

Frequência Genotípica e Alélica para o Gene da Beta-Caseína em Touros da Raça Girolando

Larissa Fernandes Canonici^{2,3}, Fernando Rodrigues de Oliveira⁵, Jéssica Capelli do Nascimento^{2,3}, Kevin Schefer dos Santos^{2,4}, Hyago Passe Pereira⁶, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁷, João Cláudio do Carmo Panetto⁸, Marcos Vinícius Gualberto Barbosa da Silva⁸, Marco Antonio Mahado⁸, Marta Fonseca Martins^{8,9}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Embrapa.

²Bolsista de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite. Bolsista do CNPq. e-mail:

larissa_canonici@hotmail.co.uk

³Graduando em Farmácia – Faculdade de Ciências Médias e da Saúde/JF

⁴Graduando em Biologia – Centro de Ensino Superior/JF

⁵Biólogo. Bolsista de Apoio Técnico da Embrapa Gado de Leite. Bolsista Fapemig.

⁶Biólogo. Mestrando do PPGCBio/UFJF. Bolsista Capes.

⁷Analista Embrapa Gado de Leite.

⁸Pesquisador(a) Embrapa Gado de Leite.

⁹Orientadora- e-mail: marta.martins@embrapa.br

Resumo: Um dos alelos do gene da β -caseína é o A1, que originou da substituição da prolina por histidina na posição 67 do alelo A2. Este alelo está associado ao desenvolvimento de alergia em pessoas suscetíveis, podendo provocar, inclusive, reações semelhantes às de intolerância à lactose. O presente estudo teve como objetivo estabelecer a frequência alélica e genotípica de 73 touros da raça Girolando, participantes dos grupos 17^o, 18^o e 19^o do Teste de Progênie, utilizando a metodologia de PCR em tempo real. A frequência do alelo A1 foi de 36% e o alelo A2, 64%. As frequências genotípicas para o grupo estudado foram 12% (A1A1), 48% (A1A2) e 40% (A2A2). Quando se compara a frequência do grupo em estudo com a frequência dos animais participantes do Teste de Progênie é possível notar semelhança visto que a frequência alélica do Teste de Progênie foi de 26% para o alelo A1 e 74% para o alelo A2, e a frequência genotípica foi de 9,7% (A1A1), 32,3% (A1A2) e 58% (A2A2).

Palavras-chave: β -caseína, função gastrointestinal, girolando, intolerância à lactose, leite A2

Allelic and genotypic frequency for the Beta-Casein Gene in bulls of Girolando breed

Abstract: One of the alleles of the β -casein gene is the A1, which was brought forth by the replacement of proline by histidine in the position 67 of the A2 allele. This allele is associated with the development of allergy in susceptible people and, additionally, could lead to reactions similar to those of lactose intolerance. The present study aimed to establish the allelic and genotypic frequencies of 73 bulls of Girolando breed, specimens of groups 17, 18, and 19 in the progeny testing, using the PCR procedure in real time. The A1-allelic frequency was 36%; and the A2 allele, 64%. The genotypic frequencies for the studied group were 12% (A1A1), 48% (A1A2), and 40% (A2A2). When comparing the frequency of the group in question with the frequency of specimens in the progeny testing, it is noteworthy the resemblance once the allelic frequency of the progeny testing was 26% for A1 allele and 74% for A2 allele, and the genotypic frequency was 9,7%(A1A1), 32,3%(A1A2), and 58% (A2A2).

Keywords: A2 milk, β -casein, gastrointestinal function, girolando, lactose intolerance

Introdução

A cadeia produtiva do leite tem um papel relevante do ponto de vista econômico. De acordo com Zoccal (2017), em 2015, o Brasil ocupava a 4^a posição de produção de leite no ranking mundial com 35.124 mil toneladas, estando os Estados Unidos na liderança com 93.461 mil toneladas. Como há previsão de aumento da demanda de produção de leite, observou-se a necessidade de aumentar a produção, sendo o programa de melhoramento genético e a seleção de bovinos leiteiros uma estratégia importante que visa garantir maior produção e melhoria da qualidade do leite. O programa de melhoramento genético, por meio de diversos recursos, objetiva a seleção dos animais geneticamente superiores a fim de que a progênie seja superior geneticamente aos seus progenitores (Silva et al., 2018). Nesse sentido, busca-se o melhoramento da qualidade do leite por meio do estudo da genética. Essa seleção é de grande importância, como no uso de inseminação artificial, onde essa ferramenta, pela transferência de características genéticas favoráveis para a

progênie, pode ser usada para melhorar o valor nutricional do leite, agregando maior valor econômico ao produto.

Uma das características trabalhadas no melhoramento animal é o aumento da frequência de alelos favoráveis ligados às características de produção e composição de leite. O leite é composto em sua maioria por água, e em menor porcentagem por lipídeos, proteínas, lactose, vitaminas e minerais, sendo que as proteínas correspondem a aproximadamente 3,4%. As proteínas do leite caracterizam-se em dois grupos, sendo eles as caseínas (cerca de 80%) e as proteínas do soro. As caseínas se subdividem em alpha S1, alpha S2, kappa e beta (Hanusová et al., 2010).

As proteínas do leite podem estar relacionadas ao desenvolvimento de alergias em indivíduos sensíveis e também a outros sintomas como problemas de digestibilidade. Uma das proteínas envolvida com estes sintomas é a β -caseína, que já teve as variantes genéticas identificadas como a A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G, sendo A1 e A2 as mais frequentes (Hanusová et al., 2010). O alelo A1 possui uma substituição da prolina na posição 67 do A2 pela histidina (Cieslińska et al., 2007) e tem sido relacionado com o desenvolvimento de eventos adversos a saúde humana (Limas et al., 2015). Um estudo realizado por Jianqin et al. (2016) mostrou que há uma relação da exposição ao leite A1 com o desenvolvimento de sintomas semelhantes aos de intolerância a lactose, originado da digestão da proteína A1 que gera o peptídeo β -casomorfina-7 (BCM-7).

Assim há um grande interesse em diminuir a frequência desse alelo na população, sendo que os sumários de touros têm divulgado essa informação, assim como as centrais de inseminação. Sendo assim, o objetivo do estudo em questão é genotipar touros da raça Girolando, com o intuito de determinar a frequência alélica e genotípica para o gene da β -caseína.

Material e Métodos

O estudo foi realizado em 73 touros da raça Girolando dos grupos 17^o, 18^o e 19^o do Teste de Progênie da raça. As amostras foram coletadas pela Associação Brasileiras de Criadores de Girolando e enviadas para o Laboratório de Genética Molecular (LGM) da Embrapa Gado de Leite. As amostras, sangue e sêmen, foram identificadas por identificação única do Banco de DNA de Bovinos Leiteiros (BDBL) e foram submetidas ao processo de extração de DNA. A obtenção do DNA genômico foi feita pelo protocolo de Extração de DNA Fenol - Clorofórmio- Álcool isoamílico, adaptado das técnicas de Sambrook e Russel (2001).

A quantificação das amostras foi feita em espectrofotômetro Nanodrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA Nanodrop®), onde a qualidade das amostras foi estimada a partir dos parâmetros de razão de absorvância 260/280 nm e 260/230 nm. As amostras em quantidade e qualidade suficiente foram incorporadas ao BDBL e utilizadas neste estudo e em outros em execução no LGM.

Após a quantificação, as amostras de DNA foram preparadas para realização do PCR em Tempo Real. Os primers *forward* foram utilizados para a diferenciação do alelo A1 do A2, sendo que para o alelo A1 utilizou-se o IGBhF (5' CTT CCC TGG GCC CAT CCA 3') e para o A2 o IGBpF (5' CTT CCC TGG GCC CAT CCC 3'), também se acrescentou o primer *reverse* IGBR (5' AGA CTG GAG CAG AGG CAG AG 3') nas duas reações.

As condições para a reação de PCR – Tempo Real, estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições da reação da PCR – Tempo Real.

1 ciclo	40 ciclos
50 °C – 2 minutos	95 °C – 15 segundos
95 °C – 10 minutos	62 °C – 30 segundos
	60 °C – 30 segundos

Resultados e Discussão

Foram genotipados 73 touros Girolando dos grupos 17^o, 18^o e 19^o do Teste de Progênie da Raça Girolando para os dois alelos A1 e A2 da β -caseína. As frequências genotípicas e alélicas podem ser observadas da Tabela 2.

Tabela 2. Frequências genotípicas e alélicas.

Frequência Genotípica			Frequência Alélica	
A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2
0,12	0,48	0,40	0,36	0,64

No presente estudo da raça Girolando, as frequências genóticas para A1A1, A1A2 e A2A2 foram 12%, 48% e 40%, respectivamente e as estimadas para o alelo A1 foi de 36% e para o alelo A2, 64%.

Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Silva et al. (2018), que encontrou a frequência genotípica A1A1 – 9,7%, A1A2 – 32,3% e A2A2 – 58% e alélica A1 – 26% e A2 – 74% na raça Girolando.

Conclusões

O grupo genotipado apresentou maior frequência do genótipo heterozigoto, mas também expressou alta frequência do genótipo homozigoto para o alelo A2, além de este ser o alelo mais pronunciado quando comparado ao A1 para esse grupo e não foi divergente das frequências obtidas do conjunto de todos os touros do Teste de Progênie.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica, a Girolando pelo envio das amostras e a Embrapa Gado de Leite pelo desenvolvimento do trabalho.

Referências

CIEŚLIŃSKA, A.; KAMIŃSKI, S.; KOSTYRA, E.; SIENKIEWICZ-SZŁAPKA, E. Beta-casomorphin 7 in raw and hydrolysed milk derived from cows of alternative casein genotypes. **Milchwissenschaft**, v. 62, p. 125-127, 2007.

HANUSOVÁ, E.; HUBA, J; ORAVCOVÁ, M; POLÁK, P; VRTKOVÁ, I. Genetic variants of beta casein in Holstein dairy cattle in Slovakia, **Slovak Journal Animal Science**, v. 43, p. 63-66, 2010.

JIANQIN, S; LEIMING, X; LU, X; YELLAND, G.W., NI. J., CLARKE, A. J. Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. **Nutrition Journal**, v. 15, doi: DOI 10.1186/s12937-016-0147-z, 2016.

LIMA A. C. J., LARA M. A. C. Polimorfismo do gene β -caseína em bovinos. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, v. 6, p. 280,285, 2015.

SILVA, M. V. G. B., MARTINS M. F., CEMBRANELLI, M. A. R., PANETTO, J. C. C., PAIVA, L. C., GONÇALVES, G. S., MACHADO, M. A., FAZA, D. R. L. R. **Programa de melhoramento genético da raça Girolando – Sumário de Touros/Resultado do Teste de Progênie/Junho 2018**. Embrapa Gado de Leite 2018. 65 p.

OLENSKI, K., KAMIŃSKI, S., SZYDA, J., CIESLINSKA, A. Polymorphism of the β -casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein-Friesian bulls. **Livestock Science**, v. 131, p. 137-140, 2010.

REIS, A. M., COSTA, M. R., COSTA, R. G., SUGUIMOTO, H. H., SOUZA, C. H. B., ARAGON-ALEGRO, L. C., LUDOVICO, A., SANTANA, E. H. W. Efeito do grupo racial e do número de lactações sobre a produtividade e a composição do leite bovino. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 3421-3426, 2012.

ZOCAL, R. Dez países top no leite. **Balde Branco, 17 de abril de 2017**. 2017.