

Pesquisa do alelo B de beta-caseína em touros da raça Girolando por tetra-primer ARMS-PCR¹

Tamires Rodrigues de Lima^{2,3}, Victor Hugo Halfeld Kelmer Maluf⁴, Rosiana Angélica Campos^{2,5}, Isabela Karoline de Aguiar Soares^{2,6}, Hyago Passe Pereira⁷, Robert Domingues⁸, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁸, Marta Fonseca Martins^{9,10}, João Cláudio do Carmo Panetto^{9,10}, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva⁹, Marco Antonio Machado^{9,10,11}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto “Utilização de ferramentas genômicas e quantitativas para maximização dos ganhos genéticos nos programas de seleção em bovinos leiteiros”, liderado por Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva

²Bolsista PIBIC CNPq,

³Graduando em Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora

⁴Graduando em Biologia - Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – UniAcademia CES/JF

⁵Graduando em Farmácia – Suprema/JF

⁶Graduando em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Juiz de Fora

⁷Doutorando em Biologia - Universidade Federal de Juiz de Fora

⁸Analista da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG

⁹Pesquisador da Embrapa Gado de Leite.

¹⁰Bolsista de Produtividade do CNPq

¹¹Orientador – marco.machado@embrapa.br

Resumo: O leite consiste em um alimento fonte de micronutrientes essenciais e está comumente presente nos hábitos alimentares do brasileiro. Entretanto, a qualidade e as propriedades do leite estão associadas a fatores genéticos dos bovinos e as proteínas integrantes de sua composição. O leite é composto por várias proteínas, na qual a beta-caseína é a mais abundante. Existem várias variantes desta proteína, sendo a A1, A2 e B as mais encontradas. A digestão da beta-caseína A1 e B no trato gastrointestinal humano gera um peptídeo bioativo denominado beta casomorfina 7, que pode estar relacionado com algumas doenças humanas importantes. Este estudo objetivou analisar as frequências alélicas e genotípicas, da variante B da beta-caseína, em touros da raça Girolando. Foram genotipados 190 animais, utilizando a técnica de *tetra-primer* ARMS-PCR. As frequências alélicas e genotípicas encontradas foram, respectivamente: A (96,8 %); B (3,2%); AA (93,7%); AB (6,3%); BB (0%). Observou-se uma baixa prevalência do alelo B na raça Girolando, o que pode estar relacionada com a seleção para o alelo A2 que vem acontecendo nos últimos anos.

Palavras-chave: Alelo B, Beta-caseína, Frequência Alélica, Girolando, *tetra-primer* ARMS-PCR

Search for beta-casein B allele in Girolando bulls by tetra-primer ARMS-PCR

Abstract: Milk is a food source of essential micronutrients and is commonly present in Brazilian eating habits. However, the quality and properties of milk are associated with genetic factors in cattle and the proteins found in its composition. Milk is composed of various proteins and beta-casein is the most abundant one. There are several variants of this protein in which A1, A2 and B are the most commonly found. The digestion of beta-casein A1 and B in the human gastrointestinal tract generates a bioactive peptide called beta casomorphine 7 which may be related to some important human diseases. This study aimed to analyze the allelic and genotypic frequencies of beta-casein variant B in Girolando bulls. A total of 190 animals were genotyped using the tetra tetra-primer ARMS-PCR technique. The allelic and genotypic frequencies found were: A (96.8%); B

(3.2%); AA (93.7%); AB (6.3%); BB (0%). There was a low prevalence of the B allele in Girolando bulls which may be related to the intensive selection for the A2 allele that has been going on in recent years.

Keywords: B Allele, Beta-casein, Allele Frequency, Girolando, *tetra-primer* ARMS-PCR

Introdução

O leite e seus derivados possuem um papel expressivo no suprimento de alimentos, sendo composto principalmente de proteínas de alto valor biológico, responsáveis pelas atividades funcionais e estruturais dos organismos vivos (SHARMA et al., 2013). Sendo assim, o leite de vaca desempenha um papel importante na dieta humana. No leite, um dos principais grupos de proteínas é a caseína, ocorrendo em cerca de 80% (Hoffman e Falvo, 2004). As propriedades e a qualidade do leite e derivados são influenciadas diretamente pelo conteúdo de suas proteínas.

A beta-caseína é a segunda proteína mais abundante no leite de vaca, constituindo até 45% das caseínas totais e contém 209 aminoácidos e seu gene codificador está localizado no cromossomo 6 (Sulimova et al., 2007). Há 13 variantes genéticas descritas (A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G) (Rahimi et al., 2015). Nas raças de gado de leite, as variantes mais comuns são A1 (CSN2-A1) e A2 (CSN2-A2). A variante B é menos frequente e as variantes A3 e C são raras. As variantes da beta-caseína (em particular A1, A2 e B) têm recebido muita atenção da comunidade científica por causa de sua influência nas propriedades tecnológicas do leite e na saúde humana.

Sendo assim, as variantes A1 e B diferenciam da variante A2 na posição 67 onde uma histidina (códon CAT) substitui uma prolina (códon CCT). Além disso, a variante B difere da variante A1 em uma substituição de arginina por serina na posição 122. A digestão da beta-caseína A1 e B no trato gastrointestinal humano tem como um de seus produtos finais um peptídeo bioativo denominado beta-casomorfina 7 (BCM-7), que é um importante peptídeo bioativo com forte atividade opioide, que pode estar relacionado com algumas doenças humanas importantes (Lien et al., 1992).

Segundo o Sumário de Touros do Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando, a raça Girolando foi criada objetivando a formação de um grupamento étnico capaz de produzir leite de modo sustentável nas regiões tropicais e subtropicais. Desse modo, a raça Girolando, cada vez mais, ganha reconhecimento nacional e internacional, sendo a preferida para produção de leite nas regiões tropicais.

Uma técnica simples e econômica de genotipagem que utiliza apenas um único PCR é denominada de *tetra-primer* ARMS-PCR (Chiapparino et al., 2004). Dois conjuntos de *primers*, os externos e internos são usados na reação (Li et al., 2014). Cada primer interno se combina com um dos *primers* externos para gerar fragmentos específicos, de acordo com o alelo presente, que podem ser facilmente observados em gel de eletroforese, diferenciando homozigotos e heterozigotos (Li et al., 2014). Os *primers* externos amplificam um grande fragmento do gene alvo, independentemente de seu genótipo.

É importante investigar a presença do alelo B da beta-caseína na raça Girolando, para futuras aplicações em programas de melhoramento genético. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar as frequências alélicas e genotípicas do Alelo B em 190 touros participantes do Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando, utilizando a técnica *tetra-primer* ARMS-PCR.

Material e Métodos

Foram utilizados 190 animais da raça Girolando, os quais integram o Banco de DNA de bovinos de Leite da Embrapa Gado de Leite. A genotipagem foi feita utilizando a técnica de *tetra-primers ARMS-PCR*. Em 25 μ L de PCR, foram usados 90 ng de DNA, 0,6 μ M de cada *primer* interno e 0,1 μ M de cada *primer* externo, 0,2 M de dNTP, 3,5 mM de $MgCl_2$, 1X de tampão de PCR (Promega, Madison, EUA) e 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, EUA). As amostras foram submetidas a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 30 s de desnaturação (94°C), 30 s de ligação e 45 s de extensão (66°C) em seguida de 5 min a 72°C para extensão final.

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para a genotipagem dos alelos da Beta-caseína (Rincon & Medrano, 2003).

Nome	Sequência 5'-3'
<i>Forward inner primer (C allele)</i>	AATATCCAGTTGAGCCCTTTACTGAATGC
<i>Reverse inner primer (T allele)</i>	CAACATCAGTGAGAGTCAGGCTCAGC
<i>Forward outer primer</i>	AACATCCCTCCTTACTCAAACCCCTG
<i>Reverse outer primer</i>	ATATCTCTCTGGGGATAGGGCACTGCTT

Os produtos resultantes da amplificação do DNA foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % corados com brometo de etídeo. A corrida foi realizada a 110 volts por 2,5 horas.

Resultados e Discussão

Dos 190 animais genotipados, 12 apresentaram o genótipo AB e 178 apresentaram o genótipo AA. As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas conforme demonstrado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Resultado da frequência alélica **Tabela 3** - Resultado da frequência genotípica

Frequência Alélica	Touros Girolando (n = 190)
A	96,8%
B	3,2%

Frequência Genotípica	Touros Girolando (n = 190)
AA	93,7%
AB	6,3%
BB	0%

A banda de 338 pares de base (pb) foi sempre visualizada e utilizada como controle positivo da reação de PCR. A banda de 217 pb foi visualizada quando o alelo A estava presente e a banda de 177 pb, quando o alelo B estava presente.

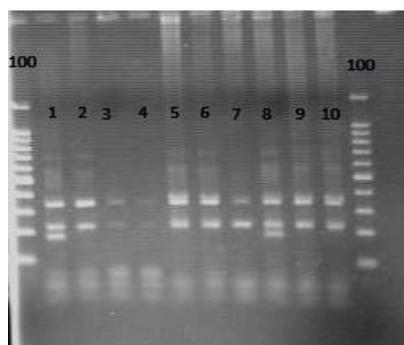


Figura 1. Foto do gel de agarose 1,5 % mostrando o padrão de bandas obtido pela técnica tetra-primer ARMS-PCR para o alelo B da Beta -caseína. As amostras 1 e 8 possuem o genótipo AB, enquanto as demais possuem o genótipo AA. Foi utilizado marcador de 100 pares de base nas extremidades.

A técnica de tetra-primer ARMS PCR foi eficaz para calcular a frequência do alelo B da beta-caseína. O tamanho das bandas amplificadas foi diferente o suficiente para serem distinguidas por eletroforese em gel de poliacrilamida 1,5 %.

A frequência do alelo B foi de 6% de acordo com o trabalho de Dai et al. (2016), que testou vacas chinesas da raça Holandês. Kaminsky et al (2007) reportou a frequência da variante B em vacas holandesas entre 1 e 10,7%, de diferentes regiões.

Conclusões

Observamos na raça Girolando uma baixa incidência do alelo B para beta-caseína. Isso demonstra que a maioria dos touros da raça Girolando não apresenta a variante alélica B da beta-caseína, a qual está correlacionada ao desenvolvimento de doenças em humanos. Isto pode estar relacionado com a seleção para o alelo A2 que vem sendo intensamente realizada nos últimos anos.

Referências

- CHIAPPARINO, E.; LEE, D.; DONINI, P. Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. **Genome**, [S. l.], v.47, p. 414-20, 2004.
- EMBRAPA. Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando/Sumário de Touros. Disponível em https://ainfo.chptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224459/1/DOC-255_Sumario-Touros_Girolanda-2021.pdf. Acesso em: 9 ago. 2021
- HOFFMAN, J.; FALVO, M. Protein-which is best? **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 3, p. 118-130, 2004.
- KAMINSKI, S.; CIESLINSKA, A.; KOSTYRA, E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of Applied Genetics**, v.48, p.189–198, 2007.
- LIEN, S.; ALESTROM, P.; KLUNGLAND, H.; ROGNE, S. Detection of multiple β -casein alleles by amplification created restriction sites (ACRS). **Animal Genetics**, v.23, 333–338, 1992. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1992.tb00155.x>
- LI, M.; SUN, X.; JIANG, J.; SUN, Y.; LAN, X.; LEI, C.; ZHANG, C.; CHEN, H. Tetra-primer ARMS-PCR is an efficient SNP genotyping method: An example from SIRT2. **Analytical Methods**, v.6 p. 1835-1840, 2014.
- RAHIMI, Z.; GHOLAMI, M.; YARI, K. 2015. Evaluation of beta-casein locus for detection of A1 and A2 alleles frequency using allele specific PCR in native cattle of Kermanshah. **Biharean Biologist**, v.9, p.85-87, 2015.
- RINCON, G.; MEDRANO, J. F. Single nucleotide polymorphism genotyping of bovine milk protein genes using the tetra-primer ARMS-PCR. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 120, p. 331-337, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0388.2003.00405.x>
- SHARMA, V.; SHARMA, N.; JAWED, B.; NAUTIYAL, S. C.; SINGH, R. K. High resolution melt curve analysis for the detection of A1, A2 β -casein variants in Indian cows. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v.3, p.144-148, 2013.

SULIMOVA, G. E.; AZARI, M. A. RHOSTAMZADEH, J.; ABADI, M. R. M.; LAZEBNY, O. E. κ - casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. **Russian. Journal of Genetics**, v.43, p.73-79, 2007.