

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA E DESENVOLVIMENTO
RURAL
CURSO DE ZOOTECNIA

TUANNE CAPELLA PEREIRA

IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS A1 E A2 PARA O GENE DA
BETA-CASEÍNA NA RAÇA CRIOULA LAGEANA.

FLORIANÓPOLIS, SC

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA

TUANNE CAPELLA PEREIRA

**IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS A1 E A2 PARA O GENE DA
BETA-CASEÍNA NA RAÇA CRIOLA LAGEANA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como exigência para obtenção do Diploma de
Graduação em Zootecnia da Universidade Federal
de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima.

FLORIANÓPOLIS, SC

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Tuanne Capella

Identificação dos alelos A1 e A2 para o gene da beta
caseína na raça Crioula Lageana / Tuanne Capella Pereira ;
orientador, André Luís Ferreira Lima, 2018.

42 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Zootecnia. 2. Genética. 3. Gene Beta - Caseína. 4.
Crioula Lageana . 5. Leite A2. I. Lima, André Luís Ferreira
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Zootecnia. III. Título.

Tuanne Capella Pereira

**IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS A1 E A2 PARA O GENE DA BETA-CASEÍNA NA
RAÇA CRIOULA LAGEANA.**

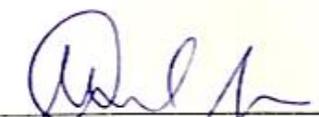
Esta Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso foi julgada, aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 14 de Junho de 2018.

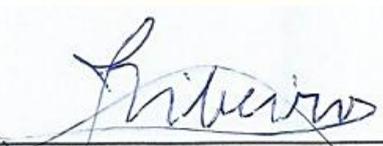
Banca Examinadora:



Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima,
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina



Membro da Banca
Márcio Cinachi Pereira



Membro da Banca
José Antônio Ribas Ribeiro



Membro da Banca
Sérgio Augusto Ferreira de Quadros

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu eterno e amado vô,
Euclides Machado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força necessária para continuar em momentos difíceis.

Agradeço aos meus pais, Simone Capella Pereira e Valmir Onizio Pereira por todo o apoio e compreensão ao longo da faculdade, e por todos os anos de dedicação a mim. Ao meu irmão Cauã Capella Pereira por existir e ser a luz da minha vida.

Agradeço a minha avó Rita de Cassia Capella Machado, por ser minha base, minha estrutura em todos os momentos que precisei, e junto ao meu avô Euclides Machado, que não está mais nesse plano, por todos os ensinamentos ao longo da vida para que me tornasse a pessoa que sou hoje.

Ao meu marido por me amar e compreender todos os momentos de ansiedade para chegar até aqui.

Agradeço a minha tia Graziela Capella Machado, por ser mais que uma tia e também uma amiga a me encorajar e acreditar em mim. A todos os familiares que com carinho me apoiaram nesta trajetória.

Agradeço ao meu orientador, professor e amigo Andre Luís Ferreira Lima, por todos os ensinamentos, momentos de descontração e por me fazer manter a calma em momentos de desespero no período de bolsista e como orientada.

Agradeço a todos os professores que me incentivaram e motivaram a ser uma profissional melhor, e a todos os professores e professoras que me inspiraram ao longo desse período.

Agradeço aos meus colegas e amigos Isadora Nicole Lara Piccinin, Jéssica Santos, Vinicius Almeida de Souza, Giovanna Pugioli Comine, Sarah Ikebata, e a todos os colegas de faculdade que estiveram comigo em todos os momentos, pela parceria, alegrias e apoio nas circunstâncias difíceis. A minha melhor amiga e prima Aline Fraga Pereira, por todo incentivo, apoio e compreensão em todas as etapas da minha vida.

Agradeço a equipe do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal – CCA – UFSC, por todo o apoio nos projetos realizados e em especial a técnica Aline Chiarelli Cristofolini por toda ajuda, risadas e parceria no decorrer de todo o trabalho realizado.

Agradeço também ao apoio da FAPESC pelo financiamento do projeto realizado.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”
(Charles Chaplin).

RESUMO

O leite de vaca possui 87% de água e 13% de componentes sólidos, dentre eles 3% de proteínas, destas cerca de 80% são caseínas, e entre as estruturas orgânicas da caseína, a Beta-Caseína que corresponde à 25-35%, são divididas em 13 variantes conhecidas onde as formas mais comuns encontradas no leite bovino são as caseínas codificadas pelos alelos A1 e A2. A digestão da beta caseína A1 resulta em um peptídeo bioativo relacionado a várias doenças em humanos. A beta caseína A2 não resulta neste mesmo produto bioativo quando digerida, portanto leites com maiores quantidades de beta caseína A2 tem probabilidade menor de causarem os mesmos problemas de saúde que o leite com a beta caseína A1. Algumas raças bovinas produzem maior quantidade da variante A2 que a A1, a raça Crioula Lageana, é uma raça de duplo propósito com grande interesse econômico para a Planalto Serrano Catarinense, contudo não possui na literatura, trabalhos que indiquem as frequências desses alelos. O objetivo deste estudo é genotipar animais da raça Crioulo Lageano, verificando a existência de polimorfismo e identificando os alelos A1 e A2 para o gene da beta-caseína, empregando a técnica de PCR- RFLP, utilizando as enzimas de restrição Hinf I, Ban II e XmnI. Foram coletadas 110 amostras de propriedades do planalto catarinense. As análises foram conduzidas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal (LEPGA), no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis/SC. A extração de DNA foi realizada com uma adaptação da metodologia de PCI (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico). A efetividade do procedimento foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose e as amostras consideradas satisfatórias foram amplificadas por meio de PCR, posteriormente os fragmentos obtidos foram submetidos à técnica de PCR-RFLP utilizando as enzimas anteriormente mencionadas. Foram observados polimorfismos genéticos com a técnica de RFLP utilizando a enzima de restrição Hinf I, que originaram três padrões distintos de migração, A2A2, A1A1 e A2A1, com frequências observadas iguais a 0,689, 0,01 e 0,301 respectivamente, e frequências alélicas de $f(A2) = 0,84$ e $f(A1) = 0,16$. Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que foi possível identificar polimorfismos para a região estudada do gene da β -caseína na raça Crioula Lageana e que o alelo A2 se encontra em uma frequência bastante superior ao do alelo A1 na amostra da população estudada.

Palavras chave: β -caseína, *Bos taurus*, Crioulo Lageano, Leite A2, marcadores moleculares.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Produção brasileira de leite ao longo dos anos.....	8
Figura 2- Volume de leite produzido em 2014 em relação a 2013 (em milhões de litros) nas regiões brasileira.....	9
Figura 3- Brasil: Quadro de oferta e demanda de leite (bovino) – 2011 a 2016 – em bilhões de litros.....	10
Figura 4- Concentração das proteínas lácteas (g/200 mL) e suas principais funções.....	12
Figura 5- Diferença na posição 67 ^a – Beta Caseína A1 e A2	13
Figura 6- Formação da BCM-7.....	13
Figura 7- Estrutura química β -casomorfina 7.....	16
Figura 8 - Imagem representativa dos resultados obtidos nas extrações de DNA. Eletroforese em gel de agarose a 5%	26
Figura 9 - Imagem representativa do resultado das análises de PCR indicando fragmento do gene da Beta Caseína, utilizando os iniciadores B-Cas FWD e REV.	27
Figura 10 - Eletroforese da técnica de RFLP com a Enzima Xmn I. Gel de agarose a 2,5%. A= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen®)	28
Figura 11 - Eletroforese representativa dos diferentes padrões de bandas observados no resultado da técnica PCR-RFLP com utilização da enzima Hinf-I. Gel de Agarose a 2,5%	28

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das proteínas do leite **11**

Tabela 2 - Frequências gênicas e genotípicas observadas e calculadas **29**

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	5
2.0 OBJETIVOS	7
3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1 A Importância do leite – Econômica e Nutricionalmente	8
3.1.1 Importância econômica	8
3.1.2 Importância Nutricional e composição do leite	10
3.2 O Leite A2 - Beta Caseína A1 e A2.....	12
3.3 Doenças relacionadas ao consumo do leite A1	15
3.4 Raça Bovina Crioula Lageana	16
3.5 Marcadores Moleculares, Seleção Assistida por Marcadores e PCR/RFLP	18
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26
6.0 CONCLUSÃO	31
7.0 REFERÊNCIAS	32

1.0 INTRODUÇÃO

O leite tem uma grande importância econômica e nutricional na atualidade. Além de estar presente na maioria das casas brasileiras, a quantidade consumida vem aumentando ao longo dos anos. Estima-se um aumento de 36% no consumo de leite nos últimos anos, sendo o maior aumento de consumo deste e seus derivados entre as famílias que ocorreram um aumento da renda familiar e de grau de escolaridade (SBAN, 2015).

É um alimento que possui diferentes nutrientes na sua composição, em média o leite de vaca possui 87% de água e 13% de componentes sólidos, divididos entre cerca de 4% a 5% de carboidratos, 3% de proteínas, 3% a 4% de lipídios (em sua maior parte saturados), 0,8% de minerais e 0,1% de vitaminas (HAUG et al., 2007). Assim, com o aumento do consumo desse alimento concomitantemente aumentou o aparecimento de problemas relacionados a ele, e conseqüentemente estudos sobre os componentes do leite e benefícios e malefícios que estes possam causar.

Entre as proteínas presentes no leite cerca de 80% são caseínas, e entre as estruturas orgânicas da caseína, podemos dividi-las em quatro grandes grupos: alfa S1 (30-46% das caseínas), alfa S2 (8-11%), beta (25-35%) e kappa (8-15%). Destas, as beta-caseínas são divididas em 13 variantes conhecidas: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G. As formas mais comuns no leite de bovinos são as caseínas A1 e A2. Estudos realizados nos últimos anos mostram que o produto resultante da digestão da beta caseína A1, é um peptídeo bioativo que foi relacionado a várias doenças em humanos, algumas como: problemas coronarianos (MC LACHLAN, 2001), alergia (GOBBETTI et al, 2002) e diabete mellitus tipo 1 (ELLIOT et al, 1999). A beta caseína A2 não resulta neste mesmo produto bioativo quando digerida, pois não passa por uma hidrolisação enzimática (ou ela ocorre muito lentamente), portanto leites com maiores quantidades de beta caseína A2 tem baixa probabilidade de causarem os mesmos problemas de saúde que o leite com alta quantidade de beta caseína A1.

Algumas raças bovinas produzem maior quantidade da variante A2 que a A1. Estudos com a raça Vermelha Norueguesa (NILSEN et al, 2009) encontraram associação genética favorável do alelo A2 com maior produção de leite e proteína. Outros estudos com raças de origem zebuína como a Gir Leiteira (VERCESI FILHO et al., 2012), evidenciaram que o alelo A2 se encontra em uma frequência bastante

superior ao do alelo A1 na população de Gir Leiteiro. Outro estudo realizado com bubalinos e bovinos (*Bos taurus* e *Bos Indicus*) de diversas raças (OTAVIANO, 2006), mostrou uma frequência bastante superior do alelo A2 em raças como Holandesa, Jersey e Gir Leiteiro.

A raça Crioula Lageana (*Bos taurus*), uma raça de duplo propósito, proveniente do planalto serrano catarinense, originária dos bovinos da Península Ibérica, tem grande interesse econômico e cultural para Santa Catarina. Contudo, não existem na literatura trabalhos que indicam as frequências desses alelos na raça Crioula Lageana.

Neste contexto é objetivo desse estudo usar técnicas de marcadores moleculares para genotipar animais da raça Crioula Lageana, verificando a existência de polimorfismo e a frequência desses alelos, nos animais que compõem uma parte do rebanho existente em Santa Catarina.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Genotipar animais da raça Crioula Lageana, verificando a existência de polimorfismo e identificando os alelos A1 e A2 para o gene da beta-caseína, empregando a técnica de PCR- RFLP, com as enzimas de restrição Hinf I, Ban II e XmnI.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair o DNA genômico de uma amostra de animais;
- Isolar e amplificar um fragmento correspondente a região parcial do íntron 6 e éxon 7 do gene da beta-caseína, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Verificar a existência de polimorfismos nos produtos obtidos na PCR, utilizando-se a técnica de Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição (RFLP);
- Verificar as frequências dos alelos A1 e A2, se existir o polimorfismo.

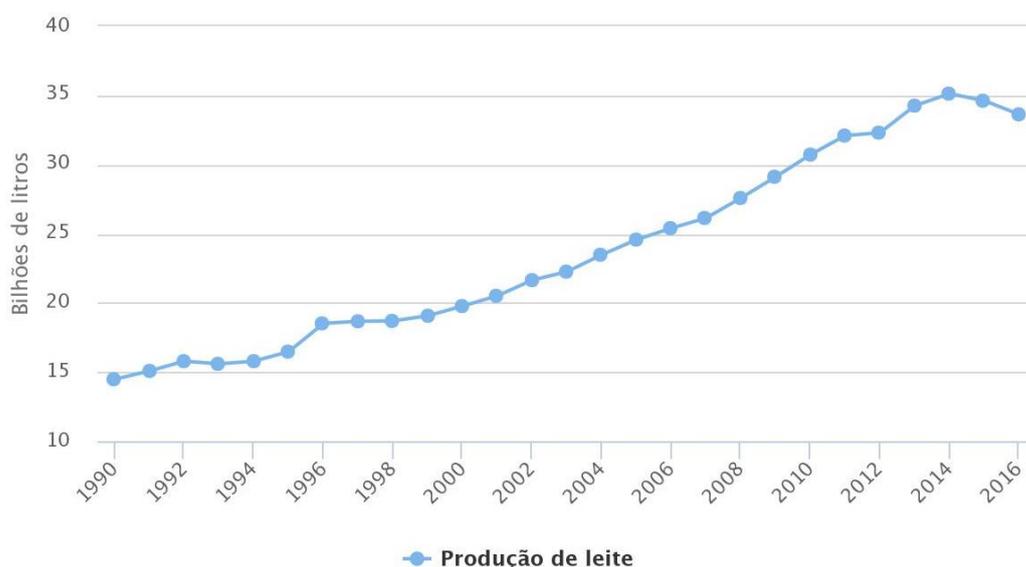
3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.0A Importância do leite – Econômica e Nutricionalmente

3.1.1 Importância econômica

O leite bovino é um produto que tem grande importância econômica no cenário brasileiro. E vem demonstrando um crescimento representativo ao longo dos anos, o que lhe garantiu o 5º lugar como produtor de leite mundial, com o equivalente a 35,2 bilhões de litros em 2014 (Figura 1), um crescimento de 2,7% em relação a 2013 (IBGE, 2015). Segundo dados do Governo brasileiro, o preço médio nacional do litro do leite no ano de 2014 foi de R\$ 0,96, gerando um valor de produção de R\$ 33,78 bilhões neste ano. Em 2016, segundo dados do IBGE a produção teve um decréscimo de 2,9% gerando 33,62 bilhões de litros neste ano, o preço médio pago ao produtor foi de R\$ 1,17 por litro, um aumento de 15,2% em relação a 2015. Isso representou um valor de produção de R\$ 39,44 bilhões.

Figura 1 - Produção brasileira de leite entre 1990 e 2016.

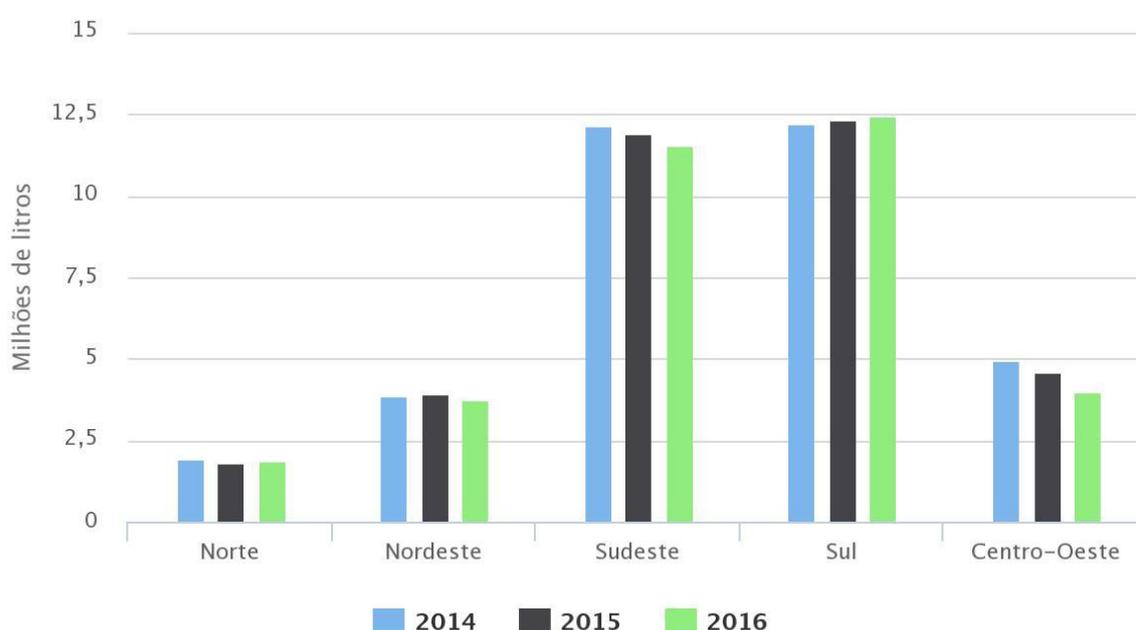


Fonte: IBGE/2017

Neste contexto podemos observar que o sul, representou a região com maior produção de leite em 2014, superando até mesmo o sudeste. Os três estados do sul produziram um equivalente a 12,201 bilhões de litros, contra 12,169 bilhões de litros

do sudeste (EMBRAPA, 2015). Em relação a 2013, houve um crescimento em todas as regiões brasileiras, com exceção do Centro – Oeste que teve um decréscimo de produção em 2014 de 47 milhões de litros. Em 2016 a Região Sul permaneceu na liderança (Figura 2), com 12,45 bilhões de litros (1% a mais frente a 2015), sendo responsável por 37% da produção nacional. A Região Sudeste teve a segunda maior produção em 2016, representando 34,3% do total. (IBGE, 2017)

Figura 2 - Volume de leite produzido entre 2014 e 2016 (Produção por região em milhões de litros)



Fonte: IBGE, 2017.

O setor produtivo brasileiro conta com mais de 1,3 milhão de propriedades leiteiras, distribuídas praticamente em todo o território nacional, sendo algumas mais e outras menos tecnificadas (IBGE, 2006; ZOCCAL et al., 2012). Dentre todo leite produzido o mercado interno absorveu cerca de 98% nos últimos anos, contando ainda com um número expressivo de importações e baixíssimo de exportações, como podemos observar na Figura 3. Ainda analisando os dados é possível verificar que o consumo per capita vem aumentando ao longo dos anos, tendo apenas previsões negativas para o ano de 2015, devido à crise financeira que se encontra o país, porém no ano de 2016 esse consumo tem previsões de pequeno crescimento, segundo os dados, dado a pequena retomada do poder aquisitivo do consumidor, que influencia diretamente na compra de produtos lácteos.

Figura 3 – Brasil: Quadro de oferta e demanda de leite (bovino) – 2011 a 2016 – em bilhões de litros.

Ano	Produção total		Produção sob inspeção			Exportações			Importações			Consumo per capita **	
	Total	Var. %	Total	Var. %	Sob insp./total (%)	Total	Var. %	Xs/Prod. Insp. %	Total	Var. %	Ms./Prod. Insp. %	Litros/hab.	Var.%
2011	32.096	4,5%	21.795	3,9%	67,9%	126	-70,6%	0,6%	1.219	54,5%	5,6%	168,1	5,8%
2012	32.304	0,6%	22.338	2,5%	69,1%	117	-7,5%	0,5%	1.278	4,8%	5,7%	168,0	-0,1%
2013	34.255	6,0%	23.553	5,4%	68,8%	134	14,6%	0,6%	1.071	-16,2%	4,5%	175,1	4,2%
2014	35.174	2,7%	24.747	5,1%	70,4%	450	237,4%	1,8%	727	-32,1%	2,9%	175,2	0,1%
2015 *	34.823	-1,0%	24.050	-2,8%	69,1%	441	-2,0%	1,8%	1.094	50,5%	4,5%	173,6	-0,9%
2016 *	35.171	1,0%	24.435	1,6%	69,5%	485	10,0%	2,0%	1.203	10,0%	4,9%	173,9	0,2%

Fonte: IBGE, MDIC/Alice, MAPA/AGE, Embrapa/SGE, Embrapa Gado de Leite e Viva Lácteos.

MHF/abr 16.

* Estimativas para a produção total em 2015 e 2016, para a produção sob inspeção em 2016 e para as exportações e importações em 2016.

** População estimada residente em 1º de julho (Fonte: IBGE).

*** Leite de vaca.

Nota: Os dados de comércio exterior incluem as NCMs 0401 0000 a 0406 9999, leite modificado (NCM 1901 1010), doce de leite (NCM 1901 9020 e coelho e seus concentrados (NCM 3507 1000).

Fonte: CONAB, 2016.

O consumo do leite e seus derivados não apenas aumentaram nos últimos anos, notou-se através de pesquisas da POF - Pesquisa de Orçamento Familiar (2008-2009), que quanto mais poder aquisitivo e maior o nível de escolaridade das famílias, maior o consumo de leite e derivados, e maior a exigência quanto a qualidade dos produtos oferecidos. Entre os leites e derivados o leite integral ainda é o mais consumido, tendo uma frequência maior entre crianças e adolescentes ainda em fase de crescimento (SBAN, 2015).

3.1.2 Importância Nutricional e composição do leite.

O leite possui uma grande variedade de compostos que apresentam funções de fundamental importância imunológica e nutricional para o neonato, e apesar de ser um alimento destinado a recém-nascidos mamíferos, ele é conhecido como um dos alimentos mais completos e oferece grandes possibilidades para a alimentação humana. Este é recomendado por muitos nutricionistas como fonte importante de proteína e de minerais, como por exemplo o cálcio, sendo indicado em muitos casos como alimento essencial para o balanceamento da dieta. O leite de vaca é um alimento que possui muitos nutrientes, alguns fundamentais para nutrição dos seres humanos.

Podemos determinar um perfil nutricional do leite, contendo em sua composição nutrientes como: 87% de água e 13% de componentes sólidos. Desses são divididos entre cerca de 4% a 5% de carboidratos, representados pela lactose e que corresponde a um grande percentual dos sólidos do leite, a lactose é um

dissacarídeo composto de dois açúcares, glicose e galactose, sendo este último de origem da própria glicose. Contém 3% a 4% de lipídios (em sua maior parte saturados), são os componentes com maior teor energético do leite, possuem 0,8% de minerais, dentre eles os mais importantes são o cálcio, fósforo, magnésio, sódio, potássio, e cloreto, e ainda 0,1% de vitaminas, dentre as quais podemos citar a vitamina B1 e B2, vitamina A, E e K (HAUG et al., 2007). O leite ainda possui naturalmente imunoglobulinas, hormônios, fatores de crescimento, citocinas, nucleotídeos, peptídeos, poliaminas, enzimas e outros peptídeos bioativos que apresentam interessantes efeitos à saúde (BRITO et al., s/d; PEREIRA, 2014).

É uma importante fonte de proteína, contém 3% de proteínas do total de sólidos e em média, 32 g desse nutriente por litro, proteínas de alto valor biológico, que contemplam todos os aminoácidos essenciais em quantidades adequadas para suprir as necessidades humanas, além de apresentarem boa digestibilidade e biodisponibilidade (SBAN, 2015). A fração proteica do leite pode ser dividida em dois grandes grupos: as caseínas e proteínas do soro, (proteínas solúveis e insolúveis). Denominadas caseínas (α -caseína (S1 e S2), β -caseína e κ -caseína), as proteínas insolúveis representam cerca de 80% desse total. Os 20% restantes são proteínas solúveis presentes no soro do leite (HAUG et al., 2007), a divisão das proteínas do leite estão descritas na *tabela 1*.

Tabela 1 – Composição das proteínas do leite

Tipo de Proteína	Composição em relação à proteína total
Proteínas do soro	19%
α - caseína	45%
β - caseína	24%
k - caseína	12%

Fonte: Adaptado de Homan e Wattiax - 1996

As diferentes proteínas lácteas que contém na composição do leite e suas funções podemos observar na tabela da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, adaptada de Boye & Souza et al. (2012).

Figura 4 – Concentração das proteínas lácteas (g/200 mL) e suas principais funções.

PROTEÍNAS	CONCENTRAÇÃO g/200 mL ²⁵	PRINCIPAIS FUNÇÕES
CASEÍNA		
α-caseína (α ₁ e α ₂)	2,6 g	Transporte de minerais no sangue (cálcio, fósforo, ferro, zinco e cobre).
β-caseína	1,86 g	
κ-caseína	0,66 g	
PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE	CONCENTRAÇÃO g/200mL²⁵	PRINCIPAIS FUNÇÕES
β-lactoglobulina	0,64 g	Atua no metabolismo do retinol e dos ácidos graxos; possível efeito antioxidante e anti-hipertensivo.
α-lactoglobulina	0,24 g	Favorece a absorção intestinal de cálcio e zinco; potenciais efeitos imunoreguladores, anticarcinogênicos e anti-hipertensivos.
Imunoglobulinas (IgA, IgM, IgE e IgG)	0,14 g	Atuam na proteção imunológica.
Lactoferrina	20 mg	Favorece a absorção e transporte de ferro no sangue, potencial efeito antimicrobiano, antioxidante, imunoregulador e anticarcinogênico.
Lactoperoxidase	6 mg	Apresenta importante atividade antimicrobiana.
Lisozima	0,08 g	Atua em sinergia com imunoglobulinas e lactoferrina.
Glicomacropéptidos (GMP)	0,24 g	Efeito antiviral e bifidogênico.

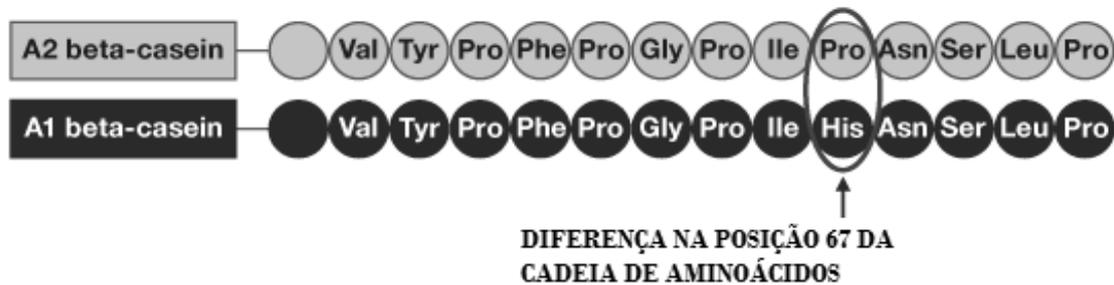
Fonte: SBAN, 2015

3.2 O Leite A2 - Beta Caseína A1 e A2

Entre as proteínas presentes no leite cerca de 80% são caseínas, e entre as estruturas orgânicas da caseína, podemos dividi-las em quatro grandes grupos: alfa S1 (30-46% das caseínas), alfa S2 (8-11%), beta (25-35%) e kappa (8-15%). Destas, as beta-caseínas são divididas em 13 variantes conhecidas: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G. As formas mais comuns encontradas no leite bovino são do tipo A1 e A2 (VERCESI FILHO, 2011). Até um momento da história os bovinos possuíam apenas o alelo A2, não se sabe o porquê, em um determinado momento houve uma mutação e começaram a produzir também a Beta-caseína A1. A diferença entre a beta-caseína A1 e A2 é apenas a mudança de um nucleotídeo entre os 203 aminoácidos que compõem as duas proteínas. A Beta Caseína A1 possui um aminoácido *histidina*, enquanto que a Beta Caseína A2 tem uma *prolina* na 67^a posição.

Figura 5 – Diferença na posição 67ª – Beta Caseína A1 e A2.

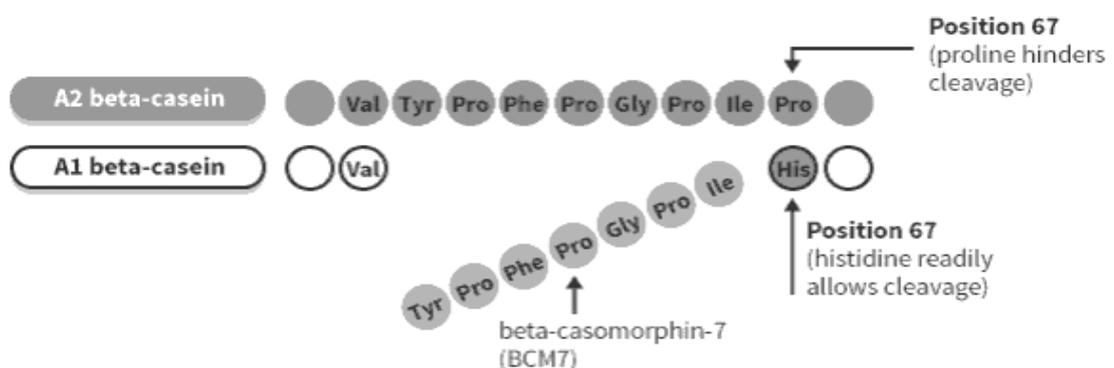
Protein chain showing amino acids in A1 and A2 beta-casein



Fonte: A2 MILK, 2014 (Disponível em: <<https://a2milk.com.au/health-professionals/beta-casein-milk-protein/>>)

Esta mudança na 67ª posição da cadeia, faz com que a variante A1 se comporte diferente no trato-gastro-intestinal humano. A variante A1 passa pelo processo de hidrólise, produzindo o peptídeo bioativo chamado de beta-casomorfina-7 (BCM-7) como mostra a figura 7, esta formação nova de proteína possui a mesma estrutura química da morfina. Dias (2016), afirma que é exatamente a formação desses peptídeos que estariam implicando uma série de reações alérgicas.

Figura 6 - Formação da BCM-7



Fonte: Woodford (2007)

Estudos conduzidos por pesquisadores na Austrália e na Nova Zelândia entre 2000 e 2003, mostraram uma clara relação entre aumento nas taxas de doenças crônicas e consumo do leite A1, e mesmo não sendo comprovada essa relação, teve-

se a preocupação de produzir cruzamentos que dessem origem a animais que produzissem apenas, ou com uma maior frequência, a variante A2, foi então que surgiu o Leite tipo A2.

O leite do tipo A2, além de não ter associação com nenhuma doença crônica, evidencia fatores benéficos em relação ao seu consumo. Um estudo recente publicado no *Nutrition Journal* por Deth et. Al. (2016), mostrou uma associação do consumo de leite contendo apenas a variante A2, com uma maior produção de antioxidante (glutathiona antioxidante) em seres humanos.

Em relação ao leite tipo A1, estudos realizados começaram a associar a beta-caseína A1 com problemas crônicos em pessoas predispostas, que incluem: diabetes mellitus tipo 1 (ELLIOTT et al, 1999), problemas coronarianos, distúrbios mentais e outras doenças autoimunes (MC LACHLAN, 2001), também estão relacionadas a diversas alergias (GOBBETTI et al, 2002), intolerância ao leite e problemas intestinais (JIANQIN et al., 2016).

Até o presente momento sabe-se que apenas os bovinos produzem essa variante (A1), mais especificamente à subespécie *Bos taurus*, e que há uma variação grande das quantidades de B-caseína A1 e A2 entre raças e regiões que provém os animais. Alguns trabalhos evidenciaram essas variações em algumas raças, Camargo (2012) e Vercesi Filho (2011), em seus estudos com a raça zebuina Gir Leiteiro (*Bos indicus*), mostraram a existência de uma frequência bastante superior do alelo A2 ao A1. Otaviano (2006) trabalhando com diversas raças, como: Holandesa, Gir, Jersey, Pardo-Suíço, Girolando, Guzerá e até búfalas da raça Murrah, evidenciou através de seus testes utilizando técnicas de marcadores moleculares (PCR – RFLP), que todas as raças, com exceção das búfalas da raça Murrah, possuem uma frequência igual ou superior 0,5 do alelo A2. Conhecer a frequência desses alelos possibilita trabalhar com estas raças através do melhoramento genético para produzirem leite do tipo A2.

Deste modo evidencia-se a preocupação em realização de pesquisas que evidencie a presença e frequência desses alelos nas demais raças bovinas, buscando cruzamentos e aperfeiçoamento dos animais para que produzam com maior frequência ou somente a variante A2.

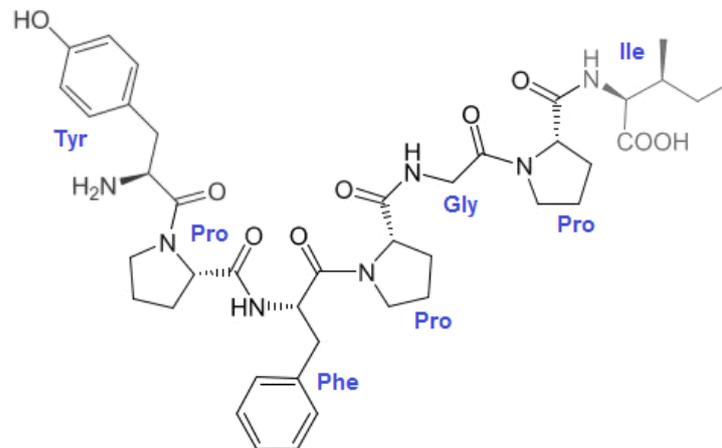
2.3 Doenças relacionadas ao consumo do leite A1

Vários trabalhos relatam as evidências da digestão da Beta-caseína A1 com uma série de doenças, esse peptídeo bioativo chamado de BCM-7 pode estar relacionado segundo Woodford (2007) com doenças cardíacas, diabetes tipo 1, autismo, esquizofrenia e desenvolvimento de doenças autoimunes. Ele relata, através das evidências que reuniu dos mais de 100 artigos científicos publicados sobre o assunto, o potencial prejudicial que essa variante pode causar em indivíduos pré-dispostos a estas doenças. Mc Lachlan (2001), e Laugesen e Elliott (2003), através de análises epidemiológicas e estudos com ensaios em animais, encontraram evidências da forte associação entre o consumo da beta-caseína A1 e doenças cardíacas e diabetes mellitus tipo 1. Os estudos mostraram que países em que as pessoas consumiam mais leite A1, havia um índice mais alto de desenvolvimento de doenças coronarianas do que em países que predominantemente consumiam o leite A2. Porém é preciso ressaltar que esses estudos mesmo tendo relacionado fortemente o consumo de leite A1 com desenvolvimento de doenças cardíacas, inclusive excluindo muitas variáveis tornando o estudo mais confiável, ainda assim são correlações estatísticas, que isoladamente não podem provar a relação, apenas evidenciar. Mc Lachlan (2001), ainda em seus estudos, observando dados desses países, encontrou uma forte correlação entre incidências de doenças cardíacas e diabetes mellitus tipo I, uma correlação alta de 0,74, associando então a diabetes mellitus tipo 1 também ao consumo do leite A1. Elliott (1999), já havia mostrado evidências em seus ensaios com roedores do consumo do leite possuindo a beta caseína A1 e aumento de desenvolvimento da diabetes tipo 1, sendo que ratos que foram alimentados com o leite A2 não desenvolviam a doença e uma grande parte dos animais (47%), que eram alimentados com o leite A1 desenvolviam, associando o desenvolvimento da doença ao peptídeo bioativo BCM-7.

Outro problema poderia ocorrer em indivíduos que possuem alguma deficiência gastrointestinal, como úlceras e até problemas relacionados ao estresse, que podem dificultar a quebra da BCM-7, pela falta da enzima dipeptidil peptidase 4, que é a enzima responsável pela quebra da BCM-7, fazendo-a entrar na corrente sanguínea em maior quantidade e assim podendo ocasionar maiores problemas. Woodford (2007) relaciona a substância a um narcótico, pois é uma variante da morfina, além

de ser um oxidante.

Figura 7 - Estrutura química β -casomorfina 7



Fonte: Clemens, RA (2011)

Segundo Gobbetti et al, (2002) e Dias (2016) a formação desse peptídeo pode ser a causa de diversas reações alérgicas, além das evidências da variante β -caseína A1, estar relacionada com a intolerância ao leite. Um estudo recente realizado na China mostrou que o consumo de leite contendo β -caseína A1 está associado a aumento da inflamação gastrointestinal, piora dos sintomas de PD3, atraso no trânsito gastrointestinal e diminuição da velocidade e precisão do processamento cognitivo. Segundo este estudo de JIANQIN et al (2016) a variante β -caseína A1 aumenta a inflamação gastrointestinal, e alguns sintomas de intolerância à lactose podem ser desencadeados pelo resultado desta inflamação, esse mesmo estudo provou que o consumo de leite contendo apenas β -caseína A2 não resultou no mesmo processo inflamatório, diminuindo assim os efeitos da intolerância a lactose.

3.4 Raça Bovina Crioula Lageana

A raça crioula lageana foi reconhecida pela portaria 1048 de 31 de outubro de 2008, publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através dos esforços da ABCCL – Associação Brasileira de Criadores da Raça Crioula Lageana, de criadores da região serrana de Santa Catarina e das instituições parceiras, este reconhecimento oficial e abertura de Livro de Registro Genealógico foi possível. Estes bovinos do sul do Brasil, mais especificamente do Planalto Catarinense – Lages, foram modelados através do tempo, o que tornou estes animais

perfeitamente adaptado as temperaturas e condições ambientais da região (Primo, 1986).

Segundo Goulart (1965), os bovinos crioulos do sul do Brasil têm sua origem dos bovinos Ibéricos (*Bos taurus ibericus*), tendo em seu tronco raças como: Retinta, Barrendas, Blanca, Caceranã e Negra Andaluza, mesclados com os bovinos do tronco Aquitânicos (*Bos taurus aquitanicus*) de Portugal, de raças como: Barrenta de Andaluza, Minhota, Arouquesa e Alentejana. Todos esses animais tem um ancestral em comum e pertencem à Península Ibérica (Martins. Et. Al., 2009).

Os bovinos do tronco Ibérico, dos quais a raça Crioula Lageana descende diretamente, foram introduzidas no Brasil através das missões jesuíticas que teve seu início em 1549. A raça crioula também tem em sua formação a participação dos bovinos vicentistas, pertencentes também ao tronco ibérico, introduzidos no Brasil em 1534. O crioulo lageano é resultado da miscigenação de diversas raças ibéricas e da sua exposição as condições ambientais do planalto do sul brasileiro a que foi submetido por quase 500 anos de seleção natural. Quando se iniciou a colonização de Lages, por volta de 1770, o gado rústico que existia na região, cruzou-se com os bovinos que vieram junto com os colonizadores, a miscigenação de raças possibilitou a formação deste grupo genético (Martins. Et. Al., 2009).

A raça Crioula Lageana está adaptada a região do planalto sul catarinense, localizado no centro do estado de Santa Catarina, caracterizado por invernos frios e verões brandos, com média de temperatura anual de 15,7°C, chegando em média nos meses mais frios a 6,6°C. O clima úmido com Umidade Relativa média de 78%, com média de precipitação de 1300mm anual, caracterizaram a raça a este ambiente. Por essa caracterização do clima as forrageiras constituídas por pastagens naturais apresentam boa produção na primavera e verão, sendo bem escassa no outono e inverno. As principais forrageiras da região se caracterizam pelos gêneros: *Aristida*, *Andropogon*, *Elyonuros*, *Trachypogon*, *Schizachyrium*, *Paspalum* e *Baccharis*. Alguns exemplos são: Capim Caninha, Capim mimoso, Barba de bode, Grama forquilha, Grama tapete, Macena mansa, Carqueja e Vassouras. (Martins. Et. Al., 2009).

Os bovinos da raça Crioula Lageana possuem como características morfológicas um perfil de cabeça retilíneo ou subconcavilíneo, mucosas pigmentadas escuras, orelhas redondas, pequenas e leves, corpo cilíndrico de tamanho mediano, membros longos com forte estrutura óssea, a sua pele é grossa e pigmentada, coberta

de pelos que variam do branco até o preto, entre as variedades de pelagem temos: africana vermelha e africana preta; baio ou preto; jaguané; ovelho vermelho; baio ou osco; mouro; brasino; Nilo; barranda em preto ou vermelho; churriado salino e vermelho, sendo as mais comuns entre a raça a africana vermelha e preta. Temos duas variedades de animais a aspada e a mocha. A variedade aspada possui chifre com grande desenvolvimento geralmente em forma lizada que se prolongam horizontalmente para as laterais. (Camargo e Martins, 2005; Primo, 1992).

Os bovinos da raça Crioula Lagena são considerados animais de dupla aptidão, porém quando comparados com animais de outras raças como Charolês e Nelore, as características de carcaça desses animais apresentam aspectos deficientes, e possuem pouco desenvolvimento muscular devido a influência do meio a que se desenvolveram e a falta de interferência humana quanto a seleção dessas características para esses animais (Ribeiro, 1993).

Por outro lado, quando avaliamos a capacidade leiteira desses animais, a indicativos de pontos positivos a respeito da raça, segundo dados de Ribeiro (1993), estes indicam uma boa capacidade leiteira e habilidade materna, os terneiros nascem pequenos, porém apresentam excelente desenvolvimento até a desmama, e apesar de não ter sofrido seleção a raça Crioula Lageana apresentou maior ganho de peso ao nascimento e a desmama em relação as demais raças. (Martins. Et. Al., 2009).

As características apresentadas pela raça Crioula Lageana são altamente desejáveis nos sistemas de produção, tanto leiteiras quanto de reprodução e de carcaça devem ser aprimoradas, buscando a inclusão destas nos programas de melhoramento.

3.5 Marcadores Moleculares, seleção assistida por marcadores e técnicas de biologia molecular - PCR/RFLP.

A produção animal de qualquer espécie, somente alcança altos níveis de eficiência quando se aliam o melhoramento da composição genética animal e das condições ambientais de criação. É preciso uma ação conjunta desses dois fatores que são igualmente importantes. A parte genética é a base para o estabelecimento de programas de melhoramento e é o fator limitante a resposta dos animais aos

processos seletivos (PEREIRA, 2008).

O melhoramento genético animal busca modificar a proporção de certos genes, aumentando a frequência de genes desejáveis em uma população e diminuindo a frequência dos genes indesejáveis, permitindo selecionar animais que expressem as características desejadas para um determinado programa de melhoramento, dentro de uma condição ambiental de criação adequada. Para promover o melhoramento genético animal, existem duas ferramentas disponíveis: a seleção e o cruzamento. A seleção é a decisão de permitir que os melhores indivíduos de uma geração sejam pais da geração subsequente, e do número de filhos que estes deixarão, mudando a frequência genética de uma população. O cruzamento por sua vez, ocorre quando indivíduos pertencentes a raças diferentes acasalam, sendo uma forma de conseguir melhoria genética e incrementos de produção e de produtividade. Porém, não elimina a necessidade nem a importância da seleção como método de melhoramento genético que pode ser realizado concomitantemente ao cruzamento (EUCLIDES FILHO, 1999).

O uso de técnicas que envolvem marcadores moleculares proporcionou um avanço nos estudos de genética e um melhor resultado nos programas de melhoramento genético, quanto a utilização das ferramentas de seleção e cruzamento. (BUSO et al., 2009).

Os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA. Um marcador molecular pode ser definido como qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Segundo Milach (1998), marcadores moleculares são características ou fragmentos de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos geneticamente.

Os primeiros marcadores utilizados eram marcadores morfológicos, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral, características fenotípicas de fácil visualização, como nanismo. (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Essa classe de marcadores era de fácil monitoramento, porém existe em número muito limitado em uma mesma espécie sendo insuficiente para o mapeamento genético. Sua descrição depende do desenvolvimento do animal e sua expressão gênica pode ser influenciada por ação gênica de dominância, morfologia, fisiologia, comportamento das espécies, além dos fatores ambientais. (PECCHIONI et al., 1996).

A partir da década de 70, surgiram os marcadores bioquímicos baseados em proteínas e enzimas, apesar destes marcadores serem codominantes, isto é, genótipos heterozigotos e homozigotos de determinado loco facilmente identificados, permitindo estimar parâmetros como frequências genóticas e alélicas e, de possuírem baixos custos e de fácil execução, há a desvantagem de proporcionar pequena cobertura do genoma. (Ferreira & Grattapaglia 1998).

Os marcadores de DNA, conhecidos como marcadores moleculares, são segmentos de DNA que estão fisicamente ligados a locos que determinam características de interesse. A principal colaboração que as técnicas de marcadores de DNA trouxeram foi a possibilidade de analisar intrinsecamente o genótipo de um indivíduo sem a necessidade da ocorrência da expressão fenotípica e, conseqüentemente, excluindo-se a influência do ambiente. (TOPPA; JADOSKI, 2013).

A utilização da tecnologia de marcadores moleculares nos programas de melhoramento genético, mais especificamente no processo de seleção através da procura de alelos desejáveis indiretamente por meio do uso de marcadores ligados, é conhecida como seleção assistida por marcadores moleculares (SAM).

Algumas técnicas de marcadores que combinam o uso de enzimas de restrição à hibridização entre seqüências complementares de DNA, são o caso do “Restriction Fragment Length Polymorphisms” (RFLP) ou a técnica de “Polymerase Chain Reaction” (PCR), são amplamente utilizadas no mapeamento genético.

A técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction), surgiu na década de 80, e apresentou uma nova opção ao uso de marcadores moleculares. Utilizada para ampliar pequenas seqüências específicas de nucleotídeos em quantidades acessíveis à análise, a partir de uma pequena quantidade de DNA (WHITE et. al., 1989), a técnica fundamenta-se na síntese enzimática in vitro de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e de iniciadores específicos (primers). Os primers delimitam a seqüência de DNA de fita dupla a ser amplificada, do qual o resultado são milhões de cópias idênticas. (MULLIS & FALOONA, 1987).

A PCR é conhecida como a primeira etapa nos procedimentos laboratoriais de uma metodologia popular de genotipagem chamada de PCR-RFLP. A PCR-RFLP se baseia na diferenciação dos organismos pela análise de padrões derivados da clivagem do seu DNA. O primeiro passo para análise é a amplificação de um fragmento específico (PCR), seguido por um tratamento do fragmento amplificado

com uma enzima de restrição pertinente chamado de RFLP. (RASMUSSEN, 2012).

A RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphisms) é o procedimento onde o fragmento gerado da PCR, é purificado e submetido a um tratamento com uma enzima de restrição específica que reconheça apenas um dos alelos. Cada enzima cliva o DNA em sequências nucleotídicas específicas. Sendo que a presença ou ausência do reconhecimento das enzimas de restrição resulta na formação de fragmentos de restrição de diferentes dimensões. Posteriormente, os fragmentos são reconhecidos por eletroforese para diferenciação dos alelos por tamanho. (CAETANO, 2009; RASMUSSEN, 2012).

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta de dados foi realizada entre os anos de 2016 e 2017, nas propriedades Santa Rita, Fazenda Grande e Fazenda Igrejinha pertencentes a parte do planalto serrano do estado de Santa Catarina. Foram coletadas as amostras de pelos da vassoura da cauda de 110 bovinos da raça Crioula Lageana. Cada amostra continha aproximadamente 50 pelos, que foram acondicionadas em embalagens individuais devidamente identificadas. O excesso dos pelos foi cortado com tesoura, e fios de cerca de 3 cm contendo os folículos pilosos foram acondicionados. Posteriormente, cerca de 40 folículos/animal foram transferidos para tubos de microcentrífuga (1,5 mL) identificados com a numeração do animal e mantidos a -20° C até o momento da extração do DNA genômico.

As análises foram realizadas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal (LEPGA) da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado no Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis/SC, este projeto teve apoio financeiro da FAPESC.

Para a etapa de extração do DNA genômico dos folículos pilosos, foi utilizada a metodologia PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool-isoamílico), adaptada de Lima (2003). Inicialmente dentro de cada microtubo de 1,5 mL contendo os folículos foram adicionados 500 µL de solução TE-TWEEN, seguido de incubação em banho-maria a 65°C por 1,5 horas com agitação manual periódica. Posteriormente foi adicionado 15 µL de proteinase K (20 µg/µL) incubando-se as amostras a 55°C por 6 horas, agitando-se por inversão a cada 30 minutos e depois a 37°C overnight. Após esta etapa, foi adicionado 1 volume de PCI (fenol-clorifórmioálcool isoamílico – 25:24:1) para 1 volume de amostra e os tubos passaram por vigorosa agitação por 10 segundos em agitador automático tipo vórtex. Em seguida foi feita centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 23°C, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo devidamente identificado, resultando em um volume final de aproximadamente 300 µL. A precipitação do DNA foi feita com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M (cerca de 30 µL) e etanol absoluto gelado (1000 µL), sendo feita a mistura por imersão seguida de repouso durante 1,5 horas a -20°C com uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Finalmente foi descartado o sobrenadante, sendo o DNA remanescente seco a temperatura ambiente e em seguida ressuspensionado em 100 µL de água ultrapura e armazenado a 4°C até o momento do uso.

Após as extrações, as amostras de DNA foram submetidas a verificação quanto a eficiência da metodologia de extração. Cerca de 4 µL de cada amostra foi misturada a 3µL de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol) e submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,5%) com brometo de etídio, em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) a 50V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização foi feita sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX® (Loccus Biotecnologia). As imagens dos géis foram registradas com o software L-Pix Imagem Ex®.

Para o isolamento e amplificação de um fragmento de 389pb correspondente a região parcial do íntron 6 e éxon 7 do gene da beta-caseína, área do gene responsável pela codificação da proteína, foi utilizado um par de primers previamente desenhados (CAMARGO, 2012) com as regiões de interesse, contendo as respectivas sequências de nucleotídeos:

Forward - 5'TGACCCCAATTTCTTAACCAAACCAA3'

Reverse - 5'CTGGCTTTCAGTAAAGGGCTCAACTG 3'

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL/amostra, contendo 100ng aproximadamente 3 µL de DNA genômico, 0,5 µL de cada primer, 3,0 µL tampão PCR 1X, 100µM de dNTPS aproximadamente 0,5 µL, 0,5 U EasyTaq® DNA Polymerase (Trans Gen Biotech®) aproximadamente 0,6 µL e 16,9 µL de H₂O ultrapura. Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador Biometra®, e seguiram a seguinte programação: 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguindo-se de 36 ciclos de 95°C por 1 minuto para desnaturação, 62,0° C por 1 minuto para anelamento dos primers e 72°C por 1 minuto para extensão da Taq Polimerase. Por fim um ciclo de 72 °C por 5 minutos e após este último as amostras foram mantidas a 4°C para conservação até a retirada do termociclador. Para a escolha da temperatura ideal para realização da técnica de PCR foi efetuado um gradiente de temperatura onde foi observado qual a temperatura mais adequada para o anelamento dos primers.

Para verificar o resultado da reação de amplificação, uma alíquota de 5µL de cada amostra foi diluída em 3µL de tampão de corrida (azul de Bromofenol e glicerol), como padrão de peso molecular foi utilizado 4µL de 1KbPlus e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando tampão TBE 1X e brometo de etídio (0,05 µg/ml) a 60V por aproximadamente 60 minutos. Após esta etapa, o gel foi

exposto a luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX® (Loccus Biotecnologia). As imagens dos géis foram registradas com o software L-Pix Imagem Ex®.

Após o isolamento e à amplificação da região de interesse do gene da beta caseína pela PCR, as amostras foram submetidas à técnica de PCR-RFLP, que consiste na digestão por enzimas de restrição, as quais reconhecem sequências específicas de bases no DNA, onde a alteração de um par de bases pode criar ou abolir um sítio de restrição em um determinado locus do genoma, gerando um polimorfismo (REGITANO e COUTINHO, 2001). Neste trabalho, a aplicação da técnica de RFLP para tentar identificar polimorfismos foi realizada utilizando-se as enzimas de restrição: HinfI (BioLabs®), com o seguinte sítio de restrição: 5'-G↓ANTC -3' 3'-CTNA↑G -5'; Ban II (Eco24I) (Thermo Scientific ®) com sítio de restrição: 5' -GRGCV↓C -3' 3' C↑YCGRG5'; e Xmn I (BioLabs®), com sítio de restrição 5' -GAANN↓NNTTC - 3' 3' - CTTNN↑NNAAG - 5', que reconheciam estas sequências nos 389 pb apresentada entre o íntron 6 e éxon 7 do gene da beta-caseína.

As digestões foram realizadas em termociclador Biometra® em um volume final de 20 µL/amostra, contendo 10 µL do produto da PCR, 1/10 de tampão para enzima de restrição, 3 unidades das enzimas HinfI, BanII e Xmnl e 6,7 µL de H₂O ultrapura. A digestão da enzima Hinf I foi feita por 20 minutos a 37°C depois 20 minutos a 80°C para inativação da enzima e finalmente 4°C para conservação das amostras até a análise. A digestão da enzima Xmnl foi feita por 20 minutos a 37°C e posteriormente a 65°C por 20 minutos para inativação da enzima e, por último a 4°C para conservação das amostras até a análise. A digestão da enzima Ban II foi feita por 1h30m a 37°C depois 20 minutos a 65°C para inativação da enzima e finalmente 4°C para conservação das amostras até análise final e fotodocumentação.

Após a digestão, uma alíquota de 5µL de cada amostra foram misturados a 3µL de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol), e como padrão de peso molecular foi utilizado 4µL de 1KbPlus, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2,5%, em tampão TBE 1X com brometo de etídio a 60V por aproximadamente 1 hora e 40 minutos. A visualização do padrão eletroforético de migração das bandas ocorreram sob luz ultravioleta e foram fotodocumentados na L-Pix EX® (Loccus Biotecnologia).

As análises feitas a partir da visualização do padrão de migração de bandas, permitiram posteriormente calcular as frequências gênicas (x_i e x_j) e genóticas (x_{ii} , x_{ij} e x_{jj}), que foram determinadas a partir da contagem direta dos genótipos observados e estabelecidas com as seguintes equações:

$$x_i = \frac{n_{ii} + (0,5n_{ij})}{n} \qquad x_j = \frac{n_{jj} + (0,5n_{ij})}{n}$$

$$x_{ii} = \frac{n_{ii}}{n} \qquad x_{ij} = \frac{n_{ij}}{n} \qquad x_{jj} = \frac{n_{jj}}{n}$$

Onde n_{ii} , n_{jj} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados nos alelos i e j , respectivamente e n corresponde ao número de indivíduos analisados.

Para testar as frequências observadas, foi realizado cálculo de teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo que o princípio da lei de Hardy-Weinberg se dá pela expansão do binômio descrito:

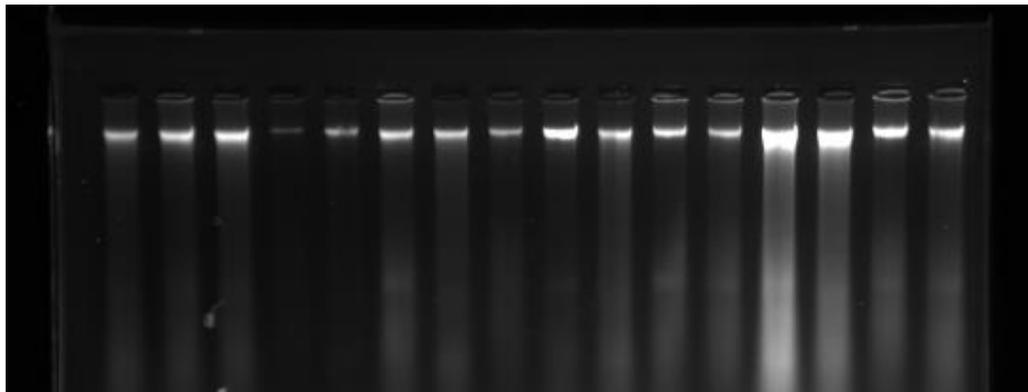
$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + x_j^2$$

Em que: x_i^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo i ; $2x_i x_j$ = frequência esperada para heterozigotos ij ; x_j^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo j .

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica utilizada para extração do DNA genômico dos folículos pilosos dos bovinos da Raça Crioula Lageana foi eficiente conforme mostrada na Figura 8, na qual a primeira banda formada pelo padrão de migração, mostra uma quantidade satisfatória de DNA. Uma quantidade pequena das amostras apresentaram bandas arrastadas o que sugere sinais de degradação do DNA e a banda formada no fim do padrão de algumas amostras indica RNA (SALMAM e LAUREANO, 2006). Contudo, esses sinais de degradação do DNA e a presença de RNA não comprometeram as análises posteriores.

Figura 8 - Imagem representativa dos resultados obtidos nas extrações de DNA. Eletroforese em gel de agarose a 0,5%.

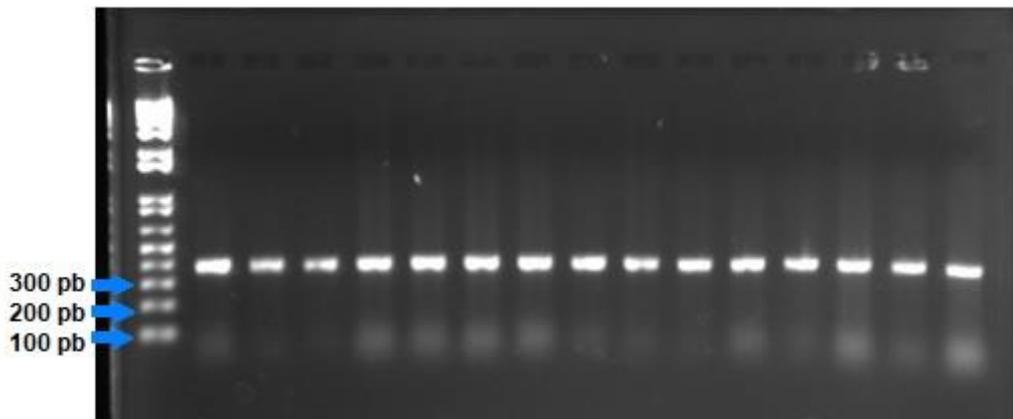


Os resultados obtidos na extração do DNA genômico corroboram com Laureano et al. (2006) que também utilizaram a técnica adaptada de Lima (2003) para extração de pelos de novilhas da raça Nelore.

Para a realização da técnica de PCR, foi realizado um teste de gradiente de temperatura, para garantir a escolha da temperatura ideal de anelamento dos primers. A que resultou visualmente em um melhor anelamento foi 62°C.

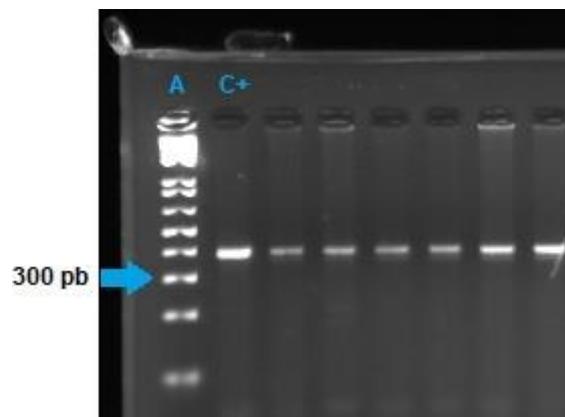
Os resultados obtidos da PCR mostraram que os fragmentos amplificados continham aproximadamente 389 pb (Figura 10), indicando o funcionamento correto dos primers e a eficiência da técnica quanto ao isolamento e amplificação da região de interesse da Beta Caseína.

Figura 9 - Imagem representativa do resultado das análises de PCR indicando fragmento do gene da Beta Caseína, utilizando os iniciadores B-Cas FWD e REV. Gel de agarose a 1%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).



Os resultados obtidos a partir da PCR, posteriormente permitiram a realização da técnica de RFLP, onde as amostras que continham apenas a região de interesse parcial do íntron 6 e éxon 7 do gene da beta-caseína foram digeridos pelas enzimas Ban II, XmnI e Hinf I. As técnicas utilizadas na Ban II e Xmn I não foram eficientes (Figura 11), observamos que não houve a digestão do fragmento estudado.

Figura 10 - Eletroforese da técnica de RFLP com a Enzima Xmn I. Gel de agarose a 2,5%. A= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen®). C+= controle positivo com produto de PCR.

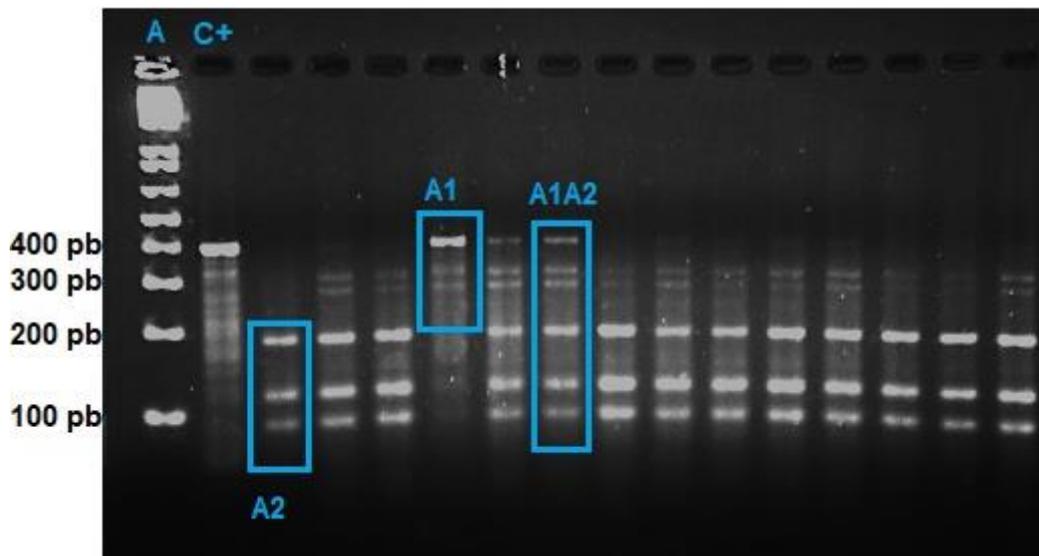


Deve-se lembrar que estas enzimas possuem sítios de restrição no fragmento estudado, porém a não eficiência pode ser dada pelo tempo de digestão submetido,

que possui uma variação de ajuste. As enzimas mencionadas submetidas a um tempo maior de digestão neste fragmento específico podem gerar resultados satisfatórios, sendo necessários mais estudos e mais testes para confirmar o tempo ideal.

As reações de digestão utilizando a enzima de restrição Hinf I, mostraram eficiência da técnica RFLP. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o produto amplificado da PCR foi digerido formando três padrões diferentes (Figura 12).

Figura 11 - Eletroforese representativa dos diferentes padrões de bandas observados no resultado da técnica PCR-RFLP com utilização da enzima Hinf-I. Gel de Agarose a 2,5%. A= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen®). C+= controle positivo com produto de PCR.



A análise da RFLP, após a eletroforese em gel de agarose (2,5%), permitiu a identificação de 3 padrões de migração das bandas distintos: dois homozigotos (A1) e (A2) e um heterozigoto (A1A2), sendo que apenas um animal mostrou padrão homozigoto A1. Tal resultado caracteriza a existência de polimorfismo na região do gene do beta-caseína analisada com a utilização da enzima Hinf I.

O padrão de migração de banda que indica a genotipagem homozigota A2, corrobora com os resultados obtidos por estudos de Otaviano (2006), que indicaram frequência homozigota A2A2 em bubalinos e bovinos (*Bos taurus*), analisados para o gene da beta caseína com a enzima de restrição Hinf I, com padrão de migração de bandas similares.

Das 110 amostras iniciais, sete (7) amostras não foram possíveis de analisar devido à falta de fragmentos observados no gel de agarose da eletroforese resultante da técnica de RFLP, ocasionando uma amostragem total e final de 103 animais analisados.

As respectivas frequências gênicas e genotípicas obtidas entre os 103 animais avaliados estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Frequências gênicas e genotípicas observadas e calculadas.

	Genótipos Observados			Frequências Alélicas ^{ns}
	A1A1	A1A2	A2A2	
Frequência	0,01	0,301	0,689	f (A1) = 0,16 f (A2) = 0,84
N	1	31	71	

ns = não significativo para teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg

Os resultados obtidos com o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg sugerem que as frequências observadas na região estudada nos animais avaliados não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Isto pode ser atribuído a efeitos de seleção natural dos animais genotipados, o que contribui para alterações nas frequências alélicas a cada geração na população de animais da raça Crioula Lageana. Este é um indicativo da variabilidade genética na população.

Os resultados obtidos mostram uma frequência superior do alelo A2 em relação ao A1, sendo este um indicativo do potencial genético da raça Crioula Lageana para a produção do leite tipo A2. Porém é necessário que se façam mais estudos para comprovar esse potencial, procurando explorar populações maiores e com análise do leite, buscando relacionar o potencial genético com a produção real dessa proteína no produto final.

Os resultados obtidos divergem dos resultados encontrados por Otaviano (2006), onde a mesma região do gene estudada com a enzima de restrição Hinf I, resultou em animais monomórficos com genótipo A2A2, para todas as raças estudadas, incluindo subespécies *Bubalinas*, *Bos Indicus* e *Bos Taurus*. Contudo, os resultados obtidos por ele utilizando a enzima de restrição Hae III, corroboram com as frequências encontradas, onde animais da raça Holandesa (*Bos taurus*), resultaram em polimorfismo com frequências de A1 de 0,12 e de A2 0,88.

Camargo (2012), encontrou polimorfismo e frequências parecidas estudando animais da raça Gir, onde a população de animais estudados apresentou frequências do alelo A1 de 0,11 e do alelo A2 de 0,88.

Estes resultados nos mostram que as raças criadas em território nacional, tem um grande potencial para o segmento de produção do leite tipo A2, e essa variabilidade genética facilita também a seleção assistida por marcadores moleculares

nos rebanhos brasileiros, incluindo os rebanhos dos produtores da raça Crioula Lageana.

Com uma futura comprovação das associações dos genótipos obtidos a informações fenotípicas para características de interesse, é possível viabilizar a seleção assistida pelos marcadores em programas de melhoramento da raça.

6.0 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através das técnicas de PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição Hinf I, permitiram identificar polimorfismos para a região estudada do gene da β -caseína em animais da raça Crioula Lageana. As análises mostraram que o alelo A2 se encontra em uma frequência bastante superior à do alelo A1 na população estudada, o que agrega valor ao leite dos animais desta raça.

7.0 REFERÊNCIAS

Boye J, Wijesinha-Bettoni R, Burlingame B. **Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method.** Br J Nutr. 2012

BRASIL. Portal Brasil. Governo Brasileiro. **Economia E Emprego: Rebanho bovino brasileiro cresce e chega a 212,3 milhões de cabeças de gado.** 2015. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/10/rebanho-bovino-brasileiro-cresce-e-chega-a-212-3-milhoes-de-cabecas-de-gado>>. Acesso em: 10 de abril de 2017.

Brito MA, Brito JR, Arcuri E, Lange E, Silva M, Souza G. **Composição do leite.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agência de Informação Embrapa. 2014. Disponível em:

BUSO, Glauca Salles Cortopassi et al. **Manual de Utilização de Marcadores Moleculares para Análise de Diversidade Genética.** Brasília, Df: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009. 29 p.

CAETANO, A. R.. **Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro.** R. Bras. Zootec. 2009, vol.38, p.64-71.

CAMARGO, Gregório Miguel Ferreira de et al. **Identificação de alelos A1 e A2 para o gene da beta-caseína na raça Gir Leiteiro.** In: IX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 9., 2012, João Pessoa. **Artigo.** João Pessoa: Sbma, 2012. p. 0 - 0.

CONAB. **Leites e Derivados: Mercado nacional.** Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, v. 1, Abril - 2016. Semestral. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_04_17_33_34_leite_abril_2016.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2016.

DIAS, Daniel. **Leite: Pesquisadores descobrem solução para o produtor produzir leite que não causa alergia.** 2016. Disponível em: <<http://blogs.canalrural.com.br/danieldias/2016/09/02/559/>>. Acesso em: 15 dez. 2016

ELIAS, A. C. **O centenário do Herd-Book Collares: 100 anos.** 380 Pelotas, RS: Futura.rs Comunicação & Marketing, 2006. 348 p.

Elliot, Bob R; Harris, Dp, Hill, JP, et al. **Type I (insulindependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption.** Diabetologia 42:292-296, 1999.

EMBRAPA (Org.). **Panorama do Leite:** Embrapa gado de leite. 75. ed. Juiz de Fora: Intelactus, 2015. 14 p. Disponível em:

EUCLIDES FILHO, K. O melhoramento Genético Animal no Brasil: fundamentos, história e importância. Campo Grande, Embrapa Gado de Corte. 1999, 63p. FCAV, 2003.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

Gobbetti, M., Stepaniak L., De Angelis, M., et al. **Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing.** Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 42:223-239, 2002.

Haug A, Hostmark AT, Harstad OM. **Bovine milk in human nutrition – a review.** Lipids Health. Dis. 2007;6: 1–16.

HOMAN, E.J.; WATTIAUX, M.A. **Technical dairy guide: lactation and milking.** 2.ed. Madison: University of Wisconsin, 1996

JIANQIN, Sun et al. **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. abr. 2016. Disponível em: <<http://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12937-016-0147-z>>. Acesso em: 18 dez. 2016.

Laugesen, Murray; Elliott, Bob R, . **The influence of consumption of A1 beta-casein on heart disease and Type 1 diabetes.** New Zealand Medical Journal 116, 2003.

LAUREANO, M. M. M.; OTAVIANO, A. R.; COSTA, R. B.; et al. **Characterization of polymorphisms within insulin-like growth factor-i and prolactin genes of three groups of nellore heifers.** World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2006. Belo Horizonte.

LIMA, S. P. G. **Estudos do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio do crescimento bovino, em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama.** Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_2172003 Acesso em: 18 dez. 2016.

MCLACHLAN, C. N. **Beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses.** Medical hypotheses, v. 56, n. 2, p. 262, 2001

OLIVEIRA, Jean Gomes de. **Qual é o problema entre os leites A1 e A2?** 2016. Disponível em: <<http://www.saberatualizado.com.br/2016/02/qual-e-o-problema-entre-os-leites-a1-e.html>>. Acesso em: 16 dez. 2016.

OTAVIANO, Antônio Roberto. **Polimorfismo dos Genes das Caseínas e sua utilização na detecção de misturas de leite bovino e bubalino.** 2006. 83 f. Tese (Doutorado) - Curso de Zootecnia, Unesp, Jaboticabal - São Paulo, 2006.

PAL, Sebely et al. **Milk Intolerance, Beta-Casein and Lactose.** Nutrients. Austrália, p. 7285-7297. ago. 2015. Disponível em:

<<http://d1c7lpjmvh0qr.cloudfront.net/uploads/x/h/h/Milk-Intolerance-Beta-Casein-and-Lactose-pal-et-al-2015.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2017.

PECCHIONI, N.; FACCIOLI, P.; MONETTI, A.; STANCA, A.M.; TERZI, V. Molecular markers for genotype identification in small grain cereals. *Journal of Genetics & Breeding*, v.50, p.203-219, p. 1996

PEREIRA, Jonas Carlos Campos. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. 5. ed. Belo Horizonte - Mg: Fepmvz Editora, 2008.

PRIMO, A.T., **Conservación de Recursos Genéticos Animales el Brasil**. In; Ganado Bovino Criollo, 224p., Buenos Aires-Argentina, 1986

RASMUSSEN, H. B. **Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting**. Denmark: Institute Of Biological Psychiatry, Mental Health Centre Sct. Hans, S/D.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (Ed.). **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 215 p.

SALMAM, A. K. D.; LAUREANO, M. M. M. **Protocolos para extração de DNA genômico de amostras de pelo de bovinos**. Embrapa Rondônia, Circular técnica, v. 87, 2006.

SBAN. **A Importância Do Consumo De Leite No Atual Cenário Nutricional Brasileiro**. Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. 1ª Ed. 2015. Pg 27.

Souza GT, Et. al. **Dietary whey protein lessens several risks factors for metabolic diseases: a review**. *Lipids Health Dis*. 2012

TOPPA, Eder Victor Braganti; JADOSKI, CIÉber Junior. **O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas**. São Paulo: Scientia Agraria Paranaensis, 2013.

VERCESI FILHO, Anibal Eugênio. **Identificação De Alelos Para O Gene Da Beta-Caseína Na Raça Gir Leiteiro**. Pesquisa e Tecnologia, São Paulo, v. 8, n. 2, dez. 2011. Semestral.

VILELA, Duarte; RESENDE, João Cesar. **Cenário Para A Produção De Leite No Brasil Na Próxima Década**. In: VI SUL LEITE – PERSPECTIVAS PARA A PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL, 6., 2014, Maringá. **Artigo - Anais**. Maringá: Ufm, 2014. v. 1, p. 1 - 18.

Disponível

em:

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1019945/1/ArtigoAnais6SulleiteVilela.pdf> . Acesso em: 16 dez. 2016.

WOODFORD, Keith. **DEVIL IN THE MILK: Illness, health, and the politics of A1 and A2 milk**. 2. ed. New Zealand: Chelsea Green Publishing Company, 2007. 257 p.

ZOCCAL, R. **Conjuntura do Mercado Lácteo. Centro de Inteligência do Leite.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/content/conjuntura-do-mercado-l%C3%A1cteo>.