

Avaliação do polimorfismo do gene da *beta*-lactoglobulina em bovinos da raça Girolando

Larissa Helena da Rocha Meira, Daisyléa de Souza Paiva, Tatiane Ribeiro de Siqueira, Isabela Fonseca, Isabella Silvestre Barreto Pinto, Raquel Marinho Alvino, Wagner Antonio Arbex, Marta Fonseca Martins Guimarães, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva

Resumo

A Beta-Lactoglobulina (LGB) representa cerca de 50 a 55% das proteínas do soro de leite de ruminantes e de alguns outros mamíferos, porém não está presente em humanos, sendo apontada como uma das responsáveis pela intolerância à proteína do leite nessa espécie. O gene codificador da beta-lactoglobulina está localizado no cromossomo 11(BTA11) de bovinos, tendo sido já identificados 12 variantes, dentre os quais os mais frequentes são as variantes alelos A e B. Vários trabalhos demonstraram que a variante A está associado a maior produção de leite e a variante B ao maior percentual de gordura, proteína e sólidos totais. Dessa forma, o leite proveniente de animais com genótipo AA é melhor para ser comercializado *in natura* e o proveniente de animais com genótipo BB é mais indicado para produção de derivados lácteos como, por exemplo, queijo. Neste trabalho foi realizada a genotipagem de 477 animais da raça Girolando para o gene *LGB*. O DNA dos animais foi extraído e amplificado pela técnica de PCR e o produto foi digerido com a enzima de restrição *Hae* III. O objetivo deste trabalho foi estimar as frequências alélicas e genotípicas e verificar se esse gene encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência do alelo A foi de 0,548 e do alelo B foi de 0,452, e as frequências genotípicas foram, 0,3186; 0,4591; 0,2222 para os genótipos AA, AB e BB, respectivamente, estando de acordo com o teste de probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,01$), sugerindo que na população examinada não está sendo selecionada para essas variantes.

Palavras-chave: beta-lactoglobulina, Girolando, PCR-RFLP

Evaluation of gene polymorphism of bovine beta-lactoglobulin in Girolando

Abstract

Beta-lactoglobulin (LGB) is an immunoglobulin that is about 50-55% of whey protein in ruminant milk and some other mammals, but it is not present in humans' milk and that could be the reason for the cow's milk intolerance. The gene encoding beta-lactoglobulin is located on bovine chromosome 11 (BAT 11), having been already identified 12 variants, among which the most common are the variants. Some studies showed a relationship between the A variant with higher milk yield and the B variant with high fat, protein and total solids percentage. Milk from cows with AA genotype is better to be commercialized *in natura* and that one from cows with genotype BB is more suitable for manufacturing dairy products like cheese. In this work, the genotyping of 477 animals Girolando breed for the LGB gene was performed. DNA was extracted and amplified by PCR and the product was digested with *Hae* III restriction enzyme. The aim of this study was to estimate the allele frequencies and genotype and to evaluate the occurrence of Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). The frequency of allele A was 0.548 and the B allele was 0.452, the genotypic frequencies were 0.3186, 0.4591, 0.2222 for genotypes AA, AB and BB, respectively, which are consistent with HWE ($p < 0.01$), suggesting that population there was not under selection for these variants.

Keywords: beta-lactoglobulin, Girolando, PCR-RFLP

Introdução

A beta-lactoglobulina (LGB) representa cerca de 50 a 55% das proteínas do soro de leite de ruminantes e de alguns outros mamíferos, mas não está presente em humanos, podendo ser um dos responsáveis pela intolerância à proteína do leite de vacas nessa espécie (BORATO et al., 2008). A proteína consiste de uma sequência de 162 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 18,4 kDa. O leite proveniente de animais com genótipo AA é recomendado para ser comercializado *in natura* e o proveniente de animais com genótipo BB é mais indicado para produção de derivados lácteos, como queijo. Doze variantes (A a J, W e Dr) já foram identificadas em bovinos, sendo as variantes A e B as mais caracterizadas e mais frequentes nas populações. Apesar de sua função biológica ainda não estar completamente estabelecida, acredita-se que a proteína deva estar envolvida no metabolismo e no transporte de retinol e de ácidos graxos (FORMAGGIONI et al. 1999). O gene *LGB* encontra-se no cromossomo 11 (BTA11) de bovinos, sendo que as variantes A e B diferem nos aminoácidos de posição 64 e 118. Na posição 64, Asp (GAT) é substituída por Gly (GGT) e na posição 118, Val (GTC) é substituída por Ala (GCC), para A e B respectivamente. A mudança na posição 118 dá origem um sítio de restrição para a enzima *Hae* III, para o alelo B o qual não está presente no alelo A (MEDRANO et al., 1990). Alguns trabalhos evidenciam que a variante A está associado à maior produção de leite, enquanto a variante B está relacionado ao maior rendimento de gordura e proteína (TSIARAS et al., 2005; HEIDARI et al., 2009). No presente trabalho foi realizada a genotipagem de touros e de vacas participantes do Programa de Melhoramento da Raça Girolando para o polimorfismo do gene *LGB*, com o objetivo de estimar suas frequências alélicas e genotípicas e verificar se este se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Material e Métodos

Foi realizada a genotipagem de 477 animais da raça Girolando participantes do Programa de Melhoramento da Raça, coordenado pela Embrapa Gado de Leite e pela Associação Brasileira dos Criadores de Girolando, sendo 93 touros e 384 vacas. Foram coletadas amostras de sêmen e/ou sangue, sendo que o DNA das amostras foi extraído utilizando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação e a avaliação da qualidade do DNA foram feitas por espectrofotometria (Nanodrop®, Wilmington, DE, EUA). Os genótipos para o gene *LGB* foram estabelecidos pela técnica de PCR-RFLP. Para a amplificação da região de interesse desse gene foram utilizados *primers* já descritos (MEDRANO et al., 1990) e as condições da PCR foram otimizadas quanto à concentração dos reagentes e da temperatura de anelamento. As reações foram conduzidas no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A digestão do produto da PCR foi realizada com a enzima de restrição *Hae* III (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o padrão de bandas observado em gel de agarose 2,5% corado com Brometo de Etídeo para o estabelecimento dos genótipos. A digestão do fragmento de PCR com esta enzima possibilita a distinção entre os alelos A e B. A PCR produz um fragmento de 262 pb que quando digerido pode produzir o seguinte padrão: (1) genótipo AA é caracterizado pela presença de duas bandas, uma de 153 pb e outra de 109 pb, (2) genótipo BB apresenta três bandas, com 109, 79 e 74 pb cada e (3) genótipo AB possui quatro bandas com 153, 109, 79 e 74 pb cada.

As frequências gênicas e genotípicas, bem como o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados por meio do programa GENEPOP web version 1.2 (RAYMOND E ROUSSET, 1995). A probabilidade de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EWH) associado às frequências genotípicas observadas foi testada pelo teste χ^2 (Qui-Quadrado) a nível de significância de 1%.

Resultados e Discussão

A frequência da variante A foi de 0,548 e da variante B foi de 0,452, estando bem distribuídos na população, com predominância da variante A. As frequências genotípicas foram de 0,3186; 0,4591; 0,2222 para os genótipos AA, AB e BB, respectivamente (Tabela 1). As frequências genotípicas diferem nesta população, mas não se distanciam do número de animais esperado, estando de acordo com o EWH ($p < 0,01$).

Os resultados encontrados em outros rebanhos de raças leiteiras como os obtidos por Tsiaras et al. (2005) e Heidari et al. (2009), em rebanhos da raça Holandesa, e por Rodrigues (2006), em a Girolando, encontraram

os alelos do gene *LGB* bem distribuídos na população, com predominância da variante A. Entretanto, Borato et al. (2008) relatou uma maior frequência da variante B em uma população de animais das raças Gir e Girolando.

Tabela 1. Frequências genotípicas, alélicas e probabilidades de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Genótipo	Número de Animais		Frequência		Equilíbrio de Hardy-Weinberg
	Observado	Esperado	Genotípica	Alélica	
AA	152	143,2350	0,3186	(A)0,548	
AB	219	236,5299	0,4591		2,6256
BB	106	97,2350	0,2222	(B)0,452	

Conclusão

De acordo com os resultados, foi possível concluir que a população estudada encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os alelos A e B do gene da *LGB*, sugerindo que estes animais não estão sendo selecionados. Havendo a predominância do alelo A em relação ao alelo B.

Referências

BORATO, B.G.; LIMA, Y. V. R.; Aquino, A. A. et. al. Effect of beta-lactoglobulin polymorphism and seasonality on bovine milk composition,. **Journal of Dairy Research**, v.75, p. 176–181, 2008.

FORMAGGIONI, P.; SUMMER, A.; MALACARNE, M. **Milk protein polymorphism: detection and difusion of the genetic variants in Bos genus**. Disponível em: <<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/formaggioni/formaggioni.htm>>. Acessado em: 10/02/2010.

HEIDARI, M.; AZARI, M. A.; HASANI, S. et.al. Association of genetic variants of β -lactoglobulin gene with milk production in a herd and a superior family of Holstein cattle, **Iranian Journal Of Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 254-257, 2009.

MEDRANO, J.F.; AQUILAR-CORDOVA, G. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. **Animal Biotechnology**, v. 1, p. 73-74, 1990.

RODRIGUES, S.G. **Estudo das frequências dos alelos a e b dos genes da kapacaseína e beta-lactoglobulina e suas associações com produção de leite em bovinos f1 girolando**. 2006. 30f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

TSIARAS, A.M.; BARGOULI, G.G.; BANOS, G.et.al. Effect of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin Loci on Milk Production Traits, **Journal of Dairy Science**; 88, 1; ProQuest Agriculture Journals pg. 327, Jan 2005.