. O.	25	0,92 ± 0,04	0,08 ± 0,04	-	“
Frisona	97	1,00	-	-	“
De Lidia	124	1,00	-	-	KIDD <i>et al.</i> (1980)
Retinta	164	0,97 ± 0,01	0,03 ± 0,01	-	“
Itália					
Chinina	264	0,89 ± 0,01	0,11 ± 0,01	-	CARENZI <i>et al.</i> (1970)*
Marchigiana	124	0,74 ± 0,03	0,26 ± 0,03	-	“
Bélgica					
Pied vermelha Este-Flandern	503	1,00	-	-	BOUQUET & VAN de WEGHE (1972)*
Vermelha Oeste-Flandern	155	1,00	-	-	“
Pied preta	174	1,00	-	-	“
Pied vermelha-Campine	265	1,00	-	-	“

*in IGLESIAS (1989)

(Continua)

Tabela 3.3.12: Frequências gênicas de ALB em várias populações de raças bovinas e de búfalos (continuação).

	Frequências gênicas			Referência	
	N	ALB*A (F)	ALB*B (S)		ALB*V
Bulgária					
Sofia Brow	170	0,96 ± 0,01	0,04 ± 0,01	-	MAKAVEEV (1970)*
Búfalo	225	0,47 ± 0,02	0,53 ± 0,02	-	MAKAVEEV (1984)*
Murrah (Búfalo)	76	0,12 ± 0,03	0,88 ± 0,03	-	“
G. Bretanha					
Charolesa	99	0,84 ± 0,03	0,16 ± 0,03	-	SPOONER & OLIVER (1969)*
Frisia	1422	1,00	-	-	“
Hereford	215	0,99 ± 0,01	0,01 ± 0,01	-	“
Jersey	217	1,00	-	-	“

*in IGLESIAS (1989)

Neste trabalho descreve-se também o alelo ALB*V, com uma frequência de 0,01 e 0,02 nas raças Barrosã e Minhota, respectivamente. Este alelo não se encontra descrito em qualquer raça europeia, podendo a sua detecção estar relacionada com a capacidade resolvente da técnica de focagem isoelectrica utilizada na separação de ALB.

- TF

A transferrina é provavelmente o mais informativo dos sistemas polimórficos estudados em virtude do número de alelos que apresenta.

A distribuição dos fenótipos observados para o *locus* TF apresenta-se na tabela 3.3.13. É possível verificar a existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações estudadas.

Da análise das frequências gênicas expressas na tabela 3.3.14 verifica-se que este *locus* apresenta quatro produtos gênicos na maioria das raças europeias, sendo os alelos TF*A e TF*D (incluindo os subtipos TF*D1 e TF*D2) os que apresentam frequências mais elevadas (0,27 a 0,92 para o alelo TF*A, e 0,26 a 0,73 para o alelo TF*D).

Observa-se, também, que a frequência de TF*D2 nas raças estudadas é mais elevada do que a de TF*D1, como ocorre na maioria das raças ibéricas.

No que se refere a TF*E, verifica-se que a sua frequência é relativamente baixa nas raças europeias (0,01 e 0,22), e está mesmo ausente em quase todas as raças da região da Galiza (com exceção da raça Cachena espanhola e Rubia Gallega) e na raça Minhota. Note-se a grande semelhança entre os valores de frequências génicas deste alelo na raça Cachena espanhola (0,05) e nas populações de raça Barrosã (0,04 e 0,03), o que mais uma vez sugere uma grande proximidade entre as duas. Apesar de ocorrer em baixa frequência nos bovinos europeus, a presença de TF*E nestas raças pode indicar uma proveniência asiática ou africana, pois é nestes continentes que aquele alelo é mais comum (BRAEND, 1971).

Tabela 3.3.13: Distribuição fenotípica de TF em populações das raças Barrosã e Minhota. Entre parêntesis indicam-se os valores esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

	Fenótipos													χ^2	g.l.	P
	N	TFA	TFADI	TFAD2	TFAE	TFDI	TFDID2	TFDIE	TFD2	TFD2E	TFE	χ^2				
Barrosã inscrita	141	45 (47,6)	30 (26,9)	41 (35,0)	3 (7,0)	4* (3,7)	6 (9,8)	2* (2,0)	5 (6,3)	3* (2,6)	2* (0,3)	6,348		3	0,10-0,05	
Barrosã não inscrita	153	54 (48,8)	23 (26,1)	36 (43,7)	6 (5,7)	3* (3,4)	16 (11,6)	1* (1,5)	11 (9,6)	3* (2,5)	0* (0,2)	4,200		3	0,25-0,10	
Minhota	62	7* (7,7)	7 (8,6)	23 (20,0)	-	2* (2,2)	13 (10,9)	-	10 (12,5)	-	-	1,720		1	0,25-0,10	

* classes agrupadas para o cálculo de χ^2

Tabela 3.3.14: Freqüências gênicas de TF em várias populações de raças bovinas.

Freqüências gênicas								Referência
	N	TF*A	TF*DI	TF*D2	TF*E	TF*R		
Portugal								
Barrosã inscrita	141	0,58 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,05 ± 0,01	-	-	Este trabalho
Barrosã não inscrita	153	0,57 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,03 ± 0,01	-	-	"
Minhota	62	0,36 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,45 ± 0,05	-	-	-	"
Mertolenga	147	0,44 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,11 ± 0,02	-	-	KIDD <i>et al.</i> (1980)
Alentejana	155	0,30 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,19 ± 0,02	-	-	"
Mirandesa	106	0,60 ± 0,05	0,08 ± 0,03	0,32 ± 0,05	-	-	-	"
Espanha								
Cachena	71	0,48 ± 0,04	-----0,47 ± 0,04-----		0,05 ± 0,02	-	-	IGLESIAS (1989)
Caldelana	60	0,59 ± 0,05	-----0,41 ± 0,05-----		-	-	-	"
Frieira	33	0,45 ± 0,06	-----0,55 ± 0,06-----		-	-	-	"
Limiana	39	0,64 ± 0,05	-----0,36 ± 0,05-----		-	-	-	"
Rubia Gallega	201	0,45 ± 0,03	-----0,52 ± 0,03-----		0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	-	"
Vianesa	40	0,66 ± 0,05	-----0,34 ± 0,05-----		-	-	-	"
Sayaguesa	147	0,54 ± 0,03	-----0,44 ± 0,03-----		0,02 ± 0,01	-	-	GONZALEZ <i>et al.</i> (1987)
Morucha	101	0,41 ± 0,04	-----0,51 ± 0,04-----		0,08 ± 0,02	-	-	"
Alistana Sanabresa	157	0,54 ± 0,03	-----0,45 ± 0,03-----		0,01 ± 0,01	-	-	"
Blanca Cacerêña	62	0,92 ± 0,02	-----0,08 ± 0,02-----		-	-	-	"
Cárdena Andaluza	25	0,68 ± 0,07	0,32 ± 0,07	-	-	-	-	VICENTE (1978)
Asturiana de los Valles	127	0,46 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,03 ± 0,01	-	-	-	"
Asturiana de la Montaña	106	0,27 ± 0,03	0,72 ± 0,03	0,01 ± 0,01	-	-	-	"
Pirenaica	381	0,53 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,01 ± 0,00	-	-	"
Tudanca	42	0,32 ± 0,05	0,10 ± 0,03	0,57 ± 0,05	0,01 ± 0,01	-	-	KIDD <i>et al.</i> (1980)
Morena del N. O.	25	0,50 ± 0,07	0,08 ± 0,04	0,42 ± 0,07	-	-	-	"

Tabela 3.3.14: Freqüências gênicas da TF em várias populações de raças bovinas (continuação)

	Freqüências gênicas						Referência
	N	TF*A	TF*DI	TF*D2	TF*E	TF*R	
Frisona	97	0,42 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,05 ± 0,02	-	KIDD <i>et al.</i> (1980)
De Lidia	124	0,41 ± 0,03	-	0,37 ± 0,03	0,22 ± 0,03	-	“
Retinto	164	0,61 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,13 ± 0,02	-	“
Itália							
Chianina	259	0,33 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,02 ± 0,01	-	CARENZI <i>et al.</i> (1970)*
Marchigiana	125	0,32 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,34 ± 0,03	0,14 ± 0,02	-	“
Bulgária							
Sofia Brown	173	0,30 ± 0,03	-----0,67 ± 0,03-----		0,03 ± 0,01	-	MAKAVEEV (1970)*
Grey Iskar	265	0,38 ± 0,02	-----0,47 ± 0,02-----		0,15 ± 0,02	-	“
Alemanha							
Schwarzbunte	1975	0,50 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,05 ± 0,00	-	GELDERMAN (1972)*
Rotbunte	1014	0,51 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,05 ± 0,01	-	“

*in IGLESIAS (1989)

- GC

A distribuição dos fenótipos observados para o *locus* GC apresenta-se na tabela 3.3.15. A sua análise permite verificar a existência de diferenças entre os valores observados e esperados para raça Barrosã (população inscrita no Livro Genealógico). Este desvio ao equilíbrio de Hardy-Weinberg deve-se à existência de um excesso de homozigóticos, sugerindo, assim, a ocorrência de uma possível subestruturação na população.

Nas restantes amostras estudadas não foi possível aplicar o teste de χ^2 . Contudo, a diferença entre valores observados e esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg é praticamente inexistente na população Barrosã não inscrita, e pouco acentuada na raça Minhota.

Tabela 3.3.15: Distribuição fenotípica de GC em populações das raças Barrosã e Minhota. Entre parêntesis indicam-se os valores esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

	N	Fenótipos			χ^2	g.l.	P
		GC S	GC FS	GC F			
Barrosã inscrita	142	98 (94,5)	35 (41,9)	8 (4,5)	3,913	1	0,048
Barrosã não inscrita	153	109 (108,7)	40 (40,6)	4 (3,7)	-	-	-
Minhota	62	54 (51,4)	5 (10,1)	3 (0,4)	-	-	-

A distribuição das frequências génicas apresentada na tabela 3.3.16 mostra que GC*S é o alelo mais comum nas raças europeias (com excepção da raça Frisia da Suécia). As raças estudadas neste trabalho têm frequências alélicas para este *locus* que as aproximam das raças espanholas.

Tabela 3.3.16: Frequências génicas de GC em várias populações de raças bovinas.

	N	Frequências génicas			Referência
		GC*F (ou A)	GC*S (ou B)	GC*C	
Portugal					
Barrosã inscrita	141	0,18 ± 0,023	0,82 ± 0,02	-	Este trabalho
Barrosã não inscrita	153	0,16 ± 0,02	0,84 ± 0,02	-	“
Minhota	62	0,09 ± 0,03	0,91 ± 0,03	-	“
Alentejana		0,28 ± 0,04	0,72 ± 0,04	-	CUNHA (1994)
Mirandesa	97	0,20 ± 0,03	0,80 ± 0,03	-	NOBRE (s/ data)
Espanha					
De Lidia	1306	0,08 ± 0,01	0,92 ± 0,01	-	PIEDRAFITA <i>et al.</i> (1984)
Frisona	124	0,15 ± 0,02	0,85 ± 0,02	-	“
Bélgica					
Branca e azul	2323	0,31 ± 0,01	0,69 ± 0,01	-	VAN de WEGHE <i>et al.</i> (1982)*
Flemish vermelha	431	0,16 ± 0,01	0,84 ± 0,01	-	“
Campine vermelha e branca	299	0,12 ± 0,01	0,88 ± 0,01	-	“
Preta e branca	299	0,19 ± 0,02	0,81 ± 0,02	-	“
Flemish branca e vermelha	140	0,06 ± 0,01	0,65 ± 0,03	0,29 ± 0,03	“
Suécia					
Vermelha e Branca	1030	0,39 ± 0,01	0,61 ± 0,01	-	GAHNE (1963)*
Frisia	273	0,79 ± 0,02	0,21 ± 0,02	-	“

in PIEDRAFITA *et al.* (1984).

3.4. - ANÁLISE POPULACIONAL CONJUNTA

3.4.1. - Diversidade genética na raça Barrosã

As estimativas da variabilidade genética das populações de bovinos das raças Barrosã e Minhota efectuaram-se considerando apenas 6 *loci* polimórficos: HB, CAII, MPI, ALB, TF e GC.

Tabela 3.4.1: Estimativa da variabilidade genética (6 *loci*) através dos valores de heterozigotia observada (Ho) e esperada (He) nas populações estudadas.

Raças <i>Locus</i>	Barrosã inscrita		Barrosã não inscrita		Minhota	
	Ho	He	Ho	He	Ho	He
HB	0,000	0,000	0,000	0,000	0,097	0,093
CAII	0,411	0,441	0,464	0,464	0,210	0,262
MPI	0,043	0,056	0,026	0,039	0,082	0,080
ALB	0,035	0,035	0,046	0,058	0,048	0,048
TF	0,603	0,590	0,556	0,595	0,694	0,638
GC	0,248	0,297	0,261	0,265	0,081	0,163

Os resultados expressos na tabela 3.4.1 mostram em geral a ausência de diferenças significativas entre os valores de heterozigotia observada (Ho) e heterozigotia esperada (He) para os *loci* estudados. Deve, contudo, notar-se que na raça Minhota, e quanto ao *locus* GC, o valor de He é aproximadamente o dobro da Ho. Nos restantes *loci*, o ligeiro desvio observado entre Ho e He, sugere, em geral, um défice de heterozigóticos.

Nas duas populações de raça Barrosã, os sistemas TF e CAII são os que apresentam valores de heterozigotia mais elevados. Pelo contrário, os *loci* MPI e ALB mostram valores de heterozigotia baixos, possivelmente devido ao excesso de homozigóticos (MPI B e ALB A) detectados nas três populações.

Na tabela 3.4.2 apresentam-se os valores do número médio de alelos por *locus* (n_a), percentagem de *loci* polimórficos (P), heterozigotia média observada (Ho) e heterozigotia esperada (He), nas populações de bovinos estudados. Estes valores devem ser interpretados

tendo em conta o facto de os 6 *loci* investigados serem polimórficos em pelo menos uma população.

Tabela 3.4.2: Variabilidade genética detectada em três populações de bovinos através da análise de 6 *loci* polimórficos. N - efectivo médio estudado por *locus*; n_a - número médio de alelos por *locus*; P - proporção de *loci* polimórficos; Ho - heterozigotia observada; He - heterozigotia média esperada. Entre parêntesis indicam-se os valores do desvio padrão.

Raça/ População	N	n_a	P	Ho	He
Barrosã inscrita	140,7	2,33	83,3	0,223	0,237
	(0,6)	(0,42)		(0,100)	(0,100)
Barrosã não inscrita	152,8	2,33	83,3	0,226	0,237
	(0,2)	(0,42)		(0,098)	(0,101)
Minhota	61,8	2,33	100,0	0,202	0,214
	(0,2)	(0,21)		(0,101)	(0,090)

A sua análise permite verificar, em primeiro lugar, a ocorrência de uma grande semelhança entre os valores de H nas duas raças estudadas, Barrosã e Minhota, revelando a existência de uma variabilidade genética idêntica nas três populações de bovinos. Observa-se, também, que os valores de heterozigotia média observada (Ho) não diferem significativamente dos valores de heterozigotia esperados (He) nas três populações, sendo o valor mais elevado o encontrado na população de raça Barrosã (23,7%).

Os elevados valores de P (83,3% na raça Barrosã e 100% na raça Minhota) resultam do facto de apenas se terem utilizado *loci* polimórficos nesta análise, e o número médio de alelos por *locus* (n_a), é igual nas três populações estudadas (2,33).

A tabela 3.4.3 apresenta estimativas de F_{IS} , F_{IT} , e F_{ST} para as três populações de bovinos. Os valores de F_{IS} indicam a existência de uma acentuada deficiência de heterozigóticos nos *loci* MPI e GC. Nos restantes *loci* verifica-se, por um lado, a tendência para um excesso de heterozigóticos nos *loci* HB e TF (com valores de -0,051 e -0,021, respectivamente) e, por outro lado, para uma ligeira deficiência de heterozigóticos nos *loci* CAII e ALB (com valores de 0,066 e 0,072, respectivamente). A média ponderada de F_{IS} mostra uma deficiência de heterozigóticos de 4,8 %.

Tabela 3.4.3: Distribuição relativa da diversidade genética nas três populações de bovinos: H_S -heterozigotia intrapopulacional; H_T -heterozigotia total; Valores das estatísticas F para 6 *loci* analisados.

<i>Locus</i>	H_S	H_T	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
HB	0,030	0,031	-0,051	-0,016	0,033
CAII	0,387	0,404	0,066	0,104	0,041
MPI	0,058	0,059	0,130	0,133	0,004
ALB	0,046	0,047	0,072	0,075	0,004
TF	0,605	0,627	-0,021	0,015	0,036
GC	0,241	0,244	0,183	0,193	0,012
Média	0,228	0,235	0,048	0,078	0,031

As estimativas de F_{ST} indicam a existência de um baixo grau de diferenciação populacional nos bovinos estudados. Os valores de F_{ST} para os 6 *loci* analisados podem considerar-se baixos (entre 0,004 e 0,041), apresentando uma média ponderada de 0,031. Assim, só uma pequena parte da diversidade genética (3,1%) se deve a diferenças entre as populações, sendo muito maior a diversidade dentro de cada população do que entre as populações.

Os baixos valores de F_{ST} encontrados para os *loci* MPI e ALB resultam de frequências elevadas de MPI*B e ALB*A, respectivamente, e traduzem uma grande homogeneidade entre as raças bovinas estudadas, não se detectando subestruturação populacional.

3.4.2. - Comparação com outras raças ibéricas

Tendo em conta o pequeno número de *loci* comuns a este e a outros estudos, estimaram-se diferentes valores de heterozigotia média consoante o número de *loci* de que se dispunha. Na tabela 3.4.4 e 3.4.5 apresentam-se valores de heterozigotia média para as diferentes raças obtidos a partir de quatro (H^+) e cinco *loci* (H^{++}), respectivamente, bem como os valores de n_a , P e os respectivos desvios padrão em várias raças de bovinos ibéricos.

A diversidade genética do bovino Barrosã, avaliada pela taxa média de heterozigotia (0,281-0,272 e 0,249-0,260, para 5 e 4 *loci* respectivamente), parece ocupar uma posição

intermédia no seio das raças ibéricas. Também o grau de variabilidade genética nos bovinos, avaliado por parâmetros como o número médio de alelos por *locus* e a proporção de *loci* polimórficos (P), demonstra que as raças estudadas neste trabalho ocupam uma posição intermédia quando comparadas com outras raças ibéricas.

A análise das tabelas 3.4.4 e 3.4.5 mostra que todas as medidas de diversidade genética (H, P e d_n) apresentam valores idênticos. Esta semelhança permite supôr que o processo de domesticação, iniciado há menos de 10.000 anos, não levou a uma grande diferenciação genética entre as raças, pelo menos relativamente aos marcadores genéticos estudados neste trabalho. Desta forma, verifica-se que as principais diferenças entre as raças resultam de pequenas alterações das suas frequências génicas, provavelmente causadas pelo baixo número de animais destinados à reprodução (mais marcado nos machos) e pelos cruzamentos dirigidos, em cada raça.

Por outro lado, este baixo nível de diferenciação genética deverá estar, também, associado ao facto de na origem das raças bovinas ibéricas se encontrar um único processo de domesticação, seguido, provavelmente, de um processo de expansão populacional bastante recente, do Próximo Oriente até à Europa. Adicionalmente, estima-se que a diferenciação dos bovinos em raças autóctones só terá ocorrido nos últimos 300 anos (LOFTUS *et al.*, 1994).

Neste contexto, os eventuais estrangulamentos do efectivo populacional (“bottleneck”) e efeitos de fundador ocorridos durante o período inicial da domesticação do gado bovino e capazes de afectar de forma muito diferente vários núcleos populacionais, não são detectados na Península Ibérica.

Tabela 3.4.4: Variabilidade genética em várias raças de bovinos através da análise de 4 *loci* polimórficos. N - efectivo médio estudado por *locus*; n_a - número médio de alelos por *locus*; P - proporção de *loci* polimórficos; H^+ - heterozigotia média esperada. Entre parêntesis indicam-se os valores do desvio padrão.

Raça/ População	N	n_a	P	H^+
Portugal				
Barrosã inscrita	141,0 (0,0)	2,3 (0,5)	75,0	0,249 (0,135)
Barrosã não inscrita	153,0 (0,0)	2,3 (0,5)	75,5	0,260 (0,135)
Minhota	62,0 (0,0)	2,0 (0,0)	100,0	0,216 (0,094)
Mertolenga	147,0 (0,0)	2,3 (0,3)	100,0	0,315 (0,097)
Alentejana	155,0 (0,0)	2,3 (0,3)	100,0	0,239 (0,123)
Mirandesa	106,5 (0,3)	2,0 (0,0)	100,0	0,159 (0,110)
Espanha				
Cachena	71,0 (0,0)	2,3 (0,3)	100,0	0,279 (0,111)
Caldelana	60,0 (0,0)	2,0 (0,0)	100,0	0,166 (0,107)
Frieiresa	33,0 (0,0)	1,8 (0,3)	75,0	0,177 (0,112)
Limiana	39,0 (0,0)	2,0 (0,0)	100,0	0,246 (0,087)
Rubia Gallega	184,5 (9,5)	2,5 (0,5)	100,0	0,215 (0,110)
Vianesa	40,0 (0,0)	2,0 (0,0)	100,0	0,221 (0,087)
Sayaguesa	147,0 (0,0)	2,3 (0,3)	100,0	0,320 (0,094)
Morucha	101,0 (0,0)	2,3 (0,3)	100,0	0,361 (0,084)
Alistana Sanabresa	157,0 (0,0)	2,3 (0,3)	100,0	0,213 (0,104)
Blanca Cacereña	61,8 (0,3)	2,0 (0,0)	100,0	0,377 (0,078)
Cárdena Andaluza	25,0 (0,0)	1,5 (0,3)	50,0	0,131 (0,106)
Asturiana de los Valles	126,5 (0,5)	2,3 (0,3)	100,0	0,237 (0,107)
Asturiana de la Montaña	106,0 (0,0)	2,3 (0,3)	100,0	0,280 (0,088)
Tudanca	42,0 (0,0)	2,0 (0,4)	75,0	0,321 (0,109)
Morena del N. O.	25,0 (0,0)	1,8 (0,3)	75,0	0,203 (0,108)
Frisona	654,0 (0,0)	1,8 (0,5)	50,0	0,203 (0,130)
De Lidia	124,0 (0,0)	2,3 (0,3)	100,0	0,367 (0,135)
Retinta	164,0 (0,0)	2,3 (0,3)	100,0	0,338 (0,107)

Tabela 3.4.5: Variabilidade genética em várias raças de bovinos através da análise de 5 *loci* polimórficos. N - efectivo médio estudado por *locus*; n_a - número médio de alelos por *locus*; P - proporção de *loci* polimórficos; H^{++} - heterozigotia média esperada. Entre parêntesis indicam-se os valores do desvio padrão.

Raça/ População	N	n_a	P*	H^{++}
Portugal				
Barrosã inscrita	141,0 (0,0)	2,2 (0,4)	80,0	0,281 (0,109)
Barrosã não inscrita	153,0 (0,0)	2,2 (0,4)	80,0	0,272 (0,105)
Mínhota	62,0 (0,0)	2,0 (0,0)	100,0	0,229 (0,074)
Espanha				
Cachena	71,0 (0,0)	2,2 (0,2)	100,0	0,289 (0,087)
Caldelana	60,0 (0,0)	2,0 (0,0)	100,0	0,180 (0,084)
Frieiresa	33,0 (0,0)	1,8 (0,2)	80,0	0,180 (0,087)
Limiana	39,0 (0,0)	2,0 (0,0)	100,0	0,226 (0,071)
Rubia Gallega	181,2 (8,1)	2,4 (0,4)	100,0	0,223 (0,086)
Vianesa	40,0 (0,0)	2,0 (0,0)	100,0	0,374 (0,168)
Sayaguesa	147,0 (0,0)	2,2 (0,2)	100,0	0,305 (0,074)
Morucha	101,0 (0,0)	2,2 (0,2)	100,0	0,353 (0,066)
Alistana Sanabresa	157,0 (0,0)	2,2 (0,2)	100,0	0,174 (0,089)
Blanca Cacereña	61,6 (0,2)	2,0 (0,0)	100,0	0,402 (0,065)
Cárdena Andaluza	25,0 (0,0)	1,6 (0,2)	60,0	0,120 (0,083)
Asturiana de los Valles	126,6 (0,4)	2,2 (0,2)	100,0	0,270 (0,089)
Asturiana de la Montaña	106,0 (0,0)	2,2 (0,2)	100,0	0,301 (0,072)

3.4.3. - Diferenciação genética

Nas tabelas 3.4.6 e 3.4.7 apresentam-se as distâncias genéticas de Nei (NEI, 1978) calculadas para 23 (4 *loci*: HB, CAII, ALB e TF) e 15 (5 *loci*: HB, CAII, ALB, TF e NP) raças bovinas ibéricas, respectivamente. Da sua análise ressalta o facto de aqueles valores serem, na sua maioria, bastante baixos.

De entre as raças bovinas ibéricas estudadas, a Frisona e a Cachena demonstram estar mais próximas da raça Barrosã, com valores de D_{Nei} de 0,092 (4 *loci*) e de 0,104 (5 *loci*), respectivamente. Por outro lado, as raças Asturiana de la Montaña e Vianesa aparecem como as mais diferenciadas: $D_{Nei} = 0,334$ (4 *loci*) e $D_{Nei} = 0,330$ (5 *loci*), respectivamente.

Tabela 3.4.6: Distâncias genéticas de Nei (D_{Nei}, 1978) entre 23 raças bovinas da Península Ibérica, considerando 4 loci polimórficos (HB, CAII, ALB e TF).

População	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
(1) Mertolenga	-														
(2) Alentejana	0,078	-													
(3) Rubia Gallega	0,127	0,114	-												
(4) Cachena	0,098	0,109	0,073	-											
(5) Caldelana	0,158	0,160	0,086	0,128	-										
(6) Frieira	0,177	0,161	0,069	0,122	0,062	-									
(7) Limiana	0,141	0,174	0,090	0,088	0,084	0,102	-								
(8) Vianesa	0,132	0,167	0,111	0,115	0,077	0,120	0,066	-							
(9) Sayaguesa	0,114	0,152	0,104	0,054	0,145	0,146	0,077	0,119	-						
(10) Morucha	0,080	0,122	0,133	0,083	0,183	0,185	0,138	0,155	0,078	-					
(11) Alistano Sanabre	0,107	0,126	0,102	0,118	0,079	0,117	0,107	0,062	0,140	0,152	-				
(12) Blanca Cacerena	0,241	0,317	0,298	0,265	0,288	0,326	0,232	0,231	0,227	0,238	0,265	-			
(13) Asturiana de dos Valles	0,113	0,107	0,043	0,053	0,094	0,082	0,082	0,109	0,083	0,114	0,105	0,284	-		
(14) Asturiana de Montaña	0,302	0,290	0,337	0,308	0,373	0,382	0,349	0,364	0,320	0,307	0,364	0,378	0,328	-	
(15) Morenas del N.O.	0,148	0,158	0,121	0,146	0,086	0,115	0,127	0,079	0,169	0,185	0,048	0,294	0,129	0,399	-
(16) Retinta	0,135	0,165	0,157	0,097	0,199	0,205	0,139	0,171	0,089	0,108	0,190	0,232	0,136	0,248	0,224
(17) De Lidia	0,161	0,160	0,170	0,115	0,233	0,221	0,185	0,220	0,123	0,121	0,226	0,296	0,151	0,243	0,256
(18) Tudanca	0,196	0,197	0,142	0,131	0,198	0,164	0,155	0,211	0,118	0,148	0,220	0,314	0,129	0,357	0,237
(19) Frisona	0,162	0,126	0,101	0,114	0,130	0,113	0,150	0,144	0,162	0,178	0,125	0,350	0,108	0,347	0,125
(20) Cárdena Andaluza	0,220	0,207	0,143	0,191	0,083	0,108	0,148	0,150	0,209	0,248	0,150	0,334	0,153	0,387	0,155
(21) Barrosã	0,158	0,163	0,138	0,112	0,157	0,162	0,141	0,127	0,144	0,166	0,136	0,300	0,135	0,334	0,141
(22) Minhota	0,181	0,168	0,090	0,117	0,118	0,077	0,121	0,143	0,139	0,172	0,142	0,332	0,096	0,389	0,138
(23) Mirandesa	0,166	0,171	0,127	0,167	0,059	0,110	0,130	0,095	0,185	0,209	0,073	0,295	0,137	0,393	0,076

(Continua)

Tabela 3.4.6: Distâncias genéticas de Nei (D_{Nei} , 1978) entre 23 raças bovinas da Península Ibérica, considerando 4 loci polimórficos (HB, CAII, ALB e TF) (Continuação)

População	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)
(1) Mertolenga								
(2) Alentejana								
(3) Rubia Gallega								
(4) Cachena								
(5) Caldelana								
(6) Frieira								
(7) Limiana								
(8) Vianesa								
(9) Sayaguesa								
(10) Morucha								
(11) Alistano Sanabre								
(12) Blanca Cacerena								
(13) Asturiana de dos Valles								
(14) Asturiana de Montaña								
(15) Morenas del N.O.								
(16) Retinta	-							
(17) De Lidia	0,077	-						
(18) Tudanca	0,168	0,150	-					
(19) Frisona	0,189	0,193	0,206	-				
(20) Cárdena Andaluza	0,247	0,279	0,241	0,179	-			
(21) Barrosã	0,156	0,180	0,225	0,092	0,217	-		
(22) Minhota	0,202	0,206	0,146	0,116	0,172	0,147	-	
(23) Mirandesa	0,235	0,273	0,245	0,158	0,095	0,185	0,161	-

Tabela 3.4.7: Distâncias genéticas de Nei (D_{Nei} , 1978) entre 15 raças bovinas da Península Ibérica, considerando 5 *loci* polimórficos (HB, CAII, ALB, TF e NP).

População	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
(1) Rubia Gallega	-														
(2) Cachena	0,068	-													
(3) Caldelana	0,077	0,117	-												
(4) Frieira	0,065	0,116	0,057	-											
(5) Limiana	0,087	0,095	0,080	0,093	-										
(6) Vianesa	0,334	0,331	0,327	0,340	0,332	-									
(7) Sayaguesa	0,093	0,054	0,130	0,131	0,075	0,337	-								
(8) Morucha	0,121	0,074	0,166	0,169	0,133	0,344	0,073	-							
(9) Alistano Sanabre	0,125	0,149	0,105	0,124	0,109	0,345	0,149	0,170	-						
(10) Blanca Cacerena	0,287	0,252	0,281	0,317	0,249	0,366	0,230	0,230	0,303	-					
(11) Asturiana de dos Valles	0,060	0,053	0,099	0,098	0,107	0,325	0,090	0,105	0,160	0,261	-				
(12) Asturiana de Montaña	0,304	0,276	0,337	0,347	0,321	0,450	0,290	0,275	0,348	0,345	0,293	-			
(13) Cárdena Andaluza	0,139	0,187	0,089	0,103	0,135	0,358	0,194	0,234	0,137	0,338	0,170	0,359	-		
(14) Barrosã	0,132	0,104	0,151	0,159	0,149	0,330	0,139	0,151	0,178	0,275	0,121	0,299	0,219	-	
(15) Minhota	0,081	0,105	0,107	0,074	0,116	0,342	0,125	0,155	0,157	0,313	0,094	0,349	0,167	0,137	-

No que se refere à raça Minhota, verifica-se que a Frieiresa é a que está mais próxima (valores de 0,077 e 0,074 para 4 e 5 *loci*, respectivamente) e que mais um vez é a Asturiana de la Montaña a mais diferenciada das raças (valores de 0,389 e 0,349 para 4 e 5 *loci*, respectivamente).

A diferenciação genética entre as raças bovinas ibéricas encontra-se representada nos dendrogramas construídos pelos métodos de agrupamento NJ (*Neighbor-joining*, SAITOU & NEI, 1987) e UPGMA (*Unweighted pair-group arithmetic average*; SNEATH & SOKAL, 1973) (figuras 3.4.1, 3.4.2, 3.4.3 e 3.4.4). Foram realizados testes de reamostragem do tipo *bootstrap* (100 réplicas) para a análise da consistência dos padrões de ramificação, apresentando-se os seus valores entre parêntesis.

A análise conjunta dos quatro dendrogramas permite verificar uma falta de consistência nos vários padrões de ramificação para as raças bovinas ibéricas associada a valores de *bootstrap* em geral muito reduzidos. De facto, observa-se que o padrão de ramificação dos dendrogramas se altera consoante o método de agrupamento usado e o número de *loci* considerados. Estas alterações nos agrupamentos das diferentes raças devem-se, provavelmente, à instabilidade causada pelo reduzido número de *loci* polimórficos utilizados neste estudo, bem como ao facto de as frequências génicas serem muito semelhantes em todas as populações estudadas.

Deve, contudo, referir-se que a raça Barrosã aparece normalmente associada a várias raças do norte da Península Ibérica, nomeadamente a Cachena (Galiza), a Asturiana de la Montaña (Astúrias), a Sayaquesa e a Morucha (Salamanca).

No que se refere à raça Minhota, esta aparece várias vezes associada às raças Rubia Gallega, Frisona, Asturiana de los Valles e Frieiresa.

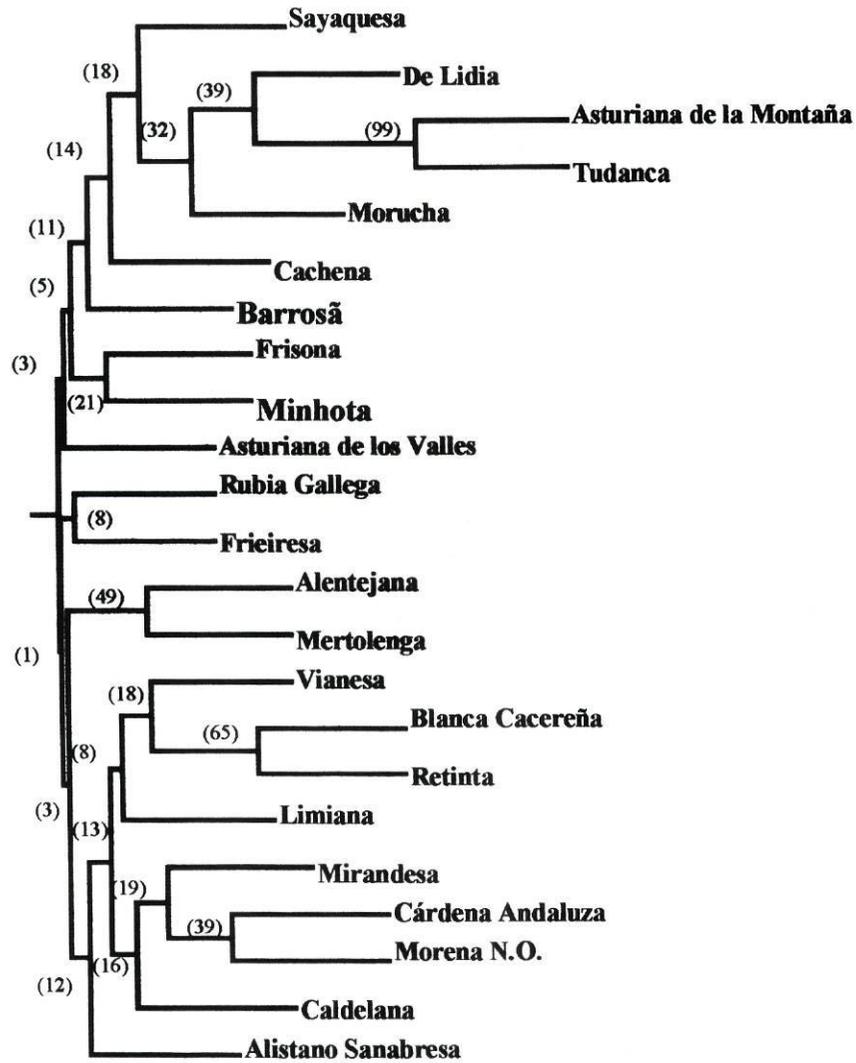


Figura 3.4.1: Dendrograma construído com base nas distâncias genéticas de NEI (1978) entre 23 raças de bovinos (4 loci: HB,CAII, ALB e TF) através do método de agrupamento NJ. Os valores de probabilidade de ocorrência de cada agrupamento, obtidos através de um teste de *bootstrap*, indicam-se entre parêntesis.

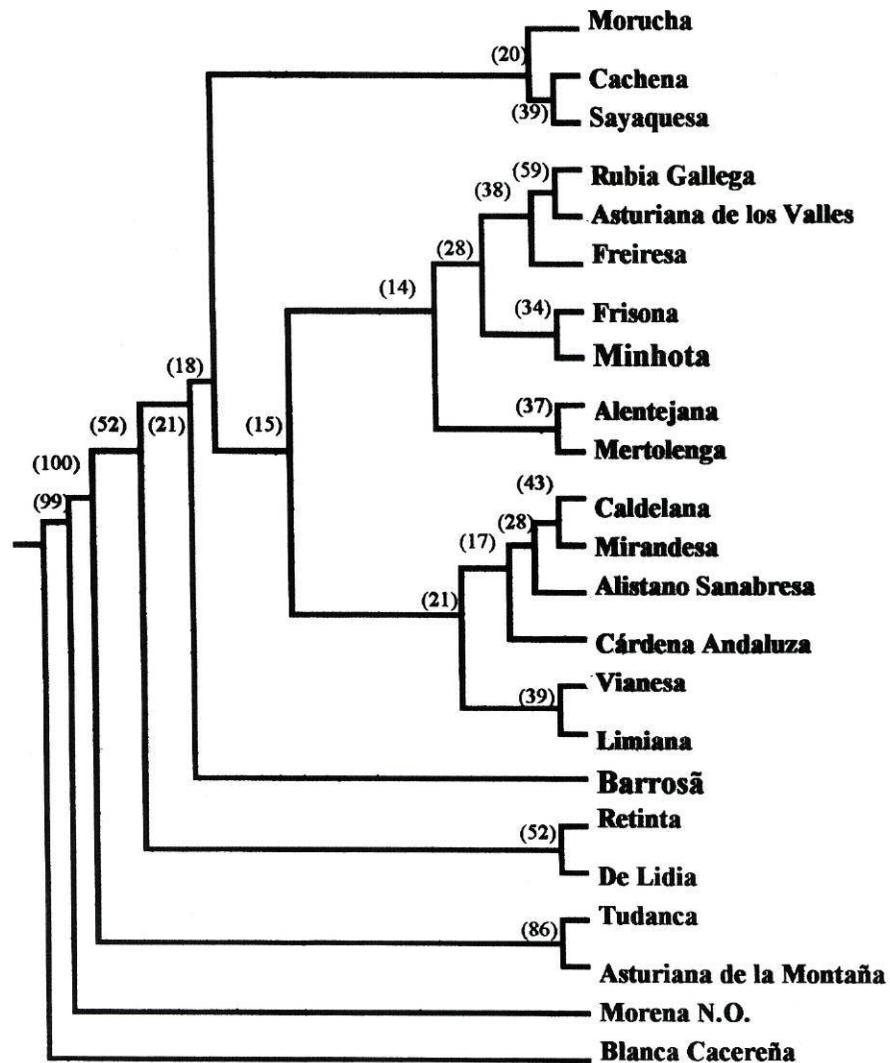


Figura 3.4.2: Dendrograma construído com base nas distâncias genéticas de NEI (1978) entre 23 raças de bovinos (4 loci: HB, CAII, ALB e TF) através do método de agrupamento UPGMA. Os valores de probabilidade de ocorrência de cada agrupamento, obtidos através de um teste de *bootstrap*, indicam-se entre parêntesis.

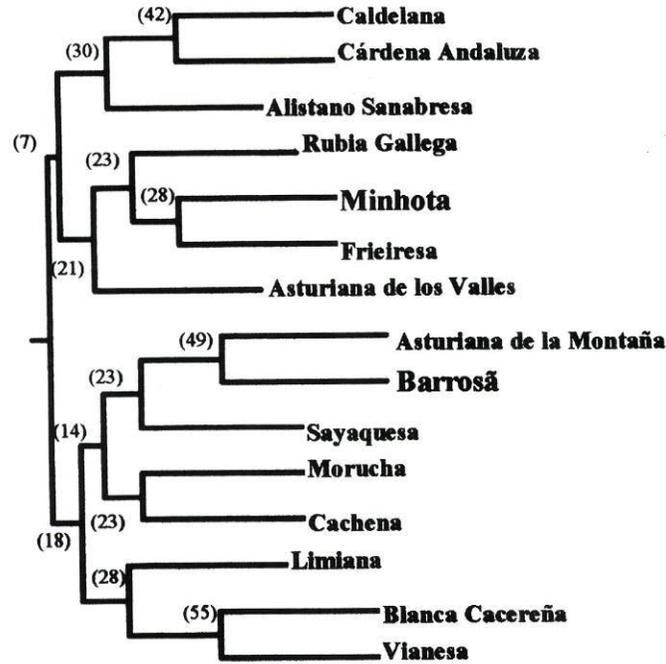


Figura 3.4.3: Dendrograma construído com base nas distâncias genéticas de NEI (1978) entre 15 raças de bovinos (5 loci: HB, CAII, ALB, TF e NP) através do método de agrupamento NJ. Os valores de probabilidade de ocorrência de cada agrupamento, obtidos através de um teste de *bootstrap*, indicam-se entre parêntesis.

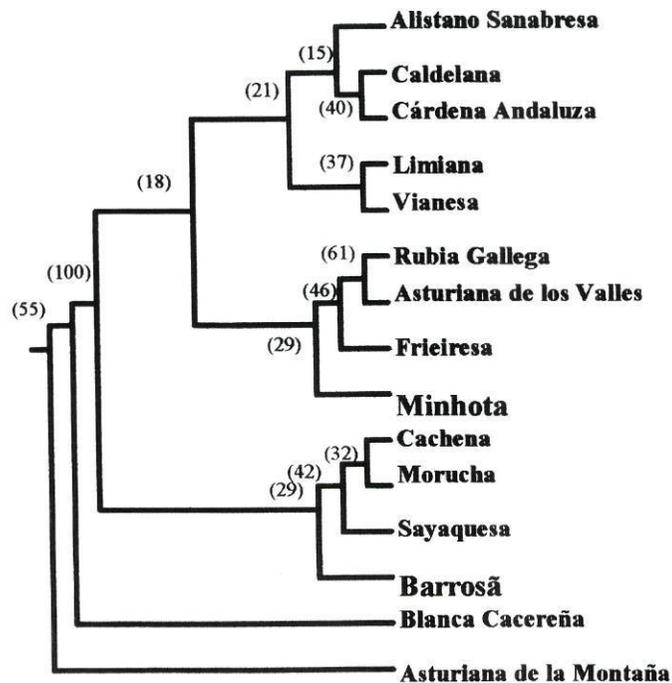


Figura 3.4.4: Dendrograma construído com base nas distâncias genéticas de NEI (1978) entre 15 raças de bovinos (5 loci: HB, CAII, ALB, TF e NP) através do método de agrupamento UPGMA. Os valores de probabilidade de ocorrência de cada agrupamento, obtidos através de um teste de *bootstrap*, indicam-se entre parêntesis.

No seu conjunto, estes resultados não são suficientes para o estabelecimento de uma história evolutiva das actuais raças bovinas ibéricas, nem para a separação da raça Barrosã das restantes. Consequentemente, não é possível, neste momento, fazer corresponder a análise da diversidade e estrutura genética das populações ibéricas de gado bovino com alguma das hipóteses evolutivas propostas por diversos autores com base em evidência morfológica (VALLEJO, 1978; IGLESIAS, 1989; CORDEIRO, 1986; JORGE, 1996).

De acordo com essa evidência, a raça Barrosã (e também a Cachena) derivaria do denominado tronco mauritânico (*Bos primigenius opisthonomus*), ou seja, de populações originárias do Norte de África que teriam passado para o sul da Península Ibérica, alcançando, mais tarde, o Norte de Portugal e de Espanha. Por outro lado, a filiação da raça Minhota, segundo JORGE (1996), deriva do tronco aquitânico (*Bos primigenius primigenius*), tal como a maior parte das raças da Galiza, das Astúrias e dos Pirinéus.

Embora os resultados apresentados neste trabalho pareçam, de facto, indicar que as raças Barrosã e Minhota derivam de troncos diferentes, é necessário aprofundar de forma muito considerável a investigação sobre a estrutura genética das raças bovinas ibéricas antes de se poder formular conclusões mais sustentadas.

4. - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho desenvolvido nesta dissertação permitiu o estudo de alguns sistemas genéticos polimórficos já descritos em bovinos (HB, CAII, NP, MPI, ALB, TF e GC), nas raças Barrosã e Minhota. Permitiu, ainda, a aplicação de técnicas de separação electroforéticas mais eficazes em alguns desses sistemas.

Várias limitações durante a execução prática deste trabalho obrigaram, de alguma forma, a alterações no programa inicial. Entre elas devem referir-se:

1. a recolha de amostras de sangue mostrou-se difícil e demorada, sendo necessária a coordenação de esforços de várias entidades (Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho e brigadas de Sanidade Animal locais), de veterinários e de criadores de bovinos, retirando tempo à execução prática do trabalho;
2. a afinação de várias técnicas electroforéticas para certos marcadores genéticos envolveu um considerável esforço de investigação;
3. a impossibilidade de apurar, atempadamente, as técnicas de separação ou de visualização para a amilase, a ceruloplasmina e a pós-transferrina;
4. a escassa bibliografia sobre o bovino Barrosã e sobre as técnicas utilizadas neste trabalho em gado bovino.

Apesar das limitações, considera-se que este trabalho se reveste de alguma importância pelo facto de constituir um contributo para a caracterização genética de uma raça bovina muito peculiar. A este respeito, entendeu-se que numa primeira fase se procederia ao estudo de um conjunto de proteínas polimórficas de forma a poder iniciar uma comparação com outras raças bovinas, nomeadamente ibéricas, para as quais já existem resultados publicados. Por outro

lado, o estabelecimento de um conjunto de técnicas de fenotipagem dos *loci* considerados permite, desde logo, a sua aplicação em questões de identificação individual e de análise da paternidade.

É, contudo, evidente que o aprofundamento deste trabalho deverá, necessariamente, evoluir na direcção da análise molecular da variação genética. Adicionalmente, será do maior interesse alargar o domínio de investigação às restantes raças bovinas autóctones.

Em face do exposto, entende-se ser possível definir três linhas de investigação para os próximos anos:

- 1 - ampliação da bateria de sistemas genéticos polimórficos detectados em proteínas do sangue e do leite;
- 2 - análise da variabilidade genética de um conjunto de microssatélites, se possível associados a algumas das proteínas polimórficas já descritas;
- 3 - estudo do polimorfismo da molécula de DNA-mitocondrial.

De uma forma geral pode, assim, considerar-se que os principais objectivos definidos no início deste trabalho foram alcançados, pelo que se apresentam em seguida as conclusões.

5. - CONCLUSÕES

A utilização de um sistema de focagem isoelectrica permitiu detectar a existência de polimorfismo genético na hemoglobina, distinguindo-se dois produtos génicos na raça bovina Minhota, HB*A e HB*B. Na raça Barrosã, HB*A foi o único produto génico encontrado.

A utilização de um sistema de focagem isoelectrica permitiu a detecção de dois produtos génicos no *locus* CAII (CAII*F e CAII*S) e revelou-se mais eficaz de que as técnicas de separação convencional em gel de amido.

A investigação realizada permitiu detectar a ocorrência de polimorfismo genético de MPI através de um sistema electroforético em gel de amido, tendo-se detectado três produtos génicos (MPI*A, MPI*B e MPI*C). A fraca actividade de MPI e a grande dificuldade na obtenção de um contraste de bandas adequado poderá dever-se ao facto de a sua expressão só ocorrer na fracção leucocitária do sangue.

A aplicação de um sistema de focagem isoelectrica na presença de ureia (8M) revelou-se muito eficaz na separação de ALB e permitiu detectar, pela primeira vez, um novo variante, ALB*V, ligeiramente mais ácido do que ALB*A.

A combinação de uma técnica de focagem isoelectrica com um prévio tratamento das amostras a fim de saturar a molécula de TF com Fe permitiu a detecção de quatro produtos génicos (TF*A, TF*D1, TF*D2 e TF*E) nas raças estudadas.

A combinação de uma técnica de focagem isoeléctrica com a detecção por *immunoblotting* permitiu detectar dois produtos génicos no *locus* GC (GC*A e GC*B). O tratamento de amostras com neuraminidase permitiu a obtenção de padrões mais simples do que os conseguidos com amostras nativas. Esta simplificação resulta da provável remoção de ácidos siálicos ligados à molécula de GC.

Não se detectou nenhum caso de exclusão na análise de segregação de 27 pares mãe/filho, feita separadamente para cada *locus*.

Verificou-se a presença de dois alelos raros, HB*B e PEPB*1, na raça Minhota. Estes alelos poderão ser utilizados na distinção das duas raças estudadas.

Foi encontrado um valor de heterozigotia média de 0,237 em populações de raça Barrosã, indicativo de uma variabilidade genética intermédia em relação à generalidade das raças ibéricas. As diferenças observadas entre as várias raças ibéricas poderão reflectir fenómenos histórico-evolutivos muito recentes, dada a sua proximidade e grande semelhança.

Foi observado um reduzido nível de diferenciação entre as raças Barrosã e Minhota ($F_{ST} = 0,031$) demonstrando-se que a maior parte da diversidade genética se atribui a diferenças intrapopulacionais. Este valor de F_{ST} pode considerar-se baixo quando comparado com o obtido no estudo de outras espécies animais, sugerindo um elevado fluxo génico interpopulacional. Por outro lado, reflecte, ainda, uma história demográfica muito recente.

A utilização de métodos de agrupamento NJ e UPGMA, obtidos a partir de matrizes de distâncias genéticas de Nei, não permitiu separar a raça Barrosã das restantes raças ibéricas.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, A. (1983). *Contribuição para o conhecimento da Genética Humana. Estudo de Genética Bioquímica Formal e Populacional e de Ligação Factorial*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências do Porto.
- AMORIM, A., KOMPFF, J.; SCHUNTER, F. & RITTER, H. (1982). Aminolevulinate dehydratase (E.C.4.2.1.24): Linkage analysis. *Hum. Genet.* **61**: 48-49.
- ANSAY, M. (1973). Techniques microelectrophoretiques dans l'analyse de la multiplicité enzymatique chez les bovins. *Détection Électrophorétique des Polymorphismes Biochimiques Chez les Mammifères: Application a L'Étude Génétique des Populations*. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. 43-58.
- ARANA, A. E. & ZARAGOZA, P. (1986). Nueva electroforetica del enzima NADH-Diafrosa (DIA-2) detectada en la especie *Oryctolagus cuniculus* (L.). *Zootecnia*. **XXXV** n° 7-12: 125-130.
- ARAÚJO, J. (1986). *Contribuição para o estudo dos bovinos de raça Barrosã*. Relatório de estágio da licenciatura em Engenharia Zootécnica. Universidade dos Açores.
- ARNOLD, I. C. J. & BOUW, J. (1989). A new allele of glucose phosphate isomerase in dogs. *Animal Genetics*. **20**: 217-220.
- ARRANZ, J. J.; BAYÓN, Y. & SAN PRIMITIVO, F. (1992). Biochemical polymorphisms in Spanish Avileña-Negra Ibérica cattle. *Animal Genetics*. **23** (suppl, 1): 19.
- ARRANZ, J. J.; BAYÓN, Y. & SAN PRIMITIVO, F. (1996). Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Animal Genetics*. **27**: 415-419.
- ASHTON, G. C. (1965). Cattle serum transferrins: A balanced polymorphism?. *Genetics*. **52**: 983-997.

- BAINES, J. & MÉLEK, J. (1980). *Egipto - Deuses, Templos e Faraós. Grandes Culturas e Civilizações*. Círculo de Leitores.
- BELL, K.; ARTHUR, H. & ANDERSON, I. L. (1994). Esterase and albumin polymorphism in the domestic cat (*Felis catus*). XXIV International Conference on Animal Genetics. Praga, Julho 1994.
- BEKENEV, V. A. & ORLOVA, G. V. (1991). Polymorphism of erythrocytic enzymes in Large White pig breeds in Siberia. *Animal Genetics*. **22** (suppl. 1): 23-24.
- BOWLING, A. T. & CLARK, R. S. (1988). Excess of heterozygotes at albumin locus in American Standardbred horses. *Animal Genetics*. **19**: 331-341.
- BOWLING, A. T.; GORDON, L.; PENEDO, M. C. T.; WICTUM, E. & BEEBOUT, J. (1990). A single gel for determining genetic of equine erythrocyte carbonic anhydrase (CA) and catalase (Cat). *Animal Genetics*. **21**: 191-197.
- BRADLEY, D. G.; MACHUGH, D. E.; CUNNINGHAM, P. & LOFTUS, R. T. (1996). Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*. **93**: 5131-5135.
- BRAEND, M. (1971). Studies on the relationships between cattle breeds in Africa, Asia and Europe: Evidence obtained by studies of blood groups and protein polymorphisms. *World Review of Animal Production*. **VIII** (1): 10-14.
- BRAEND, M. (1988). Haemoglobin polymorphism in Norwegian Red Cattle. *Animal Genetics*. **19**: 59-62.
- BRAEND, M.; NESSE, I. L. & EFREMOV, G. D. (1988). Expression and genetics of caprine haemoglobins. *Animal Genetics*. **18**: 223-231.
- BROWN, L. R.; KANE, H. & AYRES, H. (1993). *Vital signs*. W.W. Norton e Co. pp. 323. New York.
- CARTER, D. C.; HE, X. M.; MUNSON, S. H.; TWIGG, P. D.; GERNERT, K. M.; BROOM, M. B. & MILLER, T. Y. (1989). Three dimensional structure of human serum albumin. *Science*. **244**: 1195-1198.
- CECCHINI, G. & NIJS, M. D. (1986). Literature review on cattle blood polymorphisms and preliminary results of analysis in East African Zebu in Ethiopia. *Agric. Subtrop. and Tropicale*. **3** (80): 433-463.

- ČÍŽOVÁ, D.; STRATIL, A.; MÜLLER, E. & ČEPICA, S. (1993). A new partially deficient transferrin variant in the pig. *Animal Genetics*. **24**: 305-306.
- CLARKE, S. W.; TUCKER, E. M. & OSTERHOFF, D. R. (1989). Blood groups and biochemical polymorphism in the Namaqua sheep breed. *Animal Genetics*. **20**: 279-286.
- CLUTTON-BROCK, J. (1992). Domestication of animals. In: Jones S., Martin R., Pilbeam D. (eds.). *The Cambridge Encyclopedia of Human Evolution*, pp. 380-385. Cambridge University Press.
- CORDEIRO, J. P. (1986). As raças bovinas em Portugal - Sua Origem. *O médico veterinário*. **I (1)**: 29-39.
- CRISTOFALO, C.; COZZI, M. C. & VALIATI, P. (1992). Identification of a new variant in the equine serum alB-glycoprotein (AlB) system. *Animal Genetics*. **23** (suppl. 1): 24.
- CUNHA, L. M. (1994). *Caracterização Morfo-Funcional e Genética da Raça Bovina Alentejana*. Trabalho de fim de curso apresentado à Escola Superior Agrária de Beja.
- DEL LAMA, S. N.; DEL LAMA, M. A.; MESTRINER, M. A. & MORTARI, N. (1992). Peptidase B polymorphism in cattle erythrocytes. *Biochem. Genet.* **30**: 247-255.
- DRATCH, P.; TATE, M.; KRAAY, G. J. & GERWING, V. (1992). Plasma proteins differentiating European red deer and North American elk. *Animal Genetics*. **23** (suppl. 1): 32.
- EGGEN, A. & FRIES, R. (1995). An integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genome. *Animal Genetics*. **26**: 215-236.
- ERHARDT, G. (1986). Transferrin variants in sheep: separation and characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Animal Genetics*. **17**: 343-352.
- ERHARDT, G. (1991). Genetic polymorphism of vitamin D binding protein and serum albumin in sheep. *Animal Genetics*. **22** (suppl. 1): 28-29
- ERHARDT, G. & SIMIANER, H. (1993). Linkage between the loci for serum albumin and vitamin D binding protein (GC) in sheep. *Animal Genetics*. **24**: 301-303.
- EPSTEIN, H. & MASON, I. L. (1984). Cattle. In: Mason I. L. (ed). *Evolution of domesticated animals*, pp. 7-27. Longman.

- FAO (1993). A diversidade da Natureza. Um património valioso. Documento produzido pela FAO / Divisão de informação - Out. de 1993. *Veterinária Técnica*. 10: 10-12.
- FAO (1996). World Watch List for Domestic Animal Diversity, 2ª edição. FAO/UNEP. pp. 334. Roma.
- FARNDALE, B. M.; HUBBARD, D. E. & ANDERSON, I. L. (1992). A new PGD variant in New Zealand Thoroughbred horses. *Animal Genetics*. 23 (suppl. 1): 24
- FELSENSTEIN, J. (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5 Distributed by the autor. Seattle: University of Washington.
- FERNANDES, M. T. S. (1996). Raças de bovinos autóctones. Um importante recurso genético animal português a preservar e a defender. *Veterinária Técnica*. 12: 10-15
- FERRAND, N. (1995). *Variação genética de proteínas em populações de coelho (Oryctolagus cuniculus) - Análise da diferenciação subespecífica, subestruturação, expansão geográfica e domesticação*. Dissertação de Doutoramento em Biologia apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- FERRAND, N. & ROCHA, J. (1991). Genetic polymorphism of serum albumin in wild rabbits populations. *Animal Genetics*. 22 (suppl. 1): 36.
- FORBES, P.; MACKETH, B. & PEBERDY, R. (1986). *Mamíferos Ungulados e Lagomorfos*. Círculo de Leitores.
- FRIES, R.; EGGEN, A. & WOMACK J. E. (1993). The bovine genome map. *Mammalian Genome*. 4: 405-428.
- GAHNE, B. (1963). Inherited variation in the post-albumin of cattle serum. *Hereditas*. 50:126-135.
- GAHNE, B.; JUNEJA, R. K. & GROLMUS, J. (1977). Horizontal polyacrylamine gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle. *Anim. Bld. Grps. Biochem. Genet.* 8:127-137.
- GARCIA, L. S., VICENTE, M. V.; BECERRA, A. I.; YEBRA, F. A.; RODRÍGUES, M. F. & LÓPEZ, J. M. S. (1992). *Razas Bovinas Autóctonas de Galicia - I Razas Morenas Galegas (Recursos Xenéticos a Conservar)*. Xunta de Galicia.
- GARCIA, M.; ROSÁRIO, J. & ANTUNES, M. (1981). *Bovinos em Portugal*. Direcção dos Serviços Veterinários - D.G.S.V.. pp. 44-78. Lisboa.

- GLOWATZKI-MULLIS, M. L.; GAILLARD, C.; WIGGER, G. & FRIES, R. (1995).** Microsatellite-based parentage control in cattle. *Animal Genetics*. **26**: 7-12.
- GONÇALVES GARCIA, M. L. (1964).** A Raça Bovina Barrosã. Boletim Pecuário n ° 1, Ano XXXII, D.G.S.P., pp. 103-172. Lisboa.
- GONZALEZ, P.; TUÑON, M.J. & VALLEJO, M. (1987).** Genetic relationships between Spanish native breeds of cattle. *Animal Genetics*. **18**: 249-256.
- HALL, S. B. L.; COTHRAN, E. G. & KING, J. A. (1991).** Variability of manosephosphate isomerase (MPI) from haemolysate in 14 horse breeds. *Animal Genetics*. **22** (suppl, 1): 22.
- HARRIS, H. & HOPKINSON, D. A. (1976).** *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North-Holland Publishers.
- HEMMER, H. (1990).** *Domestication. The decline of environmental appreciation*. Cambridge University Press.
- HERZOG, S. (1988).** Polymorphism and genetic control of erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase in the genus *Cervus*. *Animal Genetics*. **19**: 291-294.
- HERZOG, S. (1989).** Genetic polymorphism of transferrin in fallow deer, *Cervus dama L.* *Animal Genetics*. **20**: 421-426.
- IGLESIAS, A. B. (1989).** Estrutura y relaciones geneticas de razas bovinas mediante marcadores geneticos (Polimorfismos Bioquimicos). Dissertação de Doutorado em Biologia apresentada à Faculdade de Biologia da Universidade de Santiago.
- JAMIESON, A. (1965).** The genetics of transferrins in cattle. *Heredity*. **20**: 419-441.
- JANZEN, M. K. & COTHRAN, E. G. (1991).** A new PGD variant from North American horses of feral origin. *Animal Genetics*. **22** (suppl, 1): 21-22.
- JORGE, E. S. (1996).** Bovinos da raça Minhota. Contribuição para a sua história. *Veterinária Técnica*. **10**: 10-18.

- JUNEJA, R. K.; GAHNE, B. & STRATIL, A. (1987). Polymorphic plasma postalbumins of some domestic animals (pig Po₂, horse X_K and dog Pa proteins) identified as homologous. *Animal Genetics*. **18**: 119-124.
- JUNEJA, R. K.; KURLY, J.; GAHNE, B. & ZURKOWSKI, M. (1989). Linkage between the *loci* for transferrin and ceruloplasmin in pigs. *Animal Genetics*. **20**: 307-311.
- KALÁB, P.; STRATIL, A. & GLASNÁK, V. (1990). Genetic polymorphism of serum vitamin D-binding protein (GC) in sheep and mouflon. *Animal Genetic*. **21**: 317-321.
- KAWAGUCHI, T. (1973). Polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of serum albumin into three bands. *Clinica Chimica Acta*. **45**: 85-92.
- KIDD, K. K.; STONE, W. H.; CRIMELLA, C.; CARENZI, C.; CASATI, M. & ROGNONI, G. (1980). Immunogenetic and population genetic analyses of Iberian cattle. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* **11**: 21-38.
- KRISTJANSSON, F. K. (1963). Genetic control of two pre-albumins in pigs. *Genetics*. **48**: 1059-1063.
- KRISTJANSSON, F. K. & HICKMAN, C. G. (1965). Subdivision of the allele TF D for transferrins in Holstein and Ayrshire cattle. *Genetics*. **52**: 627-630.
- KUROSAWA, Y. & TANAKA, K. (1988). Electrophoretic variants of serum transferrin in wild pig populations of Japan. *Animal Genetics*. **19**: 31-35.
- LEAL, C. (1995). *Apreciação fenotípica de um núcleo de bovinos de raça Barrosã e amostragem para sua caracterização genética*. Relatório de estágio de licenciatura em Biologia - Ramo Científico Tecnológico em Ecologia e Recursos Zoológicos. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- LITT, M & LUTTY, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*. **44**: 397-401.
- LOFTUS, R. T.; MACHUGH, D. E.; NGERE, L. O.; BALAIN, D. S.; BADI, A. M.; BRADLEY, D. G. & CUNNINGHAM, E. P. (1994a). Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. *Animal Genetics*. **25**: 265-271.

- LOFTUS, R. T.; MACHUGH, D. E.; BRADLEY, D. G.; SHARP, P. M. & CUNNINGHAM, P.** (1994b). Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*. **91**: 2757-2761.
- MACHUGH, D. E.; LOFTUS, R. T.; BRADLEY, D. G.; SHARP, P. M. & CUNNINGHAM, P.** (1994). Microsatellite DNA variation and among European cattle breeds. *Proceedings of the Royal Society of London B*. **256**: 25-31.
- MACHUGH, D. E.; SHRIVER, M. D.; LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P. & BRADLEY, D. G.** (1997). Microsatellite DNA Variation and the Evolution, Domestication and Phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics*. **146**: 1071-1086.
- MARTINS, R.** (1982). *Conservação e melhoramento dos bovinos de raça Barrosã*. Relatório de estágio de licenciatura em Produção Animal. Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- MIRANDA DO VALE, J.** (1949). *Gado Bissulco*. Livraria Sá da Costa. Lisboa.
- MORAIS, M. L.** (1992). *Estudo, Desenvolvimento e Optimização de Técnicas de Separação e Detecção Específica de Proteínas*. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra.
- NEI, M.** (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. **89**: 583-590.
- NICHOLS, E. A.; CHAPMAN, V. M. & RUDDLE, F. H.** (1973). Polymorphism and linkage for Mannosephosphate isomerase in *Mus musculus*. *Biochem. Genet.* **8**: 47-53.
- NOBRE, J. M.** (s/ data). *Caracterização genética da raça bovina Mirandesa*. Trabalho de fim de curso efectuado na Estação Nacional de Seleção e Reprodução Animal. Curso de Engenharia Zootécnica da Universidade de Évora.
- PENEDO, M. C. T.; FOWLER, M. E.; BOWLING, A. T.; ANDERSON, D. L. & GORDON, L.** (1988). Genetic variation in the blood of llamas, *Llama glama*, and alpaca, *Llama pacos*. *Animal Genetics*. **19**: 267-276.
- PENEDO, M. C. T. & JUNEJA, R. K.** (1989). Polymorphic plasma postalbumin (PO) of llamas and alpacas identified as GC Protein. *Animal Genetics*. **20**: 221-223.

- PENHALLOW, R. C.; MASON, A. B. & WOODWORTH, R. C. (1991). Electrophoretic characterization of human, equine and bovine transferrins. *Comp. Biochem. Physiol.* **98B**: 41-45.
- PEREIRA, A. A. (1997). *Caracterização Genética de Algumas Subpopulações de Truta de Rio Salmo trutta L., da Bacia Hidrográfica do Rio Lima*. Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- PIEDRAFITA, J.; TEJEDOR, M. T. & ZARAGAZA, I. (1984). Post-Albuminas y Post-Transferrinas en poblaciones bovinas Españolas: Frisona y De Lidia. Comunicación Presentada A La 34ª Reunión Anual De La Federación Europea de Zootecnia. 114-121.
- POVEY, S.; CORNEY, G.; LEWIS, W. H. P.; ROBSON, E. B.; PARRINGTON, J. M. & HARRIS, H. (1972). The genetics of peptidase C in man. *Ann. Hum. Genet.* **35**: 455-465.
- PRETSCH, W. & MERKLE, S. (1990). Glucose Phosphate Isomerase Enzyme - Activity Mutants in *Mus musculus*: Genetical and Biochemical Characterization. *Biochemical Genetics.* **28**: 97-110.
- RASERO, R.; DI STASIO, L. & BERRA, G. P. (1993). Polymorphism of erythrocyte glucosephosphae isomerase in sheep. *Animal Genetics.* **24**: 63-64.
- RITTER, H.; FRIEDRICHSON, U. & SCHMITT, J. (1974). Genetic variation of Manose phosphate isomerase in Man. *Humangenetik.* **22**: 261
- RITTER, H. & SCHMITT, J. (1973). Genetic polymorphism of Manose phosphate isomerase in Primates. *Humangenetik.* **19**: 325-326
- ROCHA, J.; KÖMPF, J.; FERRAND, N.; AMORIM, A. & RITTER, H. (1991). Separation of human alloalbumin variants by isoelectric focusing. *Electrophoresis.* **12**: 313-314.
- ROGERSON, J. (1991). *Bíblia- Os Caminhos de Deus. Grandes Culturas e Civilizações*. Círculo de Leitores.
- RON, M.; BAND, M.; YANAI, A. & WELLER, J. I. (1994). Mapping quantitative trait loci with DNA microsatellites in a commercial dairy cattle population. *Animal Genetics.* **25**: 259-264.
- RUSSEL, G. (1996). The analysis of genetic diversity in cattle to preserve future breeding options (Online). Available: http://www.ri.bbsrc.ac.uk/cdiv_www/inform.htm. (1996, November 29).

- SAITOU, N. & NEI, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- SANTOS, O. C. M. (1995). *Caracterização Genética de Populações de Lebre Ibérica (Lepus granatensis) e Lebre Europeia (Lepus europaeus) – Aspectos Bioquímicos e Populacionais*. Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- SARAIVA, J. A. (1993). *História de Portugal*. Publicações Europa-América.
- SARTORE, G.; STORMONT, C.; MORRIS, B. G. & GRUNDER, A. A. (1969). Multiple electrophoretic forms of Carbonic Anhydrase in red cells of domestic cattle (*Bos taurus*) and American buffalo (*Bison bison*). *Genetics*. **61**: 823-831.
- SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M. P. C.; SILVA, B. T. F. & SALZANO, F. M. (1990). Transferrin and albumin polymorphisms in buffaloes from Brazil. *Animal Genetics* **21**: 335-337.
- SEATH, P. H. A. & SOKAL, R. R. (1973). *Numeric Taxonomy*. W. H. Freeman & Co.
- SELVARAJ, O. S.; MUKHERJEE, T. K.; DHALIWAL, S. S.; TAN, S. G. & BARKER, J. S. F. (1991). Biochemical polymorphisms in the local goats of South-East Asia. *Animal Genetics*. **22** (suppl, 1): 32.
- STERN, C. M.; MILLER, S. A. & SCHANFIELD, M. S. (1992). Differentiation of wapiti and Eurasian red deer by isoelectric focusing electrophoresis of GC on agarose gels. *Animal Genetics*. **23** (suppl, 1): 23.
- STORMONT, C. & SUZUKI, Y. (1963). Genetic control of albumin phenotypes in horses. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **144**: 673-675
- STRATIL, A.; GLASNÁK, V.; BOBÁK, P.; CÍZOVÁ, D.; GÁBRISOVÁ, E. & KALÁB, P. (1990). Variation of some serum proteins in red deer, *Cervus elaphus* L. *Animal Genetics* **21**: 285-293.
- SWOFFORD, D. L. & SELANDER, R. B. (1989). BIOSYS-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1.7. Illinois Natural History Survey.
- TASHIAN, R. E. (1989). The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. *BioEssays* **10**: 186-192.

- TASHIAN, R. E. & CARTER, N. D. (1976). Biochemical Genetics of Carbonic Anhydrase. In: Harris, H. (ed.) *Advances in Human Genetics*. 7: 1-56. Plenum.
- TATE, M. L. & McEWAN, K. M. (1992). Genetic polymorphism of erythrocyte diaphorase in red deer, *Cervus elaphus L.* *Animal Genetics*. 23: 449-452.
- TSUJI, S.; SAOAMITSU, Y. & GOTO, N. (1989). Ultrathin-layer isoelectric focusing for bovine serum transferrin phenotyping. *Biochem. Genet.* 27: 425-429.
- TUCKER, E. M. & YOUNG, J. D. (1988). Genetic control of red-cell nucleoside transport and its association with the B blood-group locus and nucleoside phosphorylase activity in sheep. *Biochem Genet.* 26: 489-501.
- TUÑON, M. J., GONZALEZ, P. & VALLEJO, M. (1989). Genetic relationships between 14 native Spanish breeds of goat. *Animal Genetics*. 20: 205-212.
- USHA, A. P. (1996). Cattle diversity by blood typing (Online). Available: http://www.ri.bbsrc.ac.uk/cdiv_www/infob.htm. (1996).
- USHA, A. P., SIMPSON, S. P. & WILLIAMS, J. L. (1995). Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Animal Genetics*. 26: 155-161.
- VANDEBERG, J. & AIVALIOTIS, M. (1990). Mannose-6-phosphate isomerase polymorphism in baboon erythrocytes. *Biochemical Genetics*. 28: 495-501.
- VAN DE WEGHE, A.; VAN ZEVEREN, A. & BOUQUET, Y. (1982). The vitamin D binding protein in domestic animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 977-982.
- VAN DE WEGHE, A.; YABLANSKI, T. S.; VAN ZEVEREN, A. & BOUQUET, Y. (1988). A third variant of glucose phosphate isomerase in pigs. *Animal Genetics*. 19: 55-58.
- VANKAN, D. M. & BELL, K. (1992 a). A new allele in Australian goats. *Animal Genetics*. 23: 453-456.
- VANKAN, D. M. & BELL, K. (1992 b). Genetic polymorphism of vitamin D-binding protein (GC) in Australian goats. *Animal Genetics*. 23: 457-462.
- VICENTE, M. V. (1978). Razas vacunas autóctonas en vías de extinción (Aportaciones al estudio genético). Fundación Juan March. Serie Universitaria. LXIX: 10-51.

- VIEIRA, J** (1993). *Utilização de marcadores genéticos na caracterização e certificação de populações domésticas e selvagens de coelho (Oryctolagus cuniculus)*. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- VIEIRA, J. & FERRAND, N.** (1995). Four new alleles at the mannose-6-phosphate isomerase locus in rabbit. *Animal Genetics*. **26**: 37-38.
- WANG, S.; FOOTE, W. C. & BUNCH, T. D.** (1990). Transferrin and haemoglobin polymorphism in domesticated goats in the USA. *Animal Genetics*. **21**: 91-94.
- WEBER, J. L. & MAY, P. E.** (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*. **44**: 388-396.
- WELCHS, S.** (1990). A comparison of the structure and properties of serum transferrin from 17 animal species. *Comp. Biochem. Physiol.* **97 B (3)**: 417-427.

ANEXO

RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho apresenta-se uma contribuição para o estudo genético da raça bovina Barrosã e de uma outra raça (Minhota) através da análise da variação genética de proteínas detectada pela utilização de sistemas electroforéticos convencionais e por focagem isoelectrica.

Definiram-se os seguintes objectivos fundamentais:

1. estudo da variabilidade genética da raça Barrosã ao nível das proteínas eritrocitárias e plasmáticas;
2. desenvolvimento e afinação de técnicas de separação de proteínas por electroforese e focagem isoelectrica e sua detecção específica (histoquímica e imunológica);
3. análise familiar dos polimorfismos encontrados;
4. avaliação do grau de diferenciação genética existente entre a raça Barrosã e outras raças bovinas.

Escolheu-se um conjunto de 12 sistemas genéticos (sete dos quais se revelaram polimórficos) que pudesse satisfazer os objectivos fundamentais do trabalho.

Assim, após desenvolvimento de técnicas de separação para os sistemas genéticos considerados, procedeu-se a uma análise familiar baseada nos polimorfismos encontrados nas populações de raça Barrosã, ao estudo de distribuição populacional dos fenótipos das duas raças estudadas e de outras raças bovinas da Europa (principalmente da Península Ibérica).

Com base neste trabalho, obtiveram-se as seguintes conclusões:

- a utilização de um sistema de focagem isoelectrica permitiu detectar a existência de polimorfismo genético na hemoglobina, distinguindo-se dois produtos génicos na raça bovina Minhota, HB*A e HB*B. Na raça Barrosã, HB*A foi o único produto génico encontrado;
- a utilização de um sistema de focagem isoelectrica permitiu a detecção de dois produtos génicos no *locus* CAII (CAII*F e CAII*S) e revelou-se mais eficaz de que as técnicas de separação convencional em gel de amido;
- a investigação realizada permitiu detectar a ocorrência de polimorfismo genético de MPI através de um sistema electroforético em gel de amido, tendo-se detectado três produtos génicos (MPI*A, MPI*B e MPI*C). A fraca actividade de MPI e a grande dificuldade na obtenção de um contraste de bandas adequado poderá dever-se ao facto de a sua expressão só ocorrer na fracção leucocitária do sangue;
- a aplicação de um sistema de focagem isoelectrica na presença de ureia (8M) revelou-se muito eficaz na separação de ALB e permitiu detectar, pela primeira vez, um novo variante, ALB*V, ligeiramente mais ácido do que ALB*A;
- a combinação de uma técnica de focagem isoelectrica com um prévio tratamento das amostras a fim de saturar a molécula de TF com Fe permitiu a detecção de quatro produtos génicos (TF*A, TF*D1, TF*D2 e TF*E) nas raças estudadas;
- a combinação de uma técnica de focagem isoelectrica com a detecção por *immunoblotting* permitiu detectar dois produtos génicos no *locus* GC (GC*A e GC*B). O tratamento de amostras com neuraminidase permitiu a obtenção de padrões mais simples do que os conseguidos com amostras nativas. Esta simplificação resulta da provável remoção de ácidos siálicos ligados à molécula de GC;
- não se detectou nenhum caso de exclusão na análise de segregação de 27 pares mãe/filho, feita separadamente para cada *locus*;
- verificou-se a presença de dois alelos raros, HB*B e PEPB*1, na raça Minhota. Estes alelos poderão ser utilizados na distinção das duas raças estudadas;

- foi encontrado um valor de heterozigotia média de 0,237 em populações de raça Barrosã, indicativo de uma variabilidade genética intermédia em relação à generalidade das raças ibéricas. As diferenças observadas entre as várias raças ibéricas poderão reflectir fenómenos histórico-evolutivos muito recentes, dada a sua proximidade e grande semelhança;
- foi observado um reduzido nível de diferenciação entre as raças Barrosã e Minhota ($F_{ST} = 0,031$) demonstrando-se que a maior parte da diversidade genética se atribui a diferenças intrapopulacionais. Este valor de F_{ST} pode considerar-se baixo quando comparado com o obtido no estudo de outras espécies animais, sugerindo um elevado fluxo génico interpopulacional. Por outro lado, reflecte, ainda, uma história demográfica muito recente;
- a utilização de métodos de agrupamento NJ e UPGMA, obtidos a partir de matrizes de distâncias genéticas de Nei, não permitiu separar a raça Barrosã das restantes raças ibéricas.

Tabela A: Frequências gênicas para os vários sistemas polimórficos encontrados na raça Barroá (indivíduos inscritos e não inscritos), utilizadas na análise familiar.

LOCUS	N	ALELOS	FREQUÊNCIA GÊNICA
CAII	294	F	0,35
		S	0,65
NP	294	H	0,24
		L	0,76
MPI	290	A	0,00
		B	0,98
		C	0,02
ALB	294	A	0,97
		B	0,02
		V	0,01
TF	294	A	0,57
		D1	0,16
		D2	0,23
		E	0,04
GC	294	1	0,83
		2	0,17