

POLIMORFISMO DO GENE β -CASEÍNA EM BOVINOS

Lima A.C.J.^{1,2}, Lara M.A.C.^{1*}

¹Instituto de Zootecnia, Centro de Genética e Reprodução Animal, URL- Genética, Nova Odessa, SP, Brasil.

*malara@iz.sp.gov.br.

²Aluna de Mestrado – Programa de Produção Animal Sustentável – Instituto de Zootecnia, Nova Odessa – SP.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi conhecer a variabilidade no exon 7 do gene β -caseína em quatro raças bovinas. Um total de 155 bovinos das raças Caracu, Gir, Holandês e Sindi foi investigado. Após a extração de DNA pelo método salino, a identificação dos alelos A1 e A2 foi realizada pela técnica de PCR-RFLP, utilizando-se a enzima de restrição *Nsi*I. Apenas o alelo A2 foi detectado na raça Sindi. Nas demais raças, as frequências do alelo A2 variaram de 0,5 (Holandês) a 0,92 (Gir). As frequências dos genótipos A1A1, A1A2 e A2A2, estimadas para o Caracu, foram 0,08, 0,58 e 0,34 e, para o Gir, 0,02, 0,13 e 0,85, respectivamente. Esses resultados revelam o potencial genético das raças investigadas para produção de leite e será de grande valia para a seleção de animais com genótipos A2, além de poder agregar valor ao leite produzido.

Palavras-chave: Leite; Intolerância ao leite de vaca; Marcador molecular; PCR-RFLP.

POLYMORPHISM OF β -CASEIN GENE IN CATTLE

ABSTRACT

The aim of this study was to know the variability in exon 7 of β -casein gene in four breeds. A total of 155 animals of Caracu, Gir, Holstein and Sindi breeds was investigated. After DNA extraction by salt method, the identification of alleles A1 and A2 was performed by PCR-RFLP technique, using the restriction enzyme *Nsi*I. Only the A2 allele was detected in Sindhi breed. The observed A2 allele frequencies in other breeds, ranged from 0.50 (Holstein) to 0.92 (Gir). The frequencies of genotypes A1A1, A1A2 and A2A2, estimated for the Caracu, were 0.08, 0.58 and 0.34 and for the Gir, 0.02, 0.13 and 0.85, respectively. These results reveal the genetic potential of the breeds investigated for milk production, and will be of great interest for the selection of animals with genotypes A2 in order to increase the value of the milk produced.

Keywords: Milk; Intolerance to cow's milk; Molecular marker; PCR-RFLP.

INTRODUÇÃO

O leite é uma fonte comum de proteína animal de grande importância na alimentação humana. O leite de vaca contém dois grandes grupos de proteínas: caseínas e as proteínas do soro. As caseínas se subdividem em quatro grupos (α S1, α S2, β e κ -caseína) (Hanusová *et al.*, 2010). Dentre elas, a β -caseína é a segunda mais abundante no leite de vaca, constituindo até 45% das caseínas totais e contém 209 aminoácidos, localizados no cromossomo 6 (Sulimova *et al.*, 2007). Segundo a literatura existem 13 variantes genéticas descritas (A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G) (Rahimi *et al.*, 2015). Nas raças de gado leiteiro as variantes mais comuns de β -caseína são A1 (CSN2-A1) e A2 (CSN2-A2), enquanto as variantes A3 e C são raras. A substituição de um nucleotídeo de citosina pelo nucleotídeo adenina no gene da β -caseína ocasiona a substituição de histidina, que está presente na variante A1, por prolina, na variante A2, na posição 67 da cadeia da β -caseína (Damiane *et al.*, 1992; Lien *et al.*, 1992; Sharma *et al.*, 2013; Stewart *et al.*, 1987). Os peptídeos bioativos são liberados por hidrólise enzimática de proteínas com as enzimas gastrintestinais, geralmente pepsina e tripsina (Korhonen & Pihlanto, 2006). A variante de A1 produz β -casomorfina7 (BCM-7) como um peptídeo bioativo com morfina, cuja atividade poderá desempenhar um papel no desenvolvimento de algumas doenças humanas (Rahimi *et al.*, 2015). A presença de prolina em vez de histidina na variante A2 evita a hidrólise da ligação peptídica entre os resíduos 66a

e 67a na β -caseína A2 e inibe a produção de BCM-7 (Sharma *et al.*, 2013). Assim sendo, o conhecimento da variabilidade genética de bovinos para o gene beta-caseína é de grande importância para a cadeia de produção leiteira. O presente estudo teve como objetivo conhecer o polimorfismo no exon 7 do gene beta-caseína em quatro raças bovinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 155 bovinos das raças Caracu (N=26), Gir (N=120), Holandês (N=4) e Sindi (N=5) foi investigado. O DNA genômico foi obtido a partir de 6-8 folículos (pêlo com bulbo/amostra) coletados da vassoura da cauda. O protocolo de extração utilizado foi o método salino, que consistiu em incubar as amostras em 300 μ L de tampão de lise pH 8,0 (Tris 0,5M, EDTA 0,1M, SDS 2%) e 5 μ L proteinase K (10mg/mL) a 55°C com agitação de 250rpm constante. Após cerca de pelo menos 12 horas de incubação, adicionou-se 350 μ L de acetato de amônio 7M. As amostras foram purificadas por centrifugação a 14.000 rpm, 4°C, durante 15 min. O DNA foi precipitado adicionando-se 700 μ L de isopropanol e lavado em 200 μ L de etanol 70%, empregando-se a centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. As amostras foram ressuspensas em 50 μ L de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), quantificadas e diluídas para uma concentração de 50ng/ μ L. As análises do exon 7 para a identificação dos alelos A1 e A2 de beta-caseína foi realizada pela técnica de PCR-RFLP. Um fragmento de 325pb foi amplificado por PCR em um volume final de 25 μ L, contendo tampão 1x (20mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl) cerca de 100 ng de DNA, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0,5 unidade de Taq DNA-polimerase e 0,20 μ M de cada primer (F: 5'-AGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGACCCATGC-3' e R: 5'-GGAGGAAACATGACAGTTGGAGGAAG-3'). Os parâmetros do ciclo térmico de PCR foram: 1 ciclo a 95°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 45 seg, 63°C por 45 seg e 72°C por 45 seg, seguidos por uma extensão final de 10 min a 72°C. A identificação dos alelos A1 e A2 foi realizada pela técnica de PCR-RFLP, utilizando-se a enzima de restrição *Nsi*I. Uma alíquota de 3 μ L do produto amplificado foi digerido com 5 U da enzima *Nsi*I a 37°C durante 16 horas. Os RFLP foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e, os produtos de restrição, visualizados após coloração com prata, descrita por Sanguinetti *et al.* (1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de PCR-RFLP empregada no presente estudo permitiu conhecer a variabilidade genética de bovinos em relação ao gene β -caseína. O produto de

325pb obtido por PCR, após hidrólise com a enzima de restrição *NsiI*, revelou dois padrões de restrição.

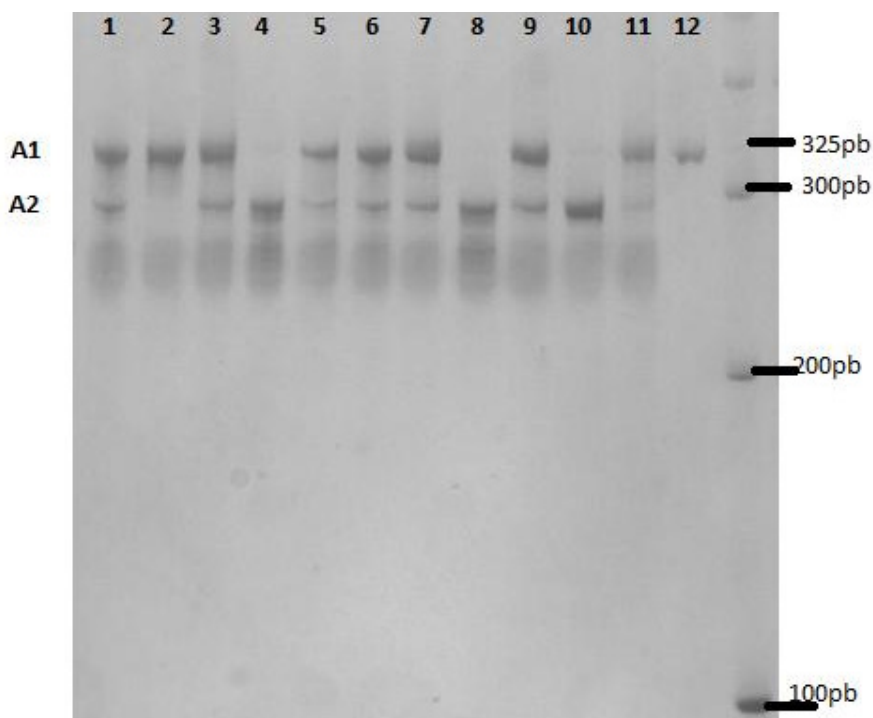


Figura 1. Análise de RFLP do exon 7 do gene β -casina em gel de poliacrilamida 10%, apresentando os padrões de fragmentos de restrição obtidos com a enzima *NsiI*, caracterizando os alelos A1 e A2. Amostras 1, 3, 5, 6, 7, 9 e 11: genótipo A1A2. Amostras 4, 8 e 10: genótipo A1A1. Amostras 2 e 12: genótipo A2A2. Ladder de 100pb. (*Analysis of RFLP of exon 7 for β -casein on acrylamide PAGE 10%, showing the patterns of restriction fragments obtained with the enzyme *NsiI*, featuring the alleles A1 and A2. Samples 1, 3, 5, 6, 7, 9 and 11: Genotype A1A2. Samples 4, 8 and 10: Genotype A1A1. Samples 2 and 12: Genotype A2A2 genotype. 100pb Ladder*).

Como pode ser visto na Figura 1, o alelo A1 apresentou um sítio de restrição para *NsiI*, sendo caracterizado pela presença de duas bandas que correspondiam aos fragmentos com 285 pb e 40 pb. O alelo A2 não apresentou nenhum sítio de restrição para a referida enzima, sendo caracterizado por uma única banda, cujo fragmento apresentou 325 pb. Os animais homocigotos A1A1 foram identificados pela presença do fragmento com 285 pb, os homocigotos A2A2, pela presença do fragmento com 325 pb e, os heterocigotos A1A2, por ambos os fragmentos. A β -caseína apresentou-se monomórfica na raça Sindi. Nas demais raças, as frequências do alelo A2 variaram de 0,5 (Holandês) a 0,917 (Gir). As frequências

genotípicas estimadas para o Caracu para A1A1, A1A2 e A2A2 foram 0,08, 0,58 e 0,34 e, para o Gir, 0,017, 0,133 e 0,850, respectivamente. Os resultados obtidos principalmente em relação às populações Gir e Sindi, onde o alelo favorável A2 foi mais freqüente demonstra a importância dessas raças para a produção de leite. Estudos realizados em outros países evidenciaram, em um rebanho envolvendo dez raças de bovinos, onde 21,4% dos genótipos eram A1A1, 47,6% A1A2 e 30,9% A2A2. (Keating *et al.*, 2008). Rahimi *et al.* (2015) estudando raças autóctones do Irã (Província de Kermanshah) observaram que os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 ocorreram em frequências de 0,168, 0,427 e 0,405, respectivamente. Na Eslováquia, 96% dos animais da raça Holstein possuem o alelo A1 enquanto apenas 4% o alelo A2 (Hanusová *et al.* 2010). Na mesma região, Miřuchová *et al.* (2009) avaliaram a raça Pinzgau e obtiveram frequência alélica para A1 de 56% e para A2 44%, raça ao qual foi alvo de estudos por Beja-Pereira *et al.* (2003) e também encontrou altos índices do alelo A2. Apesar de ainda poucos, estudos vêm demonstrando que o polimorfismo do gene da β -caseína está presente em diversas raças ao redor do mundo todo. Visando como objetivo o combate e prevenção à saúde dos consumidores de leite, o alelo A1, deve ser identificado nos rebanhos produtores, uma vez que, a produção de leite proveniente de bovinos leiteiros com a presença do genótipo A2 pode minimizar riscos de doenças além de ser melhor balanceado e saudável nutricionalmente.

CONCLUSÕES

Considerando que a β -caseína do tipo A1 está relacionada a processos alérgicos e intolerância alimentar, doenças coronarianas, entre outras, além de, não ser adequada ao processo de fabricação de queijos nobres, recomenda-se a identificação prévia e/ou a seleção precoce de reprodutores com genótipos A2, a fim de agregar valor nutricional ao leite, implementar o programa de melhoramento genético e também beneficiar financeiramente os criadores.

BIBLIOGRAFIA

- Beja-Pereira, A., Luikart, G., England, P.R., Bradley, D.G., Jann, O.C., Bertorelle, G., Chamberlain, A.T., Nunes, T.P., Metodiev, S., Ferrand, N., Erhardt, G. 2003. Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nature Genetics*, 35: 311-313.
- 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
- Hanusová E., Huba J., Oravcová M., Polák P., Vrtková I., 2010. Genetic variants of beta casein in Holstein dairy cattle in Slovakia, *Slovak Journal Animal Science*, 43: 63-66

- Keating, A., Smith, T., Ross, R., Cairns, M., 2008. A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to β -casomorphin. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 47: 99-104.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal* 16: 945-960.
- Lien, S., Alestrom, P., Klungland, H. and Rogne, S. 1992. Detection of multiple β -casein alleles by amplification created restriction sites (ACRS). *Animal Genetics* 23: 333–338.
- Mil'uchová, M.; Trakovická, A.; Gábor, G. 2009. Analysis of polymorphism of beta casein of Slovak Pinzgau cattle by PCR-RFLP for alleles A1 and A2. *Lucrări Stiintifice Zootehnie si Biotehnologii*, 42: 288-292.
- Rahimi Z., Gholami M., Rahimi Z., Yari K.. 2015. Evaluation of beta-casein locus for detection of A1 and A2 alleles frequency using allele specific PCR in native cattle of Kermanshah, Iran. *Biharean Biologist* 9: art.141136
- Sanguinetti, C.J.; Neto, E.D.; Simpson, A.J.G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 17:914-921.
- Sharma, V., Sharma, N., Jawed, B., Nautiyal, S.C., 2013. High resolution melt curve analysis for the detection of A1, A2 β -casein variants in Indian cows. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 3: 44-148.
- Sulimova, G., Azari, M.A., Rostamzadeh, J., Abadi, M.M., Lazebny, O. 2007. κ -casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. *Russian Journal of Genetics* 43: 73-79.
- Stewart, A.F., Bonsing, J., Beattie, C.W., Shah, F., Willis, I.M., Mackinley, A.G. 1987. Complete nucleotide sequences of bovine α s2- and β -casein cDNAs: comparison with related sequences in other species, *Molecular Biology and Evolution*, 4: 231–241.