

AVALIAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO A1/A2 NO GENE DA BETA-CASEÍNA EM ANIMAIS DA RAÇA GIR LEITEIRO

SOUSA, N. F. M. S¹; CELESTINO, C. S²; GOMES, T. C. S³; LACORTE, G. A. S⁴; BASTOS, R. T. S⁵; STEINBERG, R. S. S⁶;

1 Nathan Felipe Morais de Sousa, Bolsista PIBIC IFMG, Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMG - Campus Bambuí, Bambuí - MG; nathanfelipe2223@gmail.com

2 Carina dos Santos Celestino, Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMG - Campus Bambuí, Bambuí - MG

3 Talita Gomes da Costa, Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMG - Campus Bambuí, Bambuí - MG

4 Gustavo Augusto Lacorte: Pesquisador do IFMG, Campus Bambuí - MG

5 Rafael Teixeira Bastos: Pesquisador do IFMG, Campus Bambuí - MG

6 Raphael Steinberg da Silvar: Pesquisador do IFMG, Campus Bambuí; raphael.silva@ifmg.edu.br

RESUMO

O leite bovino é um alimento que constitui uma fonte comum de sais minerais, vitaminas, lipídios, carboidratos e proteínas de origem animal altamente consumido em todo o mundo, fornecendo assim, diversos nutrientes na grade nutricional humana. A composição do leite da vaca contém inúmeros grupos proteicos, dentre eles, as caseínas, que se subdividem em Alpha S1 e S2, Beta e Kappa, a qual a β -caseína é a segunda mais abundante. As caseínas são responsáveis por provocar sensibilidade nos indivíduos devido a um subproduto de sua digestão. Nesse sentido, o estudo objetivou a identificação das frequências alélicas e genotípicas de variantes alélicas dos genes da β -caseína em rebanhos Gir Leiteiros, a fim de identificar e estudar os animais que são capazes de traduzir proteínas formantes de subprodutos tóxicos à dieta humana. Foram coletadas as amostras de tecido sanguíneo de 238 bovinos da raça Gir Leiteiro, os quais foram submetidos ao processo de extração do DNA genômico. Onde o material coletado foi processado a fim de ter os glóbulos brancos isolados dos demais componentes do sangue para que os mesmos pudessem ser digeridos em meio enzimático, desta forma, rompendo as membranas células e expondo o conteúdo genético, permitindo a extração e isolamento do mesmo. Os resultados obtidos das análises de extração de DNA revelaram que do total de amostras recolhidas, houve uma grande maioria de vacas apresentando alelo A2 em seu genoma, sendo o alelo A1 pouco presente. Em relação a análise genotípica, o genótipo A1A1 não foi encontrado em nenhum dos animais, em contrapartida, o genótipo A2A2 apareceu em mais de 90% dos bovinos estudados. Com base nesse tipo de estudo, é possível genotipar o gado reprodutor a fim de aumentar a população de indivíduos homocigóticos para o alelo A2, tornando se uma alternativa interessante para o produtor, podendo levar a vários benefícios, tais como: atestar a qualidade do leite a fim de obter um produto com alto valor comercial, reduzir a frequência de gado com o alelo A1 no rebanho e a produção de produtos com certificação de qualidade.

Palavras chave: Polimorfismo, marcadores moleculares, leite, beta-caseína, primers

INTRODUÇÃO:

A produção de leite brasileira tem um enorme potencial lucrativo na indústria pecuária, atuando como importante ferramenta geradora de empregos e produtora de renda, tanto em larga quanto em curta escala, além de constituir parte da base alimentar da população brasileira (VILELA, 2002). O leite bovino é um alimento que constitui uma fonte comum de sais minerais, vitaminas, lipídios, carboidratos e proteínas de origem animal, altamente consumido em todo o mundo fornecendo assim, diversos nutrientes na grade nutricional humana (HAUG et al., 2007).

O leite bovino é composto por inúmeros grupos proteicos, dentre eles, as caseínas, que se subdividem em Alpha S1 e S2, Beta e Kappa (HANUSOVÁ et al., 2010). Dentre as caseínas, a β -caseína é a segunda mais abundante no leite bovino, representando até 45% das caseínas totais deste alimento. Esta proteína contém 209 aminoácidos, onde os genes para sua produção estão situados no cromossomo 6 do genoma destes animais (SULIMOVA et al., 2007).

São conhecidas 13 variantes genéticas em polimorfismo da β -caseína: A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G, onde as variantes mais comuns são CSN2-A1 e CSN-A2, respectivamente A1 e A2 (RAHIMI, 2015).

As caseínas são responsáveis por provocar sensibilidade nos indivíduos onde, ao serem digeridas no estômago, convertem-se em compostos opióides denominados de β -casomorfina, em especial, a β -

casomorfina-7 (BCM-7), onde morfina está presente. A BCM7 é um peptídeo bioativo que se encontra associado ao alelo A1 e ausente no alelo A2 da β -caseína e, tem-se fortes evidências que a ingestão de leite contendo a β -caseína A1, na presença da BCM-7, provoque respostas alérgicas. Por outro lado, o alelo A2 da β -caseína não apresenta ligações aparentes com tais problemas de saúde (WOODFORD, 2008).

O polimorfismo entre as β -caseínas A1 e A2 é caracterizado pela substituição de um nucleotídeo de citosina por nucleotídeo adenina no gene codificante da β -caseína, localizado no exon 7, que ao serem traduzidos em proteínas, produzem uma alteração na cadeia polipeptídica, onde a histidina, que está presente na variante A1, é substituída por prolina na variante A2, onde a modificação dos peptídeos ocorre na 67ª posição da cadeia da β -caseína, constituindo assim a única alteração entre as proteínas expressas através dos alelos A1 e A2 (STEWART et al., 1987; DAMIANE et al., 1992; VERCESI FILHO et al., 2012; SHARMA et al., 2013)

Desta forma, este estudo teve como objetivo genotipar as variantes alélicas A1 e A2, do gene da β -caseína bovina em rebanhos da raça Gir Leiteiros e determinar a frequência alélica e genotípica destes polimorfismos na referida raça.

METODOLOGIA:

A coleta de sangue foi realizada entre os anos de 2017 e 2019, em cinco fazendas de Gir Leiteiro Puro de Origem, pertencentes ao Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro (PNMGL). Foram coletadas as amostras de tecido sanguíneo de 238 bovinos da raça Gir Leiteiro. Cada amostra continha aproximadamente 4 ml de sangue, colhidos em um tubo vedado e a vácuo (vacutainer) com anticoagulante EDTA, devidamente identificadas, onde foram acondicionadas em geladeira a 4°C até o momento do uso.

Posteriormente, todo o volume de sangue coletado, de forma individual, foi transferido para tubos de polipropileno (15 mL) identificados com a numeração do animal e o código do laboratório, assim, foi dado início a processo de extração do DNA genômico.

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais, localizado Bambuí/MG. Este projeto teve apoio financeiro do IFMG.

Este trabalho faz parte de um projeto maior intitulado “Desenvolvimento de marcador molecular para o melhoramento genético de zebuínos leiteiros da raça GIR” sob coordenação do prof. Dr. Rafael Bastos.

OBTENÇÃO DOS LEUCÓCITOS

Para a etapa de extração do DNA genômico de sangue, foi utilizada a metodologia *extração de DNA de sangue mediante precipitação com sal*, adaptado de Olerup & Zetterquist (1992). Inicialmente dentro de cada tubo de 15 mL contendo sangue, foram adicionados 4ml de Tampão de Hemólise, seguido de incubação em banho de gelo a 4°C por 15 minutos. Ao término do banho de gelo, as amostras foram centrifugadas a 1500 RPM, onde, foram obtidos um sobrenadante com células sanguíneas lisadas e um *pellet* de glóbulos brancos no fundo do tubo. Esse procedimento foi repetido até que somente leucócitos estivessem presentes. Os leucócitos foram transferidos para tubos 1,5 mL, onde foram centrifugados a 13.300 RPM durante 1 minuto. Após a centrifugação, um *pellet* leitoso de leucócitos foi formado.

OBTENÇÃO DO DNA

O *pellet* previamente obtido foi colocado em um Tampão de Digestão contendo proteinase K e incubado em banho maria a 65°C *overnight*.

Após a digestão, foram adicionados TE e NaCl a 5M, seguido de incubação em banho de gelo a -20°C por 15 minutos, a fim de precipitar as proteínas. Ao fim do banho de gelo, obteve-se um precipitado proteico que foi centrifugado a 13.300 RPM por 15 minutos, onde um *pellet* de proteínas foi formado no fim do tubo, e o DNA manteve-se em solução no sobrenadante.

O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL onde o material genético foi precipitado, utilizando Álcool etílico 99.9% P.A. Por fim, uma nova centrifugação de 15 minutos a 13.300 RPM foi feita e um *pellet* de DNA foi formado.

O *pellet* obtido foi lavado em solução de álcool etílico 70%, e seco em estufa, a 65°C, durante 30 minutos. O *pellet* seco foi ressuscitado em TE, onde foi armazenado no Banco de DNA do Laboratório de Biologia Molecular do IFMG – Campus Bambuí a 4°C.

PCR

Para a amplificação por PCR alelo específica de um fragmento de 244 pares de bases correspondente a região de interesse do gene da beta-caseína, foi utilizado um par de primers (*Forward* e *Reverse*) previamente desenhados complementares às regiões de interesse, sendo que cada tipo de primer *Forward* era específico para cada alelo e o primer *Reverse* comum aos dois (GANGULY et al., 2013). O primer do alelo A1 foi chamado de IGBhF e o do alelo A2 de IGBpF. As sequências de nucleotídeos dos primers, são:

Forward - IGBhF: 5' CTT CCC TGG GCC CAT CCA 3'

Forward - IGBpF: 5' CTT CCC TGG GCC CAT CCC 3'

Reverse - IGBR: 5' AGA CTG GAG CAG AGG CAG AG 3'

As reações de PCR foram realizadas de forma em que uma amostra de DNA fosse amplificada de duas formas diferentes, uma em cada tubo, onde o alelo A1 foi amplificado utilizando os primers IGBhF e IGBR, e em outro tubo amplificando o alelo A2 ao usar os primers IGBpF e IGBR. A reação de PCR foi feita em um volume final de 25 µL/amostra, contendo 4 µL de DNA genômico a 100 ng/ µL, 1,3 µL de cada primer a 10 pmol/ µL, 0,8 µL de MgCl₂, 2,0 µL Tampão 10x IIB Phoneutria®, 1 µL de dNTPs a 10 mM, 1 U de Taq DNA polimerase Phoneutria® (0,2 µL) e 14,4 µL de H₂O ultrapura Phoneutria®. Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador Eppendorf®, com o seguinte padrão: 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial do DNA, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 30 ciclos a 66° C por 30 segundos para anelamento dos primers e 30 ciclos a 72°C por 30 segundos para extensão da Taq Polimerase. Findando com ciclo de 72 °C por 5 minutos. Por fim, as amostras foram mantidas em um ciclo infinito a 4°C, a fim de conservá-las, até que fossem retiradas do equipamento.

Após a amplificação da região de interesse do gene da beta caseína pela PCR, o produto da reação, em volume de 5µL, foi misturado a 1µL de Tampão TA 10X e carregado em gel de Poliacrilamida a 6,5%. O carregamento ocorreu de forma em que cada amostra tivesse duas canaletas, uma para o alelo A1 e outra para o alelo A2. Também foi utilizado 3µL de DNA *Ladder* 50kb Cellco®

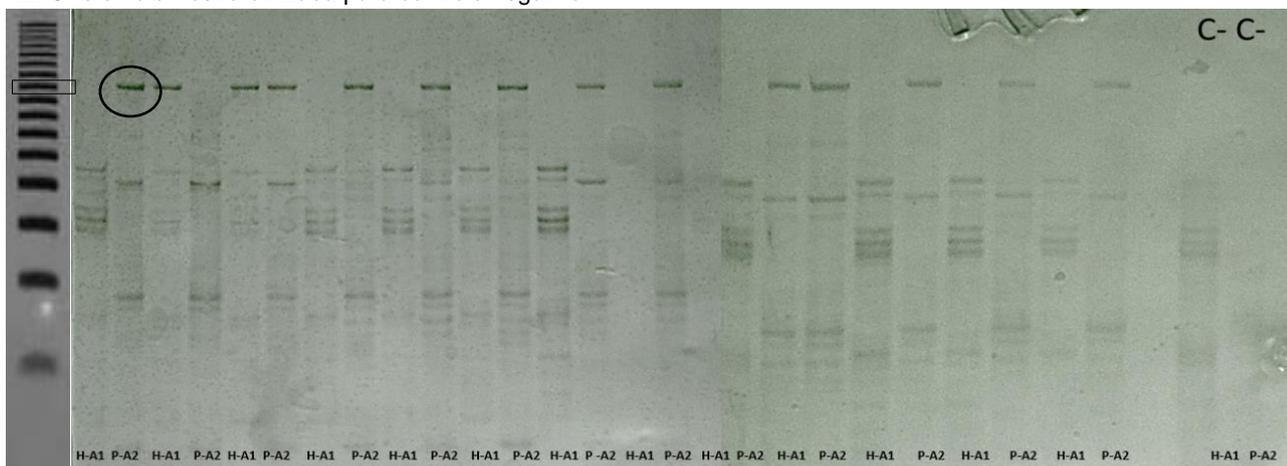
As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5%, em tampão TBE 1X, por 1:30h à 150v.

Após a resolução dos fragmentos em eletroforese, para a visualização do padrão de migração das bandas de DNA no gel, foi realizado um procedimento de coloração e revelação, onde o gel foi submetido a 3 processos com 20 minutos de duração cada: 1 - fixação em solução de Ácido Acético e álcool; 2 - coloração em Nitrato de Prata; 3 - revelação em Formaldeído e Hidróxido de Sódio. Desta forma, os padrões de banda puderam ser visualizados e analisados, e os animais puderam ser genotipados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

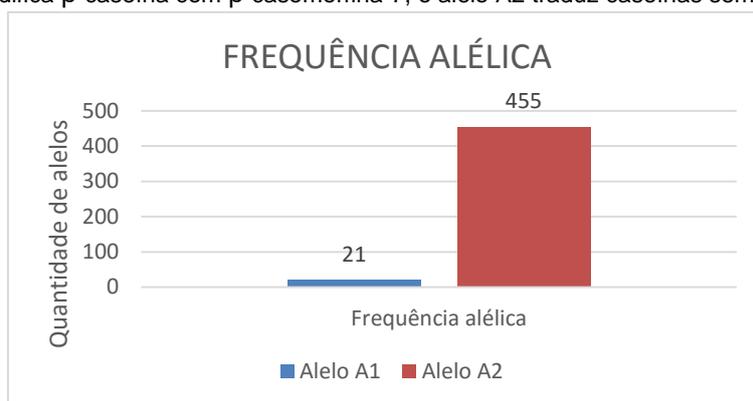
A técnica utilizada para extração do DNA genômico de tecido sanguíneo de vacas da raça Gir Leiteiro se mostrou eficiente conforme relatada na Figura 1, na qual a primeira banda de cada canaleta, formadas pelo padrão de migração do DNA, foi gerada pelo gene de interesse amplificado na reação de PCR, que foi carregada em gel de acrilamida e mostra uma quantidade satisfatória de DNA. Uma quantidade pequena das amostras apresentaram bandas arrastadas o que sugere sinais de degradação do DNA. (SALMAM e LAUREANO, 2006). Contudo, esses sinais de degradação do DNA não comprometeram as análises posteriores.

Figura 1. Gel em poliacrilamida [6,5%] corado com nitrato de prata, destacando bandas, dentro de um círculo, com tamanho de 244 pares de base formadas pelo padrão de migração do DNA em procedimento eletroforético. Em resposta à alta sensibilidade do método de coloração, percebe-se bandas inespecíficas em grande parte das canaletas, porém, as mesmas não interferem na análise dos resultados. O retângulo atesta o tamanho da banda do *Ladder* em relação a banda do gel. H-A1 significa que a caneta foi amplificada para o gene contendo o alelo A1, P-A2 para o gene A2. C- é uma amostra utilizada para controle negativo.



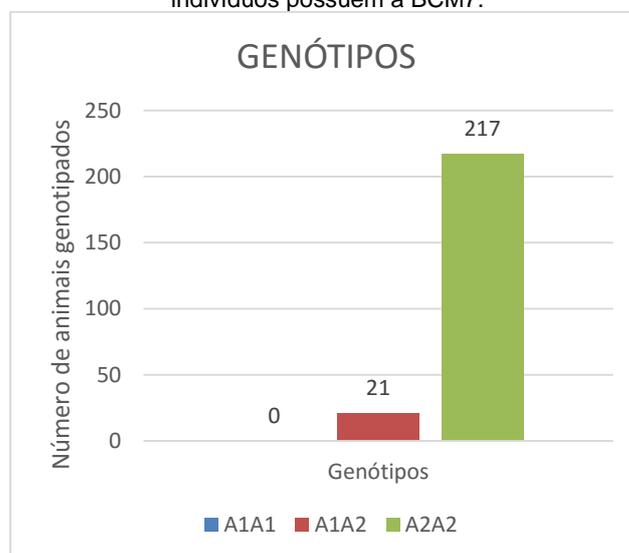
Ao analisar a frequência alélica apresentada entre os 238 animais da raça Gir Leiteiro estudados (Figura 2), nota-se a seguinte relação: 95,5% dos alelos apresentados entre os animais são do tipo A2, ou seja, 95,5% dos alelos encontrados codificam proteínas sem os compostos opióides; apenas 4,5% dos alelos encontrados são capazes de gerar proteínas que se degradam em BCM-7.

Figura 2. Gráfico representando a frequência alélica, em um total de 238 amostras (476 alelos), onde cada amostra possui 2 alelos, com 3 possíveis combinações genotípicas (A1A1, A1A2 e A1A2). A barra azul simboliza a quantidade de alelos A1 encontrados nos animais genotipados, a barra vermelha a quantidade de alelos A2. O alelo A1 é uma parte do gene que codifica β -caseína com β -casomorfina-7, o alelo A2 traduz caseínas sem β -casomorfina-7.



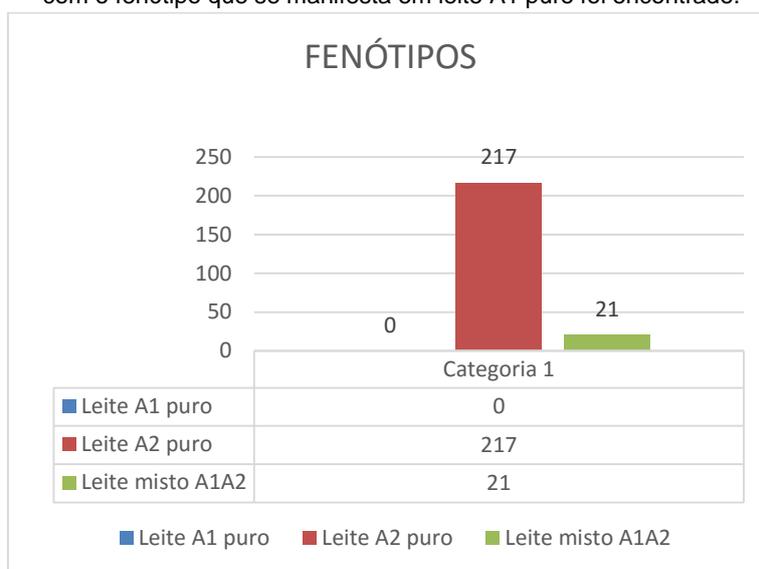
Os animais genotipados da raça Gir Leiteiro apresentaram uma frequência genotípica onde 91,2% (217 vacas) dos animais são A2A2; 8,8% (21 vacas) A1A2 e nenhum animal apresentou o genótipo A1A1. (Figura 3).

Figura 3. Gráfico representando a relação entre os genótipos encontrados nos 238 animais genotipados. Nota-se que o genótipo A1A1, onde todas as β -caseínas produzidas por esses indivíduos possuem β -casomorfina-7 (BCM7), é ausente. Os indivíduos apresentados pela barra vermelha mostram a quantidade de animais que possuem o genótipo A1A2, no qual apenas uma parte das β -caseínas produzidas por esses bovinos possuem a BCM7. Já a barra verde simboliza a quantidade de animais que possuem o genótipo A2A2, onde nenhuma das β -caseínas produzidas por esses indivíduos possuem a BCM7.



Ao analisar as genotipagens, pôde-se inferir também os fenótipos encontrados nos animais estudados, onde nenhum dos bovinos analisados produz apenas β -caseína do tipo A1; 8,8% produz um leite misto, no qual tanto a β -caseína A1 quanto A2 estará presente; 91,2% da vacas produzem leite com apenas β -caseína do tipo A2, e por consequência, mais saudável em relação aos demais. (Figura 4)

Figura 4. Gráfico representando a relação entre os fenótipos dos 238 animais estudados. A barra vermelha representa os animais que produzem leite A2 puro, sem β -casomorfina-7(A2A2), a barra verde representa os animais que produzem leite misto A1A2, isto é, parte desse leite terá β -casomorfina-7 em sua composição proteica. Nenhum animal com o fenótipo que se manifesta em leite A1 puro foi encontrado.



Resultados de pesquisas nacionais corroboram com o trabalho realizado no Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Minas Gerais - Campus Bambuí, que atestam o encontro de frequências alélicas que giram em torno de 89-100% do alelo A2 em de rebanhos zebuínos leiteiro (VERCESI FILHO et al., 2012; LIMA; LARA, 2015).

Acredita-se que a ingestão de leite contendo a presença do alelo A1, cujo a digestão enzimática origina compostos dotados de morfina, ocasione alergia e outras doenças no corpo humano. No entanto, o leite oriundo de um animal homozigoto para o alelo A2 da β -caseína não demonstra produção alguma de compostos opiáceos ao ser digerido, sendo assim, mais interessante para o consumo humano. Desta forma, é importante destacar a qualidade superior do leite produzidos por zebuínos, onde a frequência do alelo A2 é demasiadamente maior em relação ao alelo A1 (WOODFORD, 2008)

CONCLUSÕES:

Consumir produtos lácteos produzidos a partir de leites que possuem a β -caseína A2 em sua composição é comprovadamente mais saudável, resultando na prevenção de inúmeras doenças.

Genotipar o gado reprodutor a fim de aumentar a população de indivíduos homozigóticos para o alelo A2 passa a ser uma alternativa interessante para o produtor, podendo levar a vários benefícios, como: poder atestar a qualidade do leite a fim de obter um produto com alto valor agregado e reduzir a frequência de gado com o alelo A1 no rebanho e produção de produtos com certificação de qualidade. Em contrapartida, é importante ter cautela com melhorias genéticas nesses animais, pois o alelo A1 pode estar correlacionado a processos fisiológicos importantes para a fisiologia bovina que não foram abordados no presente trabalho, desta forma, necessita-se de maiores estudos gnômicos nesses bovinos a fim compreender melhor tais relações genicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

DAMIANI, G., Pilla, F., Leone, P., Caccio, S. 1992. Direct sequencing and bidirectional allele specific polymerase chain reaction of the bovine β -casein B variant, **Animal Genetics**, 23: 561–566.

GANGULY, I. Beta-casein (CSN2) polymorphism in Ongole (Indian zebu) and Frieswal (HF x Sahiwal crossbred) cattle, **Indian Journal of Biotechnology Vol 12**, April 2013, pp 195-198

HANUSOVÁ, E.; HUBA, J.; ORAVCOVÁ, M.; POLÁK, P.; VRTKOVÁ, I. Genetic variants of beta casein in Holstein dairy cattle in Slovakia. **J. Animal Sci.**, v.43, p.6366, 2010.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids Health Dis.**, v. 6, p.25, 2007.

LIMA A. C. J.; LARA M. A. C. Polimorfismo do gene b-caseína em bovinos. **AICA.**, v.6, p.280-285, 2015.

SALMAN, A.K.D. & LAUREANO, M.M.M. Protocolos para extração de DNA genômico de amostras de pelo de bovinos. Circular Técnica 87. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA**. Porto Velho – RO. 2006.

SHARMA, V., Sharma, N., Jawed, B., Nautiyal, S.C., 2013. High resolution melt curve analysis for the detection of β -casein variants in Indian cows. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research 3**: 44-148.

STEWART, A.F., Bonsing, J., Beattie, C.W., Shah, F., Willis, I.M., Mackinley, A.G. 1987. Complete nucleotide VHTXHQFHV RI ERYLQH β -DQG β -casein cDNAs: comparison with related sequences in other species, **Molecular Biology and Evolution**, 4: 231–241.

SULIMOVA, G. E.; AZARI, M. A.; ROSTAMZADEH, 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. **Russ. J. Genet.**, v.43, n.1, p.73-79, 2007.

VERCESI FILHO, A.E.; CAMARGO, G. M. F.; CARDOSO, D. F.; ZADRA, L. F.; FERNANDES, A. R.; TONHATI, H. Identificação de alelos A1 e A2 para o gene da beta-caseína na raça Gir Leiteiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL. 9., 2012. João Pessoa. Anais... João Pessoa, Paraíba: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2012. Disponível em: <<http://sbmaonline.org.br/anais/ix/trabalhos/pdf/4TAN.pdf>>. Acesso em: 07 jul. 2019.

VILELA, D. A importância econômica, social e nutricional do leite. **Rev. Batavo**, n.111, 2002. Disponível em: <<http://www.nupel.uem.br/importancia.pdf>>. Acesso em: 07 jul. 2019.

WOODFORD, K. A1 beta-casein, type 1 diabetes and links to other modern illnesses. An invited plenary paper to the Internacional Federarion Western Pacific Congress. 2008.