

Genotipagem de genes de proteínas do leite, kappa-caseína, beta-caseína e beta-lactoglobulina, em touros Gir e Girolando

Letícia Milena de Jesus^{(1) (7)}, Ariany Lacerda Nogueira⁽²⁾, Lidiane Loeffler Lima⁽³⁾, Raissa Cury Ferreira⁽⁴⁾, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁽⁵⁾, Robert Domingues⁽⁶⁾, Marco Antonio Machado⁽⁶⁾, Marta Fonseca Martins⁽⁶⁾, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva⁽⁶⁾.

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq.), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estudante de graduação, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Estudante de graduação, Centro Universitário do Sudeste Mineiro, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Estudante de graduação, Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁶⁾Pesquisadores, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁷⁾E-mail: leticiamilenadejesus@gmail.com.

Resumo — O leite fornece nutrientes essenciais e contém proteínas importantes como caseínas, lactoglobulinas e albuminas, que influenciam a sua qualidade, como o aumento do rendimento de alguns produtos lácteos. Os programas de melhoramento genético genotipam os touros para seleção dos alelos favoráveis destas proteínas. Assim, cada alelo dessas proteínas tem efeitos específicos, na kappa-caseína, o alelo A está associado a menor rendimento para produção de queijo, enquanto o alelo B resulta em maior rendimento. Enquanto para beta-caseína, o alelo A1 está ligado a problemas nutricionais e de saúde em humanos, já o alelo A2 promove maior produção de leite e proteína. Por fim, na beta-lactoglobulina, o alelo A aumenta a produção de leite, enquanto o alelo B confere maior teor de proteína e gordura. Esse estudo teve como objetivo a identificação dos genótipos para os genes da beta-lactoglobulina, kappa e beta-caseína para divulgação no Sumário de Touros da Raça Girolando e Gir Leiteiro. Para isto, foi extraído DNA de touros das raças Girolando (N=91) e Gir (N=42). Utilizou-se a técnica de amplificação por tetra ARMS-PCR e PCR-RFLP, seguidas de eletroforese para a identificação dos genótipos. O resultado evidenciou uma predominância do genótipo A2A2 na beta-caseína, com frequências de 92,86% na raça Gir e 65,9% na raça Girolando. Enquanto na kappa-caseína, a frequência do genótipo AA foi de 92,9% na Gir e 51,6% na Girolando. A beta-lactoglobulina exibiu distribuição equilibrada dos alelos A e B, com o genótipo AB apresentando 52,3% na Gir e 64,1% na Girolando. Estes resultados são relevantes para programas de melhoramento genético, pois com essas informações nos sumários de touros Gir e Girolando, os produtores podem escolher os melhores touros com base nas características desejáveis.

Termos para indexação: genotipagem, proteínas do leite, kappa-caseína, beta-caseína, beta-lactoglobulina, melhoramento genético.

Genotyping of Milk Protein Genes, Kappa-Casein, Beta-Casein, and Beta-Lactoglobulin, in Gir and Girolando Bulls

Abstract — Milk provides essential nutrients and contains important proteins such as caseins, lactoglobulins, and albumins, which influence its quality, including increasing the yield of certain dairy products. Genetic improvement programs genotype bulls to select favorable alleles for these proteins. Each allele of these proteins has specific effects: for kappa-casein, the A allele is associated with lower cheese production yield, while the B allele results in higher yield. Regarding beta-casein, the A1 allele is linked to nutritional and health issues in humans, whereas the A2 allele is associated with higher milk and protein production. In the case of beta-lactoglobulin, the A allele increases milk production, while the B allele contributes to higher protein and fat content. This study aimed to identify the genotypes for the beta-lactoglobulin, kappa-casein, and beta-casein genes for publication in the Girolando and Gir Leiteiro Bull Summary. For this purpose, DNA was extracted from

bulls of the Girolando (N=91) and Gir (N=42) breeds. The tetra ARMS-PCR and PCR-RFLP amplification techniques were used, followed by electrophoresis to identify the genotypes. The results showed a predominance of the A2A2 genotype in beta-casein, with frequencies of 92.86% in the Gir breed and 65.9% in the Girolando breed. In kappa-casein, the frequency of the AA genotype was 92.9% in Gir and 51.6% in Girolando. Beta-lactoglobulin exhibited a balanced distribution of A and B alleles, with the AB genotype presenting 52.3% in Gir and 64.1% in Girolando. These results are relevant for genetic improvement programs, as the information in the Gir and Girolando bull summaries allows producers to select the best bulls based on desirable traits.

Index terms: genotypin, milk proteins, kappa-casein, beta-casein, beta-lactoglobulin, genetic improvement.

Introdução

O leite é uma fonte nutritiva essencial na alimentação humana por milênios, fornecendo uma rica diversidade de nutrientes como vitaminas, minerais e proteínas (Renhe, 2008). A composição do leite destaca-se pelas caseínas e proteínas do soro, cuja qualidade é influenciada diretamente pelo seu conteúdo proteico, com destaque para as caseínas, lactoglobulinas e lactoalbuminas (Panetto et al., 2024).

Alguns genes de proteínas do leite, como a kappa-caseína e a beta-caseína, são de grande interesse para a cadeia produtiva. A kappa-caseína apresenta genótipos AA, AB e BB, sendo que o genótipo BB está associada a um maior rendimento na produção de queijo em relação às demais (Panetto et al., 2023). Em relação à beta-caseína, as variantes A1 e A2 provocam reações diferentes no consumo humano de leite bovino. A proteína A1 pode trazer efeitos adversos à saúde devido à formação do peptídeo betacasomorfina -7 (BCM-7) quando digerida no trato digestivo (Barbosa et al., 2019). Já a proteína A2 está associado a uma melhor digestibilidade pela não formação do BCM-7 quando a proteína é hidrolisada (Silva et al., 2023).

A beta-lactoglobulina é a principal proteína presente no soro do leite, sendo os alelos A e B os mais frequentes. O alelo A está associado a uma maior produção de leite. Em contraste, o alelo B está associado a níveis mais altos de gordura e proteína. Assim, o leite de animais com genótipo AA é recomendado para consumo direto, enquanto o leite de animais com genótipo BB é mais apropriado para a fabricação de produtos lácteos, como queijo (Silva et al., 2024).

Os Programas Nacionais de Melhoramento de Girolando e do Gir Leiteiro foram criados a partir de uma parceria entre as Associações das respectivas raças e a Embrapa Gado de Leite com o objetivo de identificar touros geneticamente superiores para a produção de leite (Panetto et al., 2024). A análise dos genótipos das proteínas do leite permite aos produtores identificarem touros mais eficientes na produção de leite e derivados, aumentando a produção e permitindo cruzamentos direcionados. Assim, o objetivo deste trabalho foi genotipar touros das raças Gir e Girolando participantes dos programas de melhoramento das raças Gir e Girolando.

O conteúdo desse documento vai ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, nos seguintes objetivos específicos: ODS 1 – “Erradicação da pobreza: Acabar com a pobreza em todas as suas formas, em todos os lugares”; ODS 3 – “Saúde de qualidade: Assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos,

em todas as idades”; ODS 8 – “Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos”.

Material e métodos

A genotipagem foi realizada com as etapas de extração do DNA, quantificação, PCR e eletroforese. A extração do DNA das 42 amostras de sêmen de Gir e 91 amostras de Girolando foi feita com um protocolo baseado em fenol: clorofórmio adaptado de Sambrook e Russel (2001). A quantificação foi realizada por espectrofotometria no equipamento NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, EUA). A genotipagem das proteínas do leite seguiu a metodologia para kappa-caseína de Ricon e Medrano, 2003, para beta-caseína de Ali et al. (2019) e para beta-lactoglobulina, de Medrano e Cordova, 1990. Após a técnica de PCR, as reações foram reveladas em gel eletroforese em agarose 1,5% e 2% para os genes da beta-caseína e kappa-caseína respectivamente e em poliácridamida 8% para os genes da beta-lactoglobulina. Os genótipos foram identificados a partir da leitura das bandas nos géis.

Resultados e discussão

A análise dos genótipos das 42 amostras de Gir e das 91 de Girolando foi realizada com base nos tamanhos das bandas identificadas no gel de eletroforese. Na Tabela 1, é apresentado a frequência alélica observada para as diferentes raças, enquanto na Tabela 2, é apresentada a frequência genotípica.

Tabela 1. Frequência Alélica dos genes que codificam as proteínas beta-caseína, beta-lactoglobulina e kappa-caseína nas raças Gir e Girolando.

Gene		Beta-Caseína		Beta-lactoglobulina		Kappa-Caseína	
Alelo		A1	A2	A	B	A	B
Raça	Gir	0,036	0,964	0,547	0,453	0,964	0,036
	Girolando	0,176	0,824	0,538	0,462	0,742	0,258

Tabela 2. Frequência Genotípica dos genes que codificam as proteínas beta-caseína, beta-lactoglobulina e kappa-caseína nas raças Gir e Girolando.

Gene		Beta-Caseína			Beta-lactoglobulina			Kappa-Caseína		
Genótipo		A1A1	A1A2	A2A2	AA	AB	BB	AA	AB	BB
Raça	Gir	0	0,0714	0,9286	0,285	0,523	0,19	0,929	0,071	0
	Girolando	0,011	0,330	0,659	0,217	0,641	0,141	0,516	0,451	0,033

Na raça Gir, o genótipo A2A2 apresenta uma frequência de 92,86%, enquanto na raça Girolando, essa frequência é de 65,9%. Estes resultados estão de acordo com os resultados da literatura, em raças zebuínas, a frequência do alelo A2 é muito alta, variando de 92% a 100%, como as raças leiteiras como Gir, Tharparkar, Rath, Red Sindhi e Sahiwal (Mukesh et al., 2022). A predominância do alelo A2 na beta-caseína é um resultado promissor, dado o interesse crescente em produtos A2 devido aos seus potenciais benefícios à saúde.

Em um estudo de Ladyka et al. (2022) sobre genótipos da kappa-caseína, foi demonstrado que diferentes raças leiteiras possuem distribuições variadas dos genótipos e que existe potencial para aumentar a seleção para genótipos BB e melhorar a qualidade do leite e do

queijo. Na raça Gir, o genótipo AA é apresentada a frequência de 92,9%, enquanto na raça Girolando, essa frequência é de 51,6%.

Na raça Gir, o genótipo AB tem uma frequência de 52,3%, e na raça Girolando, a frequência é de 64,1%. Boushaba e Tabet-Aoul (2024) investigou a frequência de alelos e genótipos em populações locais de gado argelino e demonstram a prevalência do alelo B em relação aos outros, corroborando com o estudo Borato et al. (2008) que apresentou uma maior frequência da variante B em rebanhos das raças Holandesa e Girolando no Brasil.

A variação genética entre raças leiteiras é influenciada por seleção artificial, adaptações locais e práticas de manejo. Análises dos genótipos de kappa-caseína, beta-caseína e beta-lactoglobulina mostram a complexidade genética do gado leiteiro e suas implicações para a produção de leite. A seleção genética para qualidade do leite busca aumentar alelos benéficos, como o A2 na beta-caseína. A seleção de alelos da kappa-caseína também se relaciona com o tipo de produto desejado. Assim, estratégias de melhoramento genético podem melhorar a produção de leite e a qualidade nutricional dos seus derivados, atendendo à demanda por produtos lácteos mais saudáveis e de maior valor agregado.

Conclusões

A avaliação dos polimorfismos dos genes das proteínas do leite em touros Gir e Girolando revelou uma alta predominância do alelo A2 para a beta-caseína, o que é promissor para a produção de leite A2, e uma alta frequência do genótipo AA na kappa-caseína, o que mostra um campo a ser melhorado quando o interesse é a produção de queijos. Estes resultados são relevantes para programas de melhoramento genético, pois com essas informações nos sumários de touros Gir e Girolando, os produtores podem escolher os melhores touros com base nas características desejáveis.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, INCT de Ciência Animal/ CNPq e a Embrapa Gado de Leite pelo apoio recebido.

Referências

- ALI, W. R.; AMIN, I.; ASIF, M.; MANSOOR, S. Genotyping test development and genotyping survey of Pakistani population of Holstein Friesian imported from different origins for A1/A2 SNP in Beta-casein gene. **BioRxiv**, article 720045, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1101/720045>.
- BARBOSA, M. G.; SOUZA, A. B.; TAVARES, G. M.; ANTUNES, A. E. C. Leites A1 e A2: revisão sobre seus potenciais efeitos no trato digestório. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 26, e019004, 2019. DOI: <https://doi.org/10.20396/san.v26i0.8652981>.
- BORATO, B. G.; LIMA, Y. V. R.; AQUINO, A. A.; FERNANDES, R. H. R.; GARCIA, J. F.; SANTOS, M. V. Effect of beta-lactoglobulin polymorphism and seasonality on bovine milk composition. **Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 2, p. 176-181, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0022029908003269>.
- BOUSHABA, N.; TABET-AOUL, N. Allele and genotype frequencies of β -lactoglobulin gene using PCR-RFLP in Algerian local cattle populations. **Molecular Biology Research Communications**, v. 13, n. 1, p. 43-49, 2024. DOI: <https://doi.org/10.22099%2Fmbr.2023.47661.1841>.
- LADYKA, V.; DREVYTSKA, T.; PAVLENKO, J.; SKLIARENKO, Y.; LAHUTA, T.; DREVYTSKYI, O.; DOSENKO, V. Evaluation of cow genotypes by kappa-casein of dairy breeds. **Acta Fytotechnica et Zootechnica**, v. 25, n. 1, p. 1-6, 2022. DOI: <https://doi.org/10.15414/afz.2022.25.01.1-6>.

MEDRANO, J. F.; AGUILAR-CORDOVA, E. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. **Animal Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 73-77, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1080/10495399009525730>.

MUKESH, M.; SWAMI, S.; BHAKHRI, G.; CHAUDHARY, V.; SHARMA, V.; GOYAL, N.; VIVEK P.; DALAL V.; MOHANTY, A. K.; KATARIA, R. S.; KUMARI, P.; NIRANJAN, S. K.; SODHI, M. Demographic pattern of A1/A2 beta casein variants indicates conservation of A2 type haplotype across native cattle breeds (Bos indicus) of India. **3 Biotech**, v. 12, n. 8, 167, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03232-0>.

PANETTO, J. C. do C.; SILVA, M. V. G. B.; VERNEQUE, R. da S.; MACHADO, M. A.; FERNANDES, A. R.; MARTINS, M. F. (ed.). **Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro: sumário brasileiro de touros: 7a avaliação genômica de touros: resultado do teste de progênie**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2024. 115 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 283). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1163946>. Acesso em: 15 jul. 2024.

PANETTO, J. C. do C.; SILVA, M. V. G. B.; VERNEQUE, R. da S.; MACHADO, M. A.; FERNANDES, A. R.; TEIXEIRA, R. B.; MACHADO, C. H. C.; MARTINS, M. F.; REIS, D. R. de L.; BORGES, C. A. V.; OLIVEIRA, J. C. de; VENTURA, H. T.; PEREIRA, M. A.; MACHADO, M. S.; MOURA, G. M. (ed.). **Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro: sumário brasileiro de touros: 6ª avaliação genômica de touros: resultado do teste de progênie - abril 2023**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023. 126 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 273). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1153450>. Acesso em: 15 jul. 2024.

RENHE, I. R. T. O papel do leite na nutrição. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n. 363, p. 36-43, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SILVA, D. B. da; REIS, E. M. B.; SANTOS, B. R. C. dos; MONTAGNER, A. E. A. D.; PINEDO, L. A. Ocorrência de animais produtores de leite A2A2: estudo de caso em uma propriedade do município de Rio Branco - Acre. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 6, n. 3, p. 2808-2818, 2023. DOI: <https://doi.org/10.34188/bjaerv6n3-065>.

SILVA, M. V. G. B.; MARTINS, M. F.; FERREIRA JÚNIOR, E.; PANETTO, J. C. do C.; MACHADO, M. A. (ed.). **Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando: sumário de touros: resultado do teste de progênie (avaliação genética/ genômica): junho 2024**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2024. 135 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 288). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1164791>. Acesso em: 15 jul. 2024.

RINCÓN, 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, n. 5, p. 331-337, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0388.2003.00405.x>.