



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA TROPICAL

KÁTIA REGINA FERREIRA SOUSA

**FREQUÊNCIAS GÊNICAS E GENOTÍPICAS DAS VARIANTES A1 E A2 DA β -
CASEÍNA EM GADO LEITEIRO MESTIÇO E SEU EFEITO NA COMPOSIÇÃO DO
LEITE**

Teresina

2023

KÁTIA REGINA FERREIRA SOUSA

**FREQUÊNCIAS GÊNICAS E GENOTÍPICAS DAS VARIANTES A1 E A2 DA β -
CASEÍNA EM GADO LEITEIRO MESTIÇO E SEU EFEITO NA COMPOSIÇÃO DO
LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia Tropical da Universidade Federal do Piauí, como requisito à obtenção de título de Mestre em Zootecnia Tropical.

Área de concentração: Produção Animal nos Trópicos

Orientadora: Professora Dra. Tânia Vasconcelos Cavalcante

Teresina

2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação Temática da Informação

S725s Sousa, Kátia Regina Ferreira.
Frequências gênicas e genotípicas das variantes A1 e A2 da β -caseína em gado leiteiro mestiço e seu efeito na composição do leite / Kátia Regina Ferreira Sousa. -- 2022.
57 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical, 2023.

“Orientadora: Profa. Dra. Tânia Vasconcelos Cavalcante.”

1. BCM-7. 2. CSN2. 3. Leite A2. 4. Polimorfismo. I. Cavalcante, Tânia Vasconcelos. II. Título.

CDD 637.1

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

KÁTIA REGINA FERREIRA SOUSA

**FREQUÊNCIAS GÊNICAS E GENOTÍPICAS DAS VARIANTES A1 E A2 DA β -
CASEÍNA EM GADO LEITEIRO MESTIÇO E SEU EFEITO NA COMPOSIÇÃO DO
LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia Tropical da Universidade Federal do Piauí, como requisito à obtenção de título de Mestre em Zootecnia Tropical.

Área de concentração: Produção Animal nos Trópicos

Orientadora: Professora Dra. Tânia Vasconcelos Cavalcante

Aprovado em: 18 / 07 / 2023

BANCA EXAMINADORA:



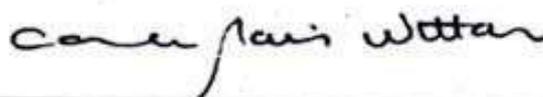
Profa. Dra. Tânia Vasconcelos Cavalcante – DCCV/CCA/UFPI

Orientadora



Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento – DZO/CCA/UFPI

Examinador Interno



Carla Maris Machado Bittar – LZT/ESALQ/USP

Examinador Externo

À minha filha Zoé Fiares, por me ensinar a ser forte, paciente e a não desistir.

À minha mãe Domingas Ferreira, pelo exemplo de coragem e perseverança e pelo apoio em todos os momentos.

A minha irmã Victória Karol e a todos meus amigos pelos momentos de alegria, auxílio e descontração.

Ao meu companheiro Wanderson Fiares pelo amor, felicidade, incentivo e apoio incondicional.

DEDICO!

AGRADECIMENTO

Ao senhor Deus, pelo dom da vida, pela força e coragem que me foi concedida durante toda esta caminhada e por colocar diante de mim pessoas especiais que possibilitaram mais essa conquista.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) pelo financiamento do projeto de pesquisa, em especial, ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia Tropical (PPGZT) pela oportunidade de complementar minha formação acadêmica e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico (CNPQ), por ter concedido a bolsa de estudos que possibilitou a realização da pós-graduação.

À professora Tânia Vasconcelos Cavalcante, pela orientação, incentivo, profissionalismo, paciência, ensinamentos e momentos de descontração. Nessa jornada foi a pessoa que sempre esteve disposta a ajudar e dar suporte para consecução deste trabalho de dissertação.

À Fazenda Diana pela parceria para a realização do experimento de campo e ao Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA/UFPI) em especial ao técnico Mauro, à residente Tatiana e à professora Feliciano, pelo apoio e orientações durante as análises laboratoriais.

Aos professores José Lindenberg Rocha Sarmiento e Max Brandão de Oliveira, pelo suporte estatístico, importantíssimo para quantificar e qualificar os resultados deste trabalho.

Aos funcionários da Fazenda Diana, em especial ao José, Adalmir, Suellen e Dinalva, pelo auxílio na coleta de amostras e no manejo dos animais.

Às amigas que ajudaram na execução do trabalho de campo e análises laboratoriais, Deborah Faustino, Gláucia Brandão, Kathleen Vitória e Nathália Castelo.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização e conclusão de mais essa etapa em minha vida...

MUITO OBRIGADA!

“Tudo parece impossível até que seja feito”

(Nelson Mandela)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dez periódicos mais produtivos na área da pesquisa.....	22
Tabela 2. Dez artigos mais citados.....	24
Tabela 3. Artigos que abordam sobre a frequência das variantes do gene CSN2 e sua influência na composição do leite.....	29
Tabela 4. Artigos publicados que abordam sobre o efeito das variantes A1 e A2 da β -caseína na saúde humana.....	31
Tabela 1. Artigos publicados sobre Influência do polimorfismo do gene CSN2 materno nas características de desempenho dos bezerros.....	32
Tabela 2. Artigos publicados sobre influência das caseínas nas propriedades funcionais do leite e derivados.....	33
Tabela 3. Frequência gênica e genotípica da β -caseína em vacas mestiças.....	49
Tabela 8. Composição físico-química do leite em função dos genótipos A1A2 e A2A2 para a β -caseína e grau de sangue das vacas mestiças.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução da produção científica relacionada ao tema do polimorfismo da β -caseína de 1945 a 2022, conforme classificado pelo banco de dados WoS.....	19
Figura 2. Distribuição (número de publicações) de pesquisas mundiais sobre polimorfismo da β -caseína por área temática, conforme classificado pelo banco de dados WoS.....	20
Figura 3. Contribuição por país para documentos de pesquisa no campo de pesquisa do polimorfismo da β -caseína no período 1973-2023.....	21
Figura 4. Fragmento das variantes genéticas A1 e A2 da β -caseína, destacando a diferenciação na posição 67 e liberação de β CM-7.....	43
Figura 5. Estimativas das médias, medianas, mínimo, máximo e coeficiente de variação (CV) relacionadas aos parâmetros composicionais do leite de vacas mestiças A1A2 e A2A2.....	49

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	10
GENERAL ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPÍTULO 1- Polimorfismo do gene CSN22 e principais temáticas de pesquisas mundiais: uma revisão sistemática	14
2. INTRODUÇÃO	17
3. METODOLOGIA	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Evolução da produção científica.....	20
4.2 Distribuição da produção científica em categorias de assunto.....	20
4.3 Distribuição das publicações por país.....	22
4.4 Principais periódicos por número de publicação.....	23
4.5 Artigos mais citados na busca.....	24
4.6 Principais tendências temáticas abordadas nos últimos 5 anos.....	26
4.6.1 Frequência das variantes genéticas do gene CSN2 e sua influência nas características composicionais do leite.....	26
4.6.2 Métodos para detecção das variantes genéticas do gene CSN2.....	29
4.6.3 Efeito das variantes A1 e A2 da β -caseína na saúde humana.....	31
4.6.4 Influência do polimorfismo do gene CSN2 materno nas características de desempenho dos bezerros.....	32
4.6.5 Efeito do polimorfismo da β -CN nas propriedades tecnológicas de produtos lácteos.....	33
5. CONCLUSÃO	34
6. REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO 2- Frequências gênicas e genótípicas das variantes A1 e A2 da β-caseína em gado leiteiro mestiço e seu efeito na composição do leite	40
7. INTRODUÇÃO	43
8. METODOLOGIA	46

8.1 Parecer do comitê de ética.....	46
8.2 Local e rebanho do estudo.....	46
8.3 Análise genotípica das vacas.....	46
8.4 Cálculo das frequências gênicas e genotípicas.....	47
8.5 Análise físico-química do leite.....	47
8.6 Análise estatística.....	48
9. RESULTADOS.....	48
9.1 Frequências alélicas e genotípicas.....	48
9.2 Associação polimórfica do gene CNS2 com características de composição do leite.....	50
10. CONCLUSÃO.....	53
11. REFERÊNCIAS.....	54
CAPÍTULO 3 - Frequência do Polimorfismo Genético da Beta-Caseína em Bovinos Mestiços Leiteiros.....	55

RESUMO GERAL

No Brasil, os bovinos mestiços, resultante dos cruzamentos entre animais das raças *Bos taurus* (européias) com *Bos indicus* (zebuínos) são responsáveis por cerca de 70% da produção de leite, bem adaptados às condições brasileiras, com boa resposta reprodutiva e por isso, devem ser utilizados em estudos de associação entre frequências gênicas da β -caseína e características físico-químicas do leite. Levando em consideração a importância do consumo do leite para nutrição humana e os possíveis benefícios que o leite contendo apenas a β -caseína A2 pode trazer para a saúde intestinal dos indivíduos e constituintes do leite, este trabalho teve como objetivo a genotipagem de 51 vacas mestiças para os alelos A1 e A2 da β -caseína, assim como estimar a associação entre o polimorfismo A1/A2 com características físico-químicas do leite (Sólidos totais, Sólidos não gordurosos, gordura, proteína, lactose, caseína, pH e densidade). Dos 51 animais genotipados, apenas 1% apresentou homozigose para o alelo A1, 27% apresentaram heterozigose (A1A2) e 70% homozigose para o alelo A2 e a população encontra-se em equilíbrio de Hardy Weinberg. A associação dos constituintes do leite e genótipos da β -caseína revelou diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) para o rendimento de gordura e sólidos totais. Em conclusão, nossos resultados indicam que os genótipos da β -caseína influenciam os parâmetros de composição do leite.

Palavras-chave: BCM-7; CSN2; Leite A2, Polimorfismo.

ABSTRACT

In Brazil, crossbred cattle, resulting from crossings between animals of the *Bos taurus* (European) and *Bos indicus* (zebu) breeds, are responsible for about 70% of milk production, well adapted to Brazilian conditions, with a good reproductive response and therefore, should be used in studies of association between gene frequencies of β -casein and physicochemical characteristics of milk. Taking into account the importance of milk consumption for human nutrition and the possible benefits that milk containing only A2 β -casein can bring to the intestinal health of individuals and milk constituents, this work aimed to genotype 51 crossbred cows for the A1 and A2 alleles of β -casein, as well as to estimate the association between the A1/A2 polymorphism and physicochemical characteristics of milk (Total solids, non-fat solids, fat, protein, lactose, casein, pH and density). Of the 51 genotyped animals, only 1% were homozygous for the A1 allele, 27% were heterozygous (A1A2) and 70% were homozygous for the A2 allele, and the population is in Hardy Weinberg equilibrium. The association of milk constituents and β -casein genotypes revealed statistically significant differences ($P < 0.05$) for fat yield and total solids. In conclusion, our results indicate that β -casein genotypes influence milk composition parameters.

Key words: BCM-7; CSN2; Milk A2, Polymorphism.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O leite é o primeiro alimento dos mamíferos, sendo considerado um alimento básico essencial da dieta humana por ser uma importante fonte de proteínas de alto valor biológico, vitaminas, sais minerais, carboidratos e lipídeos e fornece macro e micronutrientes essenciais para o crescimento, desenvolvimento e estabelecimento da saúde em todas as fases da vida.

Vários problemas de saúde humana têm sido relacionados ao consumo do leite bovino devido à reação imunológica do organismo às proteínas do leite. É preciso encontrar soluções para minimizar a ocorrência de tais reações, dada a importância do leite como fonte vital de nutrição.

As reações adversas do leite de vaca foram designadas principalmente como intolerância à lactose, principal carboidrato encontrado no leite. No entanto, investigações recentes elucidaram que um polimorfismo chave na proteína β -caseína pode contribuir para a relação entre o leite de vaca e a saúde humana (Guantário et al., 2020).

Nos últimos anos, um novo tipo de leite de vaca foi introduzido no mercado, denominado Leite A2 e vem ganhando presença no mercado de vários países, inclusive no Brasil. O leite A2 é obtido de vacas que contenham apenas a variante A2 da β -caseína e indicado para pessoas que apresentam desconforto gastrointestinal decorrente do consumo de leite de vaca.

As proteínas do leite são classificadas em dois grandes grupos: as caseínas e proteínas do soro. As caseínas representam aproximadamente 80% das proteínas lácteas totais e as proteínas do soro representam 20%. Entre as caseínas do leite, a beta-caseína ocupa a segunda posição em termos de abundância, e apresenta quinze variantes, sendo as variantes A1 e A2 encontradas mais facilmente nos rebanhos bovinos leiteiros.

Após o consumo de leite contendo a variante A1 da β -caseína, há ação das enzimas digestivas, liberando o peptídeo opioide bioativo β -Casomorfina-7 (β CM-7) que é o principal responsável por desencadear o processo alérgico e inflamatório e está associado ao atraso no tempo de trânsito intestinal. Por outro lado, a ingestão do leite A2, que contém apenas a variante A2 da β -caseína, é considerada segura, pois não há formação da β CM-7. Além disso, este tipo de leite apresenta um aumento plasmático de glutathiona que apresenta atividade antioxidante e conseqüentemente, benefícios à saúde (DETH et al., 2015).

Devido à tendência crescente no consumo de leite A2, aos seus possíveis benefícios para a saúde humana, e afim de evitar os efeitos negativos da β -caseína A1, muitos produtores em todo o mundo começaram a aumentar a frequência do alelo A2 da β -caseína em populações de gado leiteiro como uma forma de agregar valor aos seus animais e se diferenciarem no mercado.

Os estudos mais recentes têm demonstrado a frequência e os efeitos dos alelos A1 e A2 da β -caseína na composição e perfil proteico do leite nas mais variadas raças. Entretanto, a maioria das pesquisas está estritamente relacionada à animais Puro de Origem – PO, especialmente as raças Gir leiteiro ou Holandesa.

Levando em consideração que 70% de todo o leite produzido no Brasil é oriundo de animais mestiços e que a ausência de uma fixação do padrão racial pode levar à falta de informações genéticas, destaca-se a importância do desenvolvimento de pesquisas com evidências científicas relacionadas ao potencial efeito das variantes A1 e A2 da β -caseína nos constituintes do leite e caracterização genética de tais rebanhos.

Diante ao exposto, no presente trabalho objetivou-se verificar as frequências gênicas e genotípicas das variantes A1 e A2 da β -caseína em rebanhos de vacas mestiças bem como determinar a influência destes alelos nos constituintes do leite.

Esta Dissertação está dividida em três partes. A Parte I consiste de uma Revisão Sistemática sobre o polimorfismo do gene CSN22 e principais temáticas de pesquisas mundiais; A parte II refere-se ao Capítulo 2 - Frequências gênicas e genotípicas das variantes A1 e A2 da β -caseína em gado leiteiro mestiço e seu efeito na composição do leite, redigidos segundo as normas editoriais do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí; A Parte III refere-se ao Capítulo 3 – Frequência do Polimorfismo Genético da Beta Caseína em Bovinos Mestiços Leiteiros, apresentado no formato de artigo científico e publicado na Revista de Biologia e Ciências da Terra (Quallis B1), redigido de acordo com normas editoriais do periódico.

- CAPÍTULO 1 –

**POLIMORFISMO DO GENE CSN2 E PRINCIPAIS TEMÁTICAS DE PESQUISAS
MUNDIAIS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

POLIMORFISMO DO GENE CSN2 E PRINCIPAIS TEMÁTICAS DE PESQUISAS MUNDIAIS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

RESUMO - A variante A1 da β -caseína pode estar envolvida com reações inflamatórias no trato gastrointestinal humano devido ao produto resultante de sua hidrólise: a β -casomorfina-7. As variantes A1 e A2 da β -caseína são as formas mais comuns encontradas em bovinos leiteiros. Durante a digestão gastrointestinal da variante A1, um peptídeo opioide chamado β -casomorfina-7 (BCM-7) é liberado com mais frequência, o que pode levar a resultados adversos à saúde. Por esse motivo, um leite oriundo de vacas contendo apenas os alelos A2 da β -caseína, denominado “leite A2” surgiu no mercado. Neste contexto, uma revisão sistemática sobre a pesquisa de β -caseína A2 foi realizada por meio do banco de dados Web of Science (WoS). Com base nisso, o presente trabalho tem como objetivo fornecer uma visão geral do estado da arte no campo do polimorfismo da β -caseína, as principais tendências temáticas abordadas nos últimos anos, o número de publicações por ano, principais países, áreas de pesquisa e periódicos envolvidos na produção científica. Este estudo sistemático mostrou que é necessário um maior esforço para determinar as possíveis implicações deste novo produto para a saúde humana e para o mercado.

Palavras-chave: beta-casomorfina-7; caseínas; leite A2; revisão sistemática.

POLYMORPHISM OF THE CSN2 GENE AND MAIN THEMES OF RESEARCH WORLDWIDE: A SYSTEMATIC REVIEW

ABSTRACT- The A1 variant of β -casein may be involved in the development of a new intolerance: intolerance to β -casomorphin-7. The A1 and A2 variants of β -casein are the most common forms found in dairy cattle. During gastrointestinal digestion of the A1 variant, an opioid peptide called β -casomorphin-7 (BCM-7) is released more frequently, which can lead to adverse health outcomes. For this reason, a new milk called “A2 milk” has appeared on the market. In this context, a systematic review on A2 β -casein research was carried out using the Web of Science (WoS) database. Based on this, the present work aims to provide an overview of the state of the art in the field of β -casein polymorphism, the main thematic trends addressed in recent years, the number of publications per year, main countries, research areas and journals involved in scientific production. This systematic study showed that more effort is needed to determine the possible implications of this new product for human health and for the market.

Keywords: beta-casomorphin-7; caseins; A2 milk; systematic review

2. INTRODUÇÃO

O leite é um recurso alimentar simples e completo obtido das secreções das glândulas mamárias de mamíferos. As suas proteínas têm se destacado tanto no setor de laticínios quanto na indústria alimentar devido as suas características nutricionais e funcionais superiores.

Segundo dados da FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) o leite é o terceiro produto agropecuário mais produzido no mundo em termos de tonelagem. Cerca de 816 milhões de toneladas de leite são produzidos anualmente no mundo e 44,44 litros de leite são consumidos por habitante/ano (GDP, 2017).

Em bovinos, as proteínas do leite se enquadram em dois grandes grupos: as caseínas e proteínas do soro (PRIYADARSHINI et al., 2018). As caseínas representam aproximadamente 80% das proteínas lácteas totais, e, dentro delas, a β -caseína (controlada pelo gene CSN2) representa 30%. O bovino leiteiro apresenta 15 variantes de β -caseína A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I, J, K) (GAZI et al., 2022), sendo as variantes A1 e A2 mais comumente encontradas em bovinos leiteiros (MONTENEGRO et al., 2022).

A variante A2 é considerada a mais antiga, da qual as demais se originaram por mutação. As variantes A1 e A2 diferenciam-se apenas por um único aminoácido na posição 67 da cadeia peptídica; isso é, histidina (His67) na variante A1 e prolina (Pro67) na variante A2 (SEBASTIANI et al., 2020).

As variantes da β -caseína são de especial interesse porque afetam a concentração de gordura e proteína do leite, suas propriedades tecnológicas, além de afetar a saúde humana. Nos últimos anos, com o aumento da produção e consumo de produtos lácteos, problemas de saúde humana relacionados à metabolização das proteínas e açúcares presentes no leite bovino aumentaram. Estudos vêm sendo desenvolvidos para avaliar as possíveis implicações da composição da fração proteica A1 da β -CN para a manifestação da intolerância à β -Casomorfina-7 (β CM-7), visto que, muitas pessoas que se consideram intolerantes à lactose não possuem confirmação clínica (LILY & MULUMEBET, 2021).

A digestão gastrointestinal da β -caseína A1 leva à liberação de β CM-7. A β CM-7 é um peptídeo bioativo que apresenta afinidade por receptores opioides, ligando-se a eles em tecidos neuronais e não neuronais e pode estar relacionado a efeitos adversos à saúde, reduzindo a motilidade intestinal e ação da lactase (SOBCZAK et al., 2014). Em contraste, o consumo da

β -caseína A2 não causa desconfortos intestinais, pois não há liberação de β CM-7 ou ocorre em níveis muito baixos (XU LI et al., 2022).

Nesse sentido, vem surgindo uma nova tendência no mercado: produtos lácteos rotulados como “A2”, “leite A2” ou “proteína beta-caseína A2”. Esses novos produtos, que contêm apenas variante A2 da β -CN, podem ser de interesse para a população sensível à β CM-7 ou alérgicas à proteína do leite. Além disso, a variante A2 parece apresentar influência no aumento de produção e porcentagem de proteínas do leite (VISKER et al., 2011).

Nesse contexto, foi desenvolvida esta revisão sistemática usando o banco de dados Web of Science. Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar quais as principais tendências temáticas abordadas nos últimos anos, o número de publicações por ano, principais países, áreas de pesquisa e periódicos envolvidos na produção científica. As informações fornecidas por esta metodologia nos permitiram compreender, a partir de um ponto de vista apoiado pela literatura, as tendências científicas neste campo, orientando futuras direções de pesquisa.

3. METODOLOGIA

Considerando a importância de discutir sobre os efeitos genotípicos do alelo A2 da β -caseína, o presente artigo propõe abordar essa temática por meio de uma revisão sistemática seguindo a metodologia descrita por Sampaio & Marcini (2007).

Desse modo, para guiar este estudo, elaborou-se a seguinte questão: “Quais os principais temas abordados nos estudos dos últimos anos relacionados ao polimorfismo da β -caseína?”. A base de dados para este estudo foi extraída da Web of Science (WoS). Utilizou-se a plataforma WoS por ser uma plataforma renomada para citações acadêmicas com cobertura nas mais variadas áreas, além permitir o download de dados com mais facilidade e oferecer ferramentas robustas para análise de publicações científicas. O Web of Science Core contém mais de 21.100 artigos acadêmicos de alta qualidade, revisados por pares e publicados em periódicos mundiais. Com mais de um século de cobertura abrangente e mais de um bilhão de conexões para referências citadas, pode-se conduzir pesquisas com confiança e explorar toda a rede de citações que sustentam o estudo (PEIXE et al., 2021).

A busca foi realizada em junho de 2023 acessando a opção de “pesquisa avançada” em “todas as bases de dados” disponíveis no WoS, e não apenas no “WoS Core Collection”, usando as seguintes palavras-chaves, com a inclusão, de forma ordenada, das siglas TS = (BCM-7 OR

BETA-CASEIN OR CSN2 AND CATTLE). A sigla “TS” indica que a pesquisa foi realizada no título, no resumo e/ou palavras-chave dos documentos. O termo boleano “OR” foi utilizado para que as palavras fossem pesquisadas separadamente e o boleano AND para que a palavra CATTLE fosse pesquisada conjuntamente.

As buscas foram restritas desde o primeiro ano de publicação até 2023 e as publicações obtidas a partir da consulta foram categorizadas de acordo com os seguintes aspectos: número de publicações por ano, área de pesquisa, países, periódicos e principais temáticas abordadas utilizando a ferramenta Datawrapper pertencente à base de dados WoS que permite a visualização de informações por meio de gráficos, mapas e tabelas.

A partir da busca na plataforma *Web of Science* foram encontradas 2.464 publicações envolvendo o tema. Com o subsídio do software Excel (versão 4.0.5), executou-se uma análise dos resultados da pesquisa. Para a organização e apresentação dos resultados, optou-se por utilizar as Figuras geradas pela plataforma WoS no formato Bibtex e adaptadas no Excel.

A discussão foi feita de forma descritiva, possibilitando a aplicabilidade desta revisão na abordagem do polimorfismo do gene CSN2 nos rebanhos bovinos e sua influência na composição físico-química, saúde humana e propriedades tecnológicas do leite.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Evolução da produção científica

Um total de 2.464 publicações envolvendo os termos “BCM-7 OR BETA-CASEIN OR CSN2 AND CATTLE” nos títulos, resumos ou palavras-chave foram recuperados do banco de dados WoS. O primeiro estudo publicado em 1945 de Mellander descreveu pela primeira vez o fracionamento eletroforético e enzimático da caseína no leite humano. O autor descreve três frações protéicas da caseína: alfa, beta e gama e destaca a semelhança do padrão eletroforético da caseína do leite humano e do leite bovino. Conforme apresentado na Figura 1 é notável que o número de publicações foi muito baixo até a década de 80. Desde então, ocorreu um aumento geral no número de publicações, mas com diversas oscilações ao longo dos anos. Na década de 90 houve um aumento repentino no número de documentos relacionados à β -caseína. A tendência foi de aumento progressivo, mas com alguns decréscimos entre os anos 2000 até 2009. Durante os anos de 2020 a 2022, foi atingido os números máximos de publicações sobre

este tema. Os documentos do ano de 2023 não foram incluídos na Figura 1, pois o ano não estava encerrado no momento da redação.

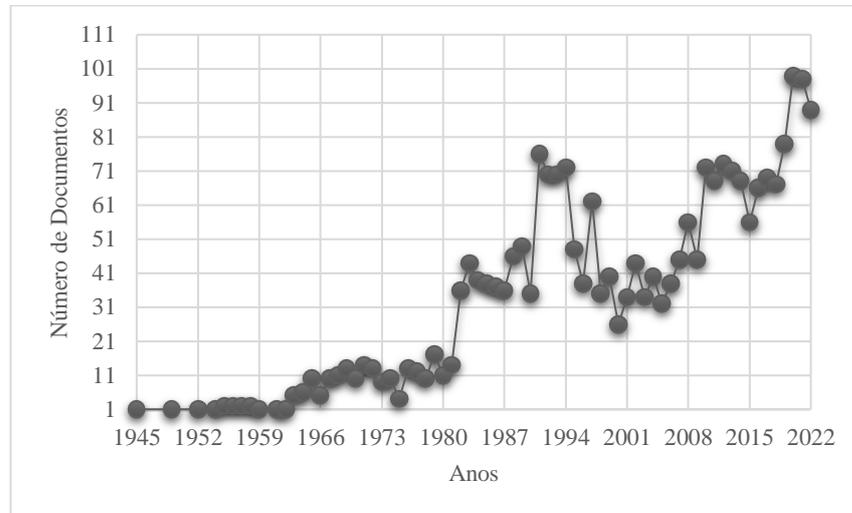


Figura 1. Evolução da produção científica relacionada ao tema do polimorfismo da β -caseína de 1945 a 2022, conforme classificado pelo banco de dados WoS.

4.2 Distribuição da produção científica em categorias de assunto

Com base na classificação WoS, a distribuição de publicações por campo de pesquisa cobriu um total de 101 áreas temáticas. No entanto, apenas 23 áreas incluíram mais de 100 publicações, com destaque para Food Science Technology (1994 documentos), Agriculture (1986 documentos), Biochemistry Molecular Biology (1983 documentos), Genetics Heredity (1059 documentos) e Nutrition Dietetics (843 documentos) que representaram 80,9%, 80,6%, 80,4%, 42,9% e 34,2% das publicações, respectivamente (Figura 2).

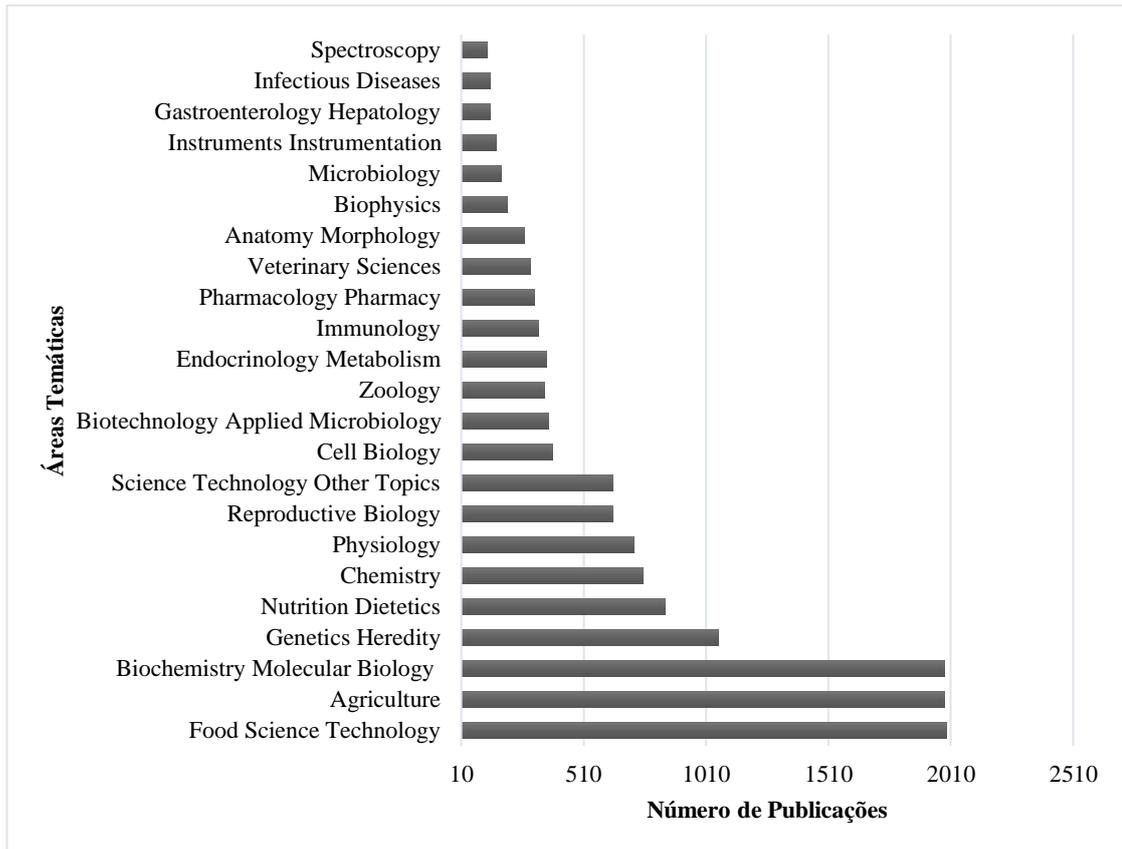


Figura 2. Distribuição (número de publicações) de pesquisas mundiais sobre polimorfismo da β -caseína por área temática, conforme classificado pelo banco de dados WoS.

Chama atenção que, de um total de 2.464 documentos, quando se restringe a pesquisa incluindo apenas às primeiras três áreas (Food Science Technology, Agriculture e Biochemistry Molecular Biology), o número de documentos publicados é de 2.454, o que significa que muitos documentos foram incluídos em ambos os campos de pesquisa pela base de dados WoS. É possível que o alto número de publicações seja muito alto devido muitos documentos sobre outros temas foram publicados nessas áreas de pesquisa.

Dentro das três principais áreas de pesquisa, diferentes aspectos do campo de pesquisa do polimorfismo do gene CSN2 foram considerados. Alguns deles fizeram referência à estrutura antigênica da β -caseína, e outros mencionaram a capacidade da proteína β -caseína de servir como um vetor de clonagem ou a capacidade do promotor do gene da β -caseína de permitir a expressão gênica heteróloga na engenharia genética. Em contraste, também houve outros estudos que focaram na determinação das frequências gênicas e genotípicas da β -caseína em diferentes raças bovinas; a influência do polimorfismo do gene da β -CN nos constituintes do leite e nas implicações nutricionais e de saúde em populações humanas ou animais.

4.3 Distribuição das publicações por país

Estudos relacionados ao polimorfismo da β -caseína foram desenvolvidos em 104 países diferentes, demonstrando o interesse e avanço neste novo e específico campo de pesquisa. Entre os 25 países mais produtivos nesta pesquisa estão: Estados Unidos da América (USD) (360 documentos), China (271 documentos), França (258 documentos), Itália (181 documentos), Alemanha (121 documentos), Japão (115 documentos), Holanda (102 documentos), Nova Zelândia (91 documentos), Canadá (90 documentos), Austrália (89 documentos), Inglaterra (88 documentos), Reino Unido (88 documentos), Índia (77 documentos), Irlanda (76 documentos), Espanha (73 documentos), Dinamarca (67 documentos), Suécia (64 documentos), Polônia (60 documentos), Escócia (53 documentos), Coreia do Sul (50 documentos), Brasil (41 documentos), Finlândia (34 documentos), Suíça (33 documentos), Irã (30 documentos) e Peru (27 documentos), durante os anos de 1973 a junho de 2023 (Figura 3).

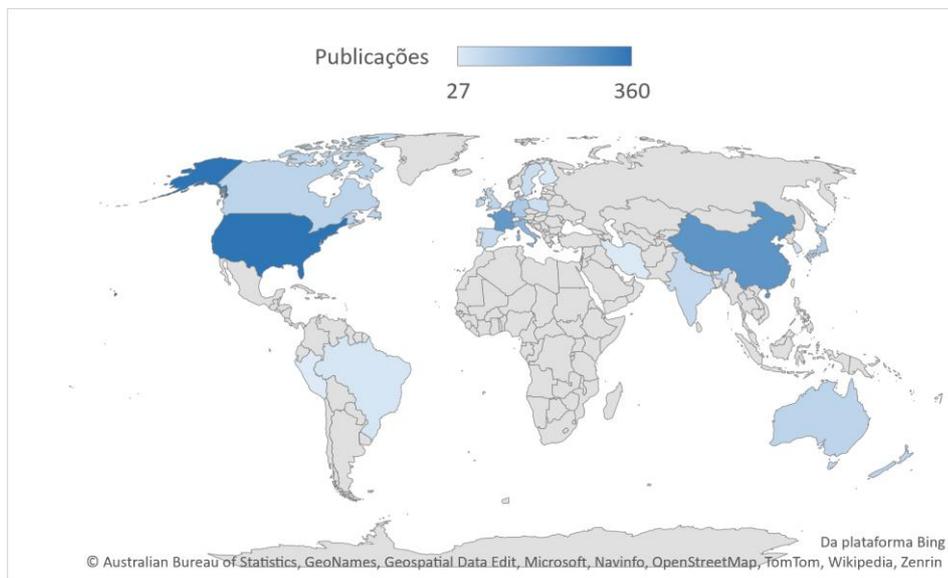


Figura 3. Contribuição por país para documentos de pesquisa no campo de pesquisa do polimorfismo da β -caseína no período 1973-2023.

Das primeiras pesquisas publicadas (9 documentos) no ano de 1973, 4 foram publicadas nos EUA e já abordavam sobre a composição dos aminoácidos, estrutura da micela de caseína, polimorfismo das caseínas em leite de ovelhas, búfalas e métodos para detecção das caseínas.

Os EUA foram o país com o maior número de documentos, representando 14,6% do total de publicações, superando a Nova Zelândia e Austrália que foram pioneiras na produção de leite A2. Isso pode ser devido a vários motivos, possivelmente devido ao seu tamanho,

população e número de periódicos. A raça bovina Holstein é a mais utilizada nos EUA para produção de leite e seu leite contém aproximadamente 66% da variante A1 da β -caseína e em decorrência disso, a população consome leite contendo altos níveis de CSN2-A1 e isso pode ter aumentado o interesse em determinar as possíveis implicações desta fração proteica para a saúde da população.

O Brasil ocupa a 21ª posição com 41 documentos publicados, representando 1,6% do total de publicações. O primeiro registro de pesquisas no país na base de dados WoS envolvendo a temática abordada, teve início com Lama & Silva (1997) que determinaram o polimorfismo proteico (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e α S1, β e k caseínas) em quatro raças bovinas (Gir, Guzerá, Nelore e Sindi) através da técnica de eletroforese. Os resultados preliminares já demonstravam que há predominância do alelo A no locus da β -caseína, com frequências maiores para o alelo A2 em raças *Bos indicus* do que em *Bos taurus*.

4.4 Principais periódicos por número de publicação

Em relação ao número de publicações por periódicos, foram encontrados cerca de 805 resultados, entretanto, a grande maioria apresentou menos de 10 documentos. Uma lista dos 10 principais periódicos é apresentada na Tabela 1.

Tabela 4. Dez periódicos mais produtivos na área da pesquisa.

Periódico	Nº de Publicações	Fator de impacto JCR	País
Journal of Dairy Science	349	4.2	EUA
Journal of Dairy Research	264	2.1	Inglaterra
Milchwissenschaft Milk Science International	79	0.266	Alemanha
Journal of Agricultural And Food Chemistry	76	6.3	Eua
International Dairy Journal	65	3.2	Inglaterra
Food Chemistry	56	8.6	Inglaterra
Scientific Technology Of Lactics (LAIT)	41	1.245	França
Biochimica Biophysica Acta	37	2.59	Holanda
Food Hydrocolloids	26	10.9	EUA
Animal Genetics	23	2.8	Inglaterra

De acordo com os dados fornecidos pelo WoS, o Journal of Dairy Science foi o periódico mais produtivo neste campo de pesquisa (349). Isso ocorre porque a sua principal linha de pesquisa é relacionada à produção e processamento de leite ou produtos lácteos destinados ao

consumo humano. Esta revista foi seguida pelo Journal Of Dairy Research (264) e Milchwissenschaft Milk Science International (79), deixando claro que a maioria dos periódicos se referiam a pesquisas científicas associadas à genética e bem-estar dos animais lactantes e dos alimentos que eles produzem, além de aspectos de saúde do consumidor de produtos lácteos.

Em relação aos impactos das dez principais revistas científicas, outras conclusões podem ser tiradas. Com base no fator de impacto de 5 anos gerado pelo Journal Citation Reports (JCR) que reflete a qualidade profissional de um periódico nos últimos 5 anos, Food Hydrocolloids com 10.9, Food Chemistry com 8.6 e Journal Of Agricultural And Food Chemistry com 6.3 foram as revistas com maior impacto.

4.5 Artigos mais citados na busca

A busca foi realizada acessando a opção “sort by: citations: upper first” para selecionar os estudos mais importantes e com maior impacto neste campo de pesquisa. Os dez artigos mais citados estão apresentados na Tabela 2.

O estudo mais citado (903 citações) intitulado “Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision” publicado em 2004 e o segundo artigo mais importante (602 citações) publicado em 1984 intitulado “Nomenclature of proteins of cows milk - 5th revision” são artigos de revisão, ambos publicados no periódico Journal of Dairy Science e revisam as nomenclaturas, classificação e variantes das proteínas do leite bovino. “Proteinases in normal bovine-milk and their action on caseins” foi o terceiro artigo mais citado (602 citações) publicado em 1983 no periódico Journal of Dairy Research. Em resumo, a nomenclatura alfabética das proteínas ocorreu de acordo com a ordem de suas descobertas. No entanto, reclassificações foram feitas ao longo dos anos que acompanharam o novo achado e maior complexidade encontrados. Por exemplo, o precursor A β -caseína foi rearranjado em A1, A2 e A3 β -caseína após serem identificadas por eletroforese em gel por Kiddy et al. (1966).

Tabela 5. Dez artigos mais citados na busca

Posição	Título	Número de Citações	Ano	Periódico	Tipo de Estudo	Assunto abordado
1	“Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision”	902	2004	Journal of Dairy Science	Artigo de Revisão	Revisa as mudanças na nomenclatura das proteínas do leite
2	“Nomenclature of proteins of cows milk - 5th revision”	758	1984	Journal of Dairy Science	Artigo de Revisão	Revisa as mudanças na nomenclatura das proteínas do leite
3	“Proteinases in normal bovine-milk and their action on caseins”	602	1983	Journal of Dairy Science	Artigo	Avalia a ação das proteases nas caseínas
4	Bioactive milk peptides: A prospectus	601	2000	Journal of Dairy Science	Artigo de Revisão	Revisa sobre a ação fisiológica dos peptídeos bioativos do leite nas funções fisiológicas
5	Proteolysis during cheese manufacture and ripening	506	1989	Journal of Dairy Science	Artigo de revisão	Revisa sobre as técnicas analíticas de avaliação da proteólise do queijo
6	Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins	452	1985	Journal of Food Science	Artigo	Determina a hidrofobicidade de proteínas do leite
7	On the stability of casein micelles	439	1990	Journal of Dairy Science	Artigo de revisão	Revisar sobre estrutura e estabilidade das micelas de caseína
8	Establishment of bovine mammary epithelial-cells (mac-t) - an invitro model for bovine lactation	405	1991	Experimental Cell Research	Artigo	Descrição de uma linha celular clonal a partir de células mamárias alveolares
9	Prediction of diffusion-coefficients of proteins	374	1990	Biotechnology and bioengineering	Artigo de revisão	Uma correlação para prever os coeficientes de difusão de proteínas em condições padrão
10	Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity	373	2002	Journal of Agricultural and food chemistry	Artigo	Determinar o efeito da interação entre flavonóides e proteínas na capacidade antioxidante total

Os artigos foram publicados entre os anos de 1983-2004 e abordaram temas que não eram nosso principal objetivo. Dessa forma, especificou-se a busca para os artigos mais relevantes dos últimos cinco anos, acessando a opção “sort by: relevance”, resultando em 380 documentos, sendo excluídos os artigos duplicados, de revisão e outros que não se encaixavam na temática proposta, restando 61 documentos. Entre os resultados obtidos, as principais temáticas abordadas foram sobre: a frequência das variantes da β -caseína e sua associação com características do leite (33 artigos); O efeito das variantes na saúde humana (8 documentos); O

desenvolvimento de novos métodos para detecção das variantes (12 artigos), efeito do polimorfismo da β -CN nas propriedades tecnológicas de produtos lácteos (6), efeito das variantes nos bezerros (2 documentos). Os artigos foram selecionados manualmente e suas análises encontram-se no tópico a seguir, com a descrição das temáticas abordadas, metodologias utilizadas e resultados encontrados.

4.6 Principais tendências temáticas abordadas nos últimos cinco anos

4.6.1 Frequência das variantes genéticas do gene CSN2 e sua influência nas características composicionais do leite

O leite A2 está ganhando destaque na literatura atual, sendo necessário entender as diferenças que surgem entre as raças e as possíveis evidências sobre o efeito dos diferentes genótipos da β -caseína nos constituintes físico-químico do leite. Os estudos que abordam a análise dos polimorfismos das proteínas do leite de vaca e sua influência nas características de produção são os seguintes: Zhou et al., 2019; Sebastiani et al., 2020; Franzoi et al., 2019; Cieślińska et al., 2019; Ristanic et al., 2020; Yasmin et al., 2020; Kumar et al., 2020; Kumar et al., 2021; Citek et al., 2021; Ivankovic et al., 2021; Sanchez et al., 2020; Albarella et al., 2020; Chessa et al., 2020; De Vitte et al., 2022; Kolenda et al., 2021; Xi Xia et al., 2020; Antonopoulos et al., 2021; Cendron et al., 2021; Yamada et al., 2021; Nuomin et al., 2022; Asmarasari et al., 2020; Pandey et al., 2020; Pandey et al., 2019; Pabitra et al., 2022; Villalobos-Cortes et al., 2023; Kaminski et al., 2023; Miluchova et al., 2023; Muntaz et al., 2022; Şahin et al., 2022; Prabakusuma et al., 2022; Khalid et al., 2021; Snegin et al., 2021; Salmasi et al., 2020.

A ocorrência e frequência das variantes proteicas genéticas da β -caseína pode variar dependendo da raça. Por exemplo, Cieślińska et al. (2019) ao determinarem as frequências das variantes A1 e A2 da β -caseína em 201 animais da raça Polish Red em um rebanho localizado na Polônia, encontraram frequência de 0,48 e 0,52 para os alelos A2 e A1, respectivamente. As frequências genotípicas foram de 19,95, 55,4 e 24,6 para os genótipos A2A2, A1A2 e A1A1, respectivamente. A frequência de β -caseína A2 obtida nesta população foi menor do que a frequência observada em outros estudos.

Da mesma maneira, Pandey et al. (2019) avaliaram o polimorfismo do gene da β -caseína e sua associação com características de produção de leite em bovinos mestiços Sahiwal (50) e Holstein-Friesian (50), a frequência do genótipo A2A2 (0,70) nos animais Sahiwal foi maior em relação ao A1A2 (0,30). Nos animais Holstein-Friesian, as frequências genotípicas A1A2 e

A2A2 encontradas foram de 0,64 e 0,36, respectivamente. O genótipo A1A1 não estava presente nestes rebanhos. O genótipo A1A2 apresentou efeito significativo ($P < 0,01$) para produção de leite em animais Sahiwal. O genótipo A2A2 dos animais Holstein Friesian apresentou efeito significativo em relação ao mesmo genótipo em animais Sahiwal para característica de produção diária de leite.

Kumar et al. (2020) encontraram frequências de 0,11, 0,47 e 0,42 para os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2, respectivamente em vacas Vrindavani. Nas vacas Sahiwal, apenas dois tipos de genótipos foram observados, A1A2 e A2A2. As frequências para os genótipos A1A2 e A2A2 foram 0,13 e 0,87, respectivamente. Ao avaliar a associação genética das variantes da β -caseína e características de produção e reprodução em vacas mestiças Frieswal (HF X Sahiwal), encontraram efeito significativo ($P \leq 0,05$) para o genótipo A1A2 em várias características de produção, incluindo produção total de leite, produção de leite aos 300 dias, duração da lactação ($P \leq 0,01$) e rendimento máximo ($P \leq 0,01$), no entanto, os genótipos A2A2 e A1A2 não foram significativamente diferentes entre si. As vacas do genótipo A1A1 tiveram produção total de leite, produção de leite aos 300 dias, rendimento máximo e período seco significativamente menores em comparação com os genótipos A1A2 e A2A2.

Kumar et al. (2021) também investigaram a frequência das variantes da β -caseína em gado Tharpakar e Frieswal (HF X Sahiwal). Entre os bovinos Tharpakar genotipados, 0,91% apresentavam genótipo A2A2 e 0,09% genótipo A1A2, enquanto nenhum dos animais apresentaram genótipo A1A1. Já nos bovinos Frieswal todos os 3 tipos de genótipos foram observados, sendo 17,5% A1A1, 51,5% A1A2 e 31% A2A2.

Em 2020, o estudo de Sebastiani et al. determinaram a frequência das variantes de β -caseína em 1.629 vacas Holstein-Friesian criados na Itália Central e identificaram seis variantes da β -caseína (A1, A2, A3, B, C e I). O alelo A2 foi o mais encontrado, com frequência de 60,65%, seguido do alelo A1 com frequência de 30,39%, alelo B com 5,68%, alelo I com 3,10%, alelo A3 com 0,15% e o alelo C com frequência de 0,03%.

Pandey et al. (2020) ao avaliarem o polimorfismo do gene beta (β) da caseína e sua associação com características de produção de Leite nas Raças bovinas Malvi e Nimari, constataram que 100% de ambas as raças apresentaram genótipo A2A2. A produção diária de leite do genótipo A2A2 do Nimari foi significativamente maior que o genótipo A2A2 de Malvi. A duração da lactação foi significativamente maior no genótipo A2A2 de Malvi do que a raça bovina Nimari.

Ristanic et al. (2020) encontraram frequências de 12,26%, 54,72% e 33,02% para os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 em 106 vacas Holstein-Friesian. A produção de leite, concentrações de proteína e gordura do leite foram estatisticamente maiores ($P < 0,01$) nos animais A2A2 em comparação com os outros genótipos. Em 2022, Ayaz et al. encontraram frequências de 33%, 50% e 17% para os genótipos A1A2, A1A1 e A2A2, respectivamente.

Schettini et al. (2020) destacaram o potencial genético da raça Sindi para a produção de leite A2, após encontrar frequências genóticas de 0,90 (A2A2), 0,09 (A1A2) e 0,01 (A1A1) nos animais estudados. A raça também foi objeto de estudo de Silva et al. (2021), no entanto, os genótipos não apresentaram efeito significativo ($p > 0,05$) na adaptabilidade das vacas no semiárido brasileiro.

Da mesma forma, Sanchez et al. (2020) ao estimarem as frequências de variantes e haplótipos da proteína do leite em mais de 1 milhão de animais de 12 raças bovinas, encontraram 6 variantes para a β -CN (A 1, A 2, A 3, B , C e I) com a variante A2 sendo a mais abundante em todas as raças, exceto Tarentaise. Da mesma forma, Teixeira et al. (2021) encontraram frequências de 0,80 e 0,20 para os genótipos A2A2 e A1A2 em bovinos da raça Guzerá, respectivamente.

Em 2021, Kumar et al. encontraram os três tipos de genótipos (A1A1, A2A2 e A1A2) na população mestiça Vrindavani com frequências genóticas de 12,3%, 39,6% e 48,1%, respectivamente. A análise estatística revelou que o genótipo A2A2 apresentou duração da lactação significativamente maior em comparação com os genótipos A1A2 e A1A1 e o genótipo A1A1 apresentou a maior produção de leite por dia da duração da lactação e maior % de gordura no leite.

Pandey et al. (2021) também avaliaram a associação do polimorfismo da β -caseína com características do leite nas raças Malvi, Nimari, Sahiwal e Holstein Friesian. O resultado do RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) revelou que as frequências genóticas do CSN2 para A2A2 foi de 100% para as raças Malvi e Nimari, mas 0%, 30% e 70% em Sahiwal e 0%, 64% e 36% em gado mestiço Holstein Friesian, respectivamente. Entre os animais genotipicamente A2A2, a porcentagem de lactose foi significativamente maior em Nimari em comparação com Malvi e Sahiwal. Entre todas as quatro raças bovinas, o teor de sólidos não gordurosos foi significativamente menor (%) na raça de gado Malvi para o genótipo A2A2 em comparação com as outras raças.

O alelo A2 é o mais frequente em muitas raças, conforme investigado no amplo trabalho desenvolvido por Ivanković et al. (2021). Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) na primeira lactação para produção de leite e genótipo A2A2. A concentração no teor de gordura do leite foi significativa ($P < 0,05$) na primeira lactação no leite de vacas de genótipo A1A1 em comparação com o A1A2.

De acordo com De Vitte et al. (2022) o teor de aminoácidos, ácidos graxos e a cor do leite podem ser influenciados pelos genótipos do gene *CSN2* da β -CN. O estudo associou o genótipo A2A2 ao teor de ácidos graxos nas gorduras do leite. Eles relataram que o melhoramento seletivo dos genótipos com qualidades preferidas pode melhorar o leite e derivados.

Em estudo recente desenvolvido por Miluchová et al. (2023) demonstraram que o polimorfismo do gene *CSN2* apresenta efeito significativo sobre o teor de proteína no leite de vacas Holstein. Foram observadas influências positivas do alelo A2 no rendimento proteico, além de aumento no percentual de gordura para o genótipo A1A1.

4.6.2 Métodos para detecção das variantes genéticas do gene *CSN2*

Testes de genotipagem animal para selecionar animais contendo apenas o alelo A2 e a detecção da presença do alelo A1 em produtos lácteos são altamente necessários devido a demanda global por produção de leite de vacas que contenham apenas o genótipo A2A2. Neste contexto, as metodologias desenvolvidas para a genotipagem do gene *CSN2* estão descritas na Tabela 3.

Tabela 6. Artigos que abordam sobre a frequência das variantes do gene *CSN2* e sua influência na composição do leite.

Título (autores, ano)	Métodos
Protein fingerprinting and quantification of β -casein variants by ultra-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry (Fuerer et al.)	Método de espectrometria de massa de cromatografia líquida de alta resolução de ultra desempenho (UPLC-HRMS) para caracterização das principais proteínas do leite e proteoformas, com ênfase na β -caseína em fórmulas infantis.
New high-sensitive rhAmp method for A1 allele detection in A2 milk samples (Giglioti et al. 2020).	Dois métodos – alta resolução fusão (HRM) e genotipagem rhAmp® SNP - foram desenvolvidos para identificar o gene β -caseína (<i>CSN2</i>) A1 e A2 alelos diretamente no leite.
Novel LNA probe-based assay for the A1 and A2 identification of β -casein gene in milk samples (Giglioti et al. 2021)	Desenvolvimento de um novo método de PCR em tempo real usando uma sonda de ácido nucleico bloqueada (LNA) para a detecção das variações alélicas A1 e A2 em amostras individuais de bovinos e avaliação da sensibilidade para detecção de A1 em A2 amostras de leite.
“A2 milk” authentication using isoelectric focusing and different PCR techniques (Mayer et al. 2021).	Identificação das variantes genéticas de β -caseína pelas técnicas AS-PCR (alelo-específico), ACRS-

	PCR (sítio de restrição criado por amplificação), PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição) e focagem isoeétrica (IEF) de proteínas do leite.
Separation and characterization of bovine milk proteins by capillary electrophoresis-mass spectrometry (Ghafoori et al., 2022).	Utilização da técnica de eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) com ionização por electrospray para identificação e separação das principais proteínas do leite bovino.
Lactic acid-mediated isolation of alpha-, beta- and kappa-casein fractions by isoelectric precipitation coupled with cold extraction from defatted cow milk (Thekkilaveedu et al., 2020).	Isolamento das frações de caseína a partir do método precipitação isoeétrica mediada por ácido láctico em leite desnatado.
Characterization of the genetic polymorphism linked to the β -casein A1/A2 alleles using different molecular and biochemical methods (Vigolo et al., 2022).	Investigação do polimorfismo do gene CSN2 utilizando as técnicas de Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP-PCR), sistema de mutação refratário à amplificação (ARMS-PCR) e cromatografia de fase reversa (RP-HPLC).
Quantitative LC-MS/MS analysis of high-value milk proteins in Danish Holstein cows (Le et al., 2020).	Utilização do método de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) para detectar α -lactalbumina (α -LA) e β -caseína (β -CN) em 662 amostras de leite bovino.
Development of a Microsphere-Based Immunoassay Authenticating A2 Milk and Species Purity in the Milk Production Chain (Elferink et al., 2022)	Desenvolvimento de Imunoensaio Baseado em Microesferas para identificação das variantes β -A1 e β -A2. O método foi capaz de detectar a adição de leite bovino comum em até 1% nas amostras de leite.
Análisis genético de cinco polimorfismos de nucleótido simple de caseínas lácteas obtidos con chips genómicos en ganado Holstein de Antioquia, Colombia (Padilla-Doval et al., 2021).	Genotipagem de 113 bovinos da raça holandesa com chips genômicos de alta densidade (Illumina BovineHD e Illumina SNP50 v2), dos quais foram identificados cinco polimorfismos de nucleotídeos único das caseínas ((ARS-BFGL-NGS-8140, BTA-77380-no-rs, BTA-32346-no-rs, BTB-00821654 e ARS-BFGL-NGS-15809).
Comparative analysis of A1 and A2 allele detection efficiency for bovine CSN2 gene by AS-PCR methods (Kulibaba et al., 2023).	Análise comparativa da eficiência de genotipagem do gene CSN2 da β -caseína em bovinos utilizando os métodos de Reação em cadeia da polimerase específica de alelo (AS-PCR).
DNA extraction procedures and validation parameters of a real-time PCR method to control milk containing only A2 β -casein (Jimenez-Montenegro et al., 2022).	Desenvolvimento de um ensaio de PCR duplex em tempo real (qPCR) baseado em sonda de ácido nucleico bloqueado (LNA) para detecção do alelo A1 em amostras de leite A2. Os limites relativos de detecção foram de 2% (15 cópias) e 5% (152 cópias) para o alelo A1 em amostras A2 com 95% de confiança com referência sintética e amostras de DNA genotipadas, respectivamente.

A importância da detecção e quantificação de β -caseína A2 está relacionada à crescente conscientização sobre saúde, ingestão de alimentos e dietas entre consumidores. Que por sua vez, estão cada vez mais exigentes, o que faz com que a indústria se adapte ao mercado global de leite e produtos A2.

Com base nesse aspecto, é importante conhecer o efeito do consumo de leite contendo as variantes A1/A2 na saúde humana, bem como seu impacto tecnológico na fabricação de derivados.

4.6.3 Efeito das variantes A1 e A2 da β -caseína na saúde humana

Os artigos de pesquisa selecionados que relataram evidências sobre os efeitos do leite contendo A1 e A2 β -CN e o envolvimento do β CM-7 na saúde humana publicados nos últimos cinco anos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 7. Artigos publicados que abordam sobre o efeito das variantes A1 e A2 da β -caseína na saúde humana.

Título (autores, ano)	Resultados
Comparison of the impact of bovine milk β -casein variants on digestive comfort in females self-reporting dairy intolerance: a randomized controlled trial (Milan et al., 2020).	Em estudo clínico randomizado de 59 mulheres de 20-30 anos, o consumo de leite contendo a β -caseína A2 reduziu alguns sintomas gastrointestinais em indivíduos intolerantes à lactose.
A Comprehensive Evaluation of the Impact of Bovine Milk Containing Different Beta-Casein Profiles on Gut Health of Ageing Mice (Guantário et al., 2020).	Ao analisar o impacto do consumo do leite convencional e leite com β -caseína A1 e A2 em vinte e quatro camundongos envelhecidos, concluíram que o leite A2 apresenta papel positivo na imunologia intestinal.
Oral Feeding of Cow Milk Containing A1 Variant of β Casein Induces Pulmonary Inflammation in Male Balb/c Mice (Yadav et al., 2020).	Ao avaliar as variantes A1 e A2 da β -caseína como fatores causadores de doenças alérgicas das vias aéreas em camundongos, concluíram que a β -caseína A1 do leite de vaca tem um efeito pró-inflamatório no pulmão, resultando em fenótipo semelhante ao fenótipo típico da asma alérgica. enquanto o grupo alimentado com leite A1A2 apresentou um fenótipo intermediário.
Processing affects beta-casomorphin peptide formation during simulated gastrointestinal digestion in both A1 and A2 milk (Lambers et al., 2021).	A digestão in vitro simulada de leite e a quantificação direta de peptídeo assistida por marcação de isótopos estáveis revelou que o BCM-7 pode ser formado a partir de leite A1 e A2.
Digestomics of Cow's Milk: Short Digestion-Resistant Peptides of Casein Form Functional Complexes by Aggregation (Radosavljevic et al., 2020).	Ao identificar os peptídeos resistentes à digestão curta (SDRPs) liberados pela digestão com pepsina do leite de vaca integral e examinar sua reatividade de IgE e alergenicidade, concluíram que a maioria dos SDRPs do leite se originou de caseínas (97% dos peptídeos) e se sobrepôs aos epítomos de IgE conhecidos dos alérgenos do leite de vaca.
Comparative evaluation of feeding effects of A1 and A2 cow milk derived casein hydrolysates in diabetic model of rats (Thakur et al., 2020).	O estudo foi desenhado tendo como plano de fundo o diabetes tipo 1. Durante o período experimental de 60 dias, nenhum dos ratos tornou-se pré-diabético devido à respectiva alimentação com hidrolisados de caseína derivados do leite de vaca A1 ou A2.
The Moo'D Study: protocol for a randomised controlled trial of A2 beta-casein only versus conventional dairy products in women with low mood (Hockey et al., 2021).	O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos comparativos do consumo de produtos lácteos contendo apenas a β -caseína A2 versus laticínios convencionais (ou seja, contendo A1 e A2 β -caseína) sobre os sintomas de sofrimento psicológico em mulheres com depressão.
A simple method to generate β -casomorphin-7 by in vitro digestion of casein from bovine milk (Edwards et al., 2021).	Neste estudo, um método utilizando as enzimas pepsina, pancreatina e leucina aminopeptidase (LAP) foi usado para digerir β -caseína isolada de leite normal e A2. Significativamente, menores concentrações de BCM-7 foram liberados na digestão do leite A2 em comparação com leite convencional.

4.6.4 Influência do polimorfismo do gene CSN2 materno nas características de desempenho dos bezerros

Estudos científicos sobre os impactos dos genótipos de caseína materna nas características de desempenho dos bezerros lactentes ainda são escassos. Os dois artigos de pesquisa publicados nos últimos cinco anos são descritos na Tabela 5.

Tabela 8. Artigos publicados sobre Influência do polimorfismo do gene CSN2 materno nas características de desempenho dos bezerros

Título (autor, ano)	Resultados
Associations between maternal milk protein genotypes with preweaning calf growth traits in beef cattle (Hohmann et al., 2020)	O objetivo deste estudo foi determinar os impactos dos genótipos de caseína materna nas características de crescimento de seus bezerros lactentes. Associações entre os genótipos BB (α -s1), A2A2 (β -CN), AA (α -s2) e AB (k-CN) apresentaram efeito significativo nos ganhos médios diários de peso e maiores peso ao desmame ajustado à idade ($P < 0,05$).
Comparative Effects of Milk Containing A1 versus A2 β -Casein on Health, Growth and β -Casomorphin-7 Level in Plasma of Neonatal Dairy Calves (Hohmann et al., 2020).	Objetivo deste estudo foi comparar os efeitos do leite contendo homocigoto A1 ou A2 β -caseína nos parâmetros de saúde e crescimento em 47 bezerras leiteiras durante as três primeiras semanas de vida e mensurar os níveis de β -casomorfina-7 intacta no plasma de bezerros alimentados com leite de genótipos de β -caseína. A ingestão de “leite A2” levou a uma menor ingestão de leite e uma consistência fecal mais frouxa (maior prevalência de diarreia) em comparação com o “leite A1”. No entanto, os ganhos de peso e os pesos finais dos bezerros de ambos os grupos de alimentação foram semelhantes, que pode ser causado pelo alto teor de proteína associado ao leite contendo a variante A2. A β -casomorfina-7 foi detectada no plasma após o consumo de leite A1 e A2, mas foi quase 5 vezes maior para bezerros alimentados com leite contendo a variante A1.

Os resultados indicam que, além de fatores ambientais bem conhecidos, os genótipos de proteína do leite influenciam o desempenho dos bezerros, oferecendo, portanto, novas perspectivas para estratégias de melhoramento visando o desenvolvimento do bezerro devido ao valor nutricional do colostro ou do leite.

4.6.5 Efeito do polimorfismo da β -CN nas propriedades tecnológicas de produtos lácteos

As caseínas têm recebido grande interesse científico, mas a sua influência nas características composicionais e tecnológicas do leite não está totalmente compreendida. O possível efeito das diferenças nas propriedades estruturais e físico-químicas das principais

variantes da β -CN em aspectos tecnológicos do leite e na fabricação de queijos e iogurtes é uma área pouco explorada.

Alguns estudos destacaram a influência das caseínas nas propriedades funcionais do leite e derivados (Tabela 6).

Tabela 9. Artigos publicados sobre influência das caseínas nas propriedades funcionais do leite e derivados.

Título (autor, ano)	Resultados
Effects of the detailed protein composition of milk on curd yield and composition measured by model micro-cheese curd making of individual milk samples (Bonfatti et al., 2019)	Os resultados obtidos neste estudo suportam a hipótese de que, além da variação nos teores de caseína total e proteína do soro, a variação na composição da proteína pode afetar a capacidade de produção de queijo do leite, mas isso requer mais estudos.
Milk protein fractions strongly affect the patterns of coagulation, curd firming, and syneresis (Amalfitano et al., 2019).	Ao avaliarem o papel das frações proteicas do leite na coagulação e firmeza da coalhada, associou favoravelmente a fração k-CN com a capacidade de coagulação do leite, que reduziu o tempo de coagulação do coalho e aumentou a firmeza e sinérese da coalhada, sendo menos afetada pela fração β -CN.
The β -casein (CSN2) A2 allelic variant alters milk protein profile and slightly worsens coagulation properties in Holstein cows (Bisutti et al., 2022).	Desaconselham a utilização de leite A2 na produção de queijos, pois este alelo está associado a uma piora das características tecnológicas do leite e menor eficiência no processo de fabricação de queijos, com piora das características de coagulação e firmeza da coalhada.
Effects of milk proteins and posttranslational modifications on noncoagulating milk from Swedish Red dairy cattle (Nilsson et al., 2020).	Concluíram que o leite não coagulante, indesejado na produção de queijos por apresentar um tempo de processamento prolongado, se correlacionou significativamente com maiores concentrações relativas de α -lactalbumina e β -caseína A2 e menores concentrações relativas de β -lactoglobulina e κ -caseína.
Physiochemical characteristics and fermentation ability of milk from Czech Fleckvieh cows are related to genetic polymorphisms of β -casein, κ -casein, and β -lactoglobulin (Kyselová et al., 2019).	O objetivo do estudo foi encontrar uma possível associação entre os genótipos β - e κ -caseína e β - lactoglobulina e características físico-químicas e tecnológicas importantes do leite. O efeito dos genes associados CSN2-CSN3-LGB nas características investigadas influenciou significativamente a acidez titulável, ($p < 0,01$), acidez ativa ($p < 0,05$) e contagem de lactobacilos ($p < 0,05$) do leite.
Protein profile of cow milk from multibreed herds and its relationship with milk coagulation Properties (Niero et al., 2021).	Ao avaliarem o perfil proteico e as propriedades de coagulação do leite, concluíram que todas as características analisadas foram otimizadas com menores concentrações de α -CN e β -CN.

5. CONCLUSÃO

Diversas pesquisas associaram o polimorfismo da β -caseína com constituintes do leite e seu efeito na saúde humana. Entretanto, um número limitado de estudos preliminares teve como objetivo investigar o efeito do polimorfismo do gene CSN2 no desempenho dos bezerros, já que estes estão se alimentando do leite de suas mães biológicas, sendo, portanto, um campo com muitas oportunidades de investigação.

As pesquisas relacionadas aos impactos sensoriais e tecnológicos das variantes da β -caseína em matrizes lácteas, como queijos e iogurtes, são limitadas. Assim, consideramos que esta abordagem também pode ser um ponto de partida para estudos futuros.

Os métodos desenvolvidos mostraram precisão e podem ser empregados para distinguir rapidamente o leite A1 e A2, contribuindo para a prevenção de fraudes e/ou adulterações.

Foi possível concluir que a A2 β -CN exerce efeitos benéficos no trato gastrointestinal em comparação com o A1 β -CN. Entretanto, não há evidências científicas suficientes de que o A1 β -CN tenha efeitos negativos na saúde humana.

6. REFERÊNCIAS

- ALBARELLA, S. et al. Influence of the Casein Composite Genotype on Milk Quality and Coagulation Properties in the Endangered Agerolese Cattle Breed. *Animals* 2020.
- AMALFITANO, N. et al. Milk protein fractions strongly affect the patterns of coagulation, curd firming, and syneresis. *Journal of Dairy Science*, 2019.
- ANDREWS, AT. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *The Journal of Dairy Research*, 1983.
- ANTONOPOULOS, D. et al. Identification of Polymorphisms of the CSN2 Gene Encoding β -Casein in Greek Local Breeds of Cattle. *Veterinary Science*, 2021.
- ASMARASARI, S. A. et al. Genetic Variants of Milk Protein Genes and Their Association with Milk Components in Holstein Friesian Cattle. *Jurnal Ilmu Ternak Dan Veteriner*, 2020.
- BISUTTI, V. et al. The β -casein (CSN2) A2 allelic variant alters milk protein profile and slightly worsens coagulation properties in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 2022.
- BONFATTI, V. et al. Effects of the detailed protein composition of milk on curd yield and composition measured by model micro-cheese curd making of individual milk samples. *Journal of Dairy Science*, 2019.
- CENDRON, F. et al. Effects of β - and κ -casein, and β -lactoglobulin single and composite genotypes on milk composition and milk coagulation properties of Italian Holsteins assessed by FT-MIR. *Italian Journal of Animal Science*, 2021.
- CHESSA, S. et al. The effect of selection on casein genetic polymorphisms and haplotypes in Italian Holstein cattle. *Italian Journal of Animal Science*, 2020.

- CIEŚLIŃSKA, A. et al. Genetic Polymorphism of β -Casein Gene in Polish Red Cattle—Preliminary Study of A1 and A2 Frequency in Genetic Conservation Herd. *Animals*, 2019.
- CÍTEK, J. et al. Gene polymorphisms influencing yield, composition and technological properties of milk from Czech Simmental and Holstein cows. *Animal Bioscience*, 2021.
- DE VITTE, K. et al. Relationship of β -casein genotypes (A1A1, A1A2 and A2A2) to the physicochemical composition and sensory characteristics of cows' milk. *Journal of Applied Animal Research*, 2022.
- DETH, R. et al. Clinical evaluation of glutathione concentrations after consumption of milk containing different subtypes of β -casein: results from a randomized, cross-over clinical trial. *Nutrition journal*, 2016.
- EDWARDS, T. S. et al. A simple method to generate β -casomorphin-7 by in vitro digestion of casein from bovine milk. *Journal of Functional Foods*, 2021.
- EIGEL, W.N. et al. Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision. *Journal of Dairy Science*, 1984.
- ELFERINK, A. J. W. et al. Development of a Microsphere-Based Immunoassay Authenticating A2 Milk and Species Purity in the Milk Production Chain. *Molecules* 2022.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Milk and dairy products in human nutrition*. Rome, 2013.
- FARREL, H. M. et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk: sixth revision. *Journal Dairy Science*, 2004.
- FRANZOI, M. et al. Variation of Detailed Protein Composition of Cow Milk Predicted from a Large Database of Mid-Infrared Spectra. *Animals*, 2019.
- FUERER, C. et al. Protein fingerprinting and quantification of β -casein variants by ultra-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 2020.
- GAZI, I. et al. Heterogeneity, Fractionation, and Isolation. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)*. Academic Press, 2022.
- GDP – Global Dairy Platform. *Annual Review 2016*. Rosemont, 2017.
- GHAFOORI, Z. et al. Separation and characterization of bovine milk proteins by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 2022.
- GIGLIOTI, R. New high-sensitive rhAmp method for A1 allele detection in A2 milk samples. *Food Chemistry*, 2020.
- GIGLIOTI, R. Novel LNA probe-based assay for the A1 and A2 identification of β -casein gene in milk samples. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 2021.
- GUANTARIO, B. et al. A Comprehensive Evaluation of the Impact of Bovine Milk Containing Different Beta-Casein Profiles on Gut Health of Ageing Mice. *Nutrients*, 2020.
- Hockey, M. et al. The Moo'D Study: protocol for a randomised controlled trial of A2 beta-casein only versus conventional dairy products in women with low mood. *Trials*, 2021.
- HOHMANN, L. G. Associations between maternal milk protein genotypes with preweaning calf growth traits in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 2020.

- HOHMANN, L.G. et al. Comparative Effects of Milk Containing A1 versus A2 β -Casein on Health, Growth and β -Casomorphin-7 Level in Plasma of Neonatal Dairy Calves. *Animals*, 2021.
- IVANKOVIC, A. et al. Genetic polymorphism and effect on milk production of CSN2 gene in conventional and local cattle breeds in Croatia. *Mljekarstvo*, 2021.
- JIMÉNEZ-MONTENEGRO, L. DNA extraction procedures and validation parameters of a real-time PCR method to control milk containing only A2 β -casein. *Food Control*, 2022.
- KAMIŃSKI, S. et al. Long-term changes in the frequency of beta-casein, kappa-casein and beta-lactoglobulin alleles in Polish Holstein-Friesian dairy cattle. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2023.
- KHALID, R. B. et al. Characterization of β -casein Gene Sequence Variants in Cholistani Cattle. *Pakistan Journal of Zoology*, 2021.
- KIDDY, C.A. et al. Genetic control of the variants of β -casein A. *Journal of Dairy Science*, 1966.
- KOLENDA, M. et al. Sitkowska, B. The Polymorphism in Various Milk Protein Genes in Polish Holstein-Friesian Dairy Cattle. *Animals*, 2021.
- KULIBABA, R. et al. Comparative analysis of A1 and A2 allele detection efficiency for bovine CSN2 gene by AS-PCR methods. *Acta Biochimica Polonica*, 2023.
- KUMAR, A. et al. Genetic association analysis reveals significant effect of β -casein A1/A2 loci on production & reproduction traits in Frieswal crossbred cows. *Biological Rhythm Research*, 2020.
- KUMAR, A. et al. Investigation of genetic polymorphism at β -casein A1/A2 loci and association analysis with production & reproduction traits in Vrindavani crossbred cows. *Animal Biotechnology*, 2021.
- KYSELOVÁ, J. et al. Physiochemical characteristics and fermentation ability of milk from Czech Fleckvieh cows are related to genetic polymorphisms of β -casein, κ -casein, and β -lactoglobulin. *Animal Bioscience*, 2019.
- LAMA, M. A. & SILVA, I. T. Milk protein polymorphisms in Brazilian Zebu cattle. *Brazilian Journal of Genetics*, 1997.
- LAMBERS, T. T. et al. Processing affects beta-casomorphin peptide formation during simulated gastrointestinal digestion in both A1 and A2 milk. *International Dairy Journal*, 2021.
- LE, T. T. et al. Quantitative LC-MS/MS analysis of high-value milk proteins in Danish Holstein cows. *Heliyon*, 2020.
- LILY, J. & MULUMEBET, W. Recent perspective on cow's milk allergy and dairy nutrition. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2022.
- MAYER, H. K. et al. "A2 milk" authentication using isoelectric focusing and different PCR techniques. *Food Research International*, 2021.
- MELLANDER, O. Electrophoretic and Enzymatic Fractionation of Casein from Human Milk. *Nature*, 1945.
- MILAN, A. M. et al. Comparison of the impact of bovine milk β -casein variants on digestive comfort in females self-reporting dairy intolerance: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2020.

- Miluchová, M. et al. The Effect of the Genotypes of the CSN2 Gene on Test-Day Milk Yields in the Slovak Holstein Cow. *Agriculture*, 2023.
- MONTENEGRO, J. L. et al. Worldwide Research Trends on Milk Containing Only A2 β -Casein: A Bibliometric Study. *Animals*, 2022.
- MUMTAZ, S. et al. β casein Polymorphism in Indigenous and Exotic Cattle Breeds of Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 2022.
- NIERO, G. et al. Protein profile of cow milk from multibreed herds and its relationship with milk coagulation Properties. *Italian Journal of Animal Science*, 2021.
- NILSSON, K. et al. Effects of milk proteins and posttranslational modifications on noncoagulating milk from Swedish Red dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 2020.
- NUOMIN. et al. Frequency of β -Casein Gene Polymorphisms in Jersey Cows in Western Japan. *Animals*, 2022.
- PABITRA, M. H. Molecular characterization and A1/A2 genotyping of casein beta gene in zebu and crossbred cattle of Bangladesh. *Czech Journal of Animal Science*, 2022.
- PADILLA-DOVAL, J. et al. Análisis genético de cinco polimorfismos de nucleótido simple de caseínas lácteas obtenidos con chips genómicos en ganado Holstein de Antioquia, Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 2021.
- PANDEY, A. et al. Association Study of Polymorphic Variants of Beta (B) Casein Gene with Milk Production Traits (Lactose, Snf and Density) in Malvi, Nimari, Sahiwal and H.F. Cross Breeds Cow. *Indian Journal of Animal Research*, 2020.
- PANDEY, A. et al. Polymorphism of beta (b) casein gene and their association with milk production traits in Sahiwal and HF crossbred cattle. *Indian Journal of Animal Research*, 2019.
- PEIXE, A. M. M. et al. Infometria nas Bases Web of Science e Scopus: governança corporativa, informação e tecnologia da informação; precificação de ações e riscos de mercado. *Research, Society And Development*, 2021.
- PRABAKUSUMA, A. et al. "Genotyping, Physicochemical Characterization, and Protein Isoform Quantification of β -Casein A2 Milk in Chinese Simmental and Angus Cattle". *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2022.
- PRIYADARSHINI, P. et al. Impact of milk protein on human health: A1 verses A2. *International Journal of Chemical Studies*, 2018.
- RADOSAVLJEVIĆ, J. et al. Digestomics of Cow's Milk: Short Digestion-Resistant Peptides of Casein Form Functional Complexes by Aggregation. *Foods*, 2020.
- RISTANIC, M. et al. "Beta-Casein Gene Polymorphism in Serbian Holstein-Friesian Cows and Its Relationship with Milk Production Traits". *Acta Veterinaria*, 2020.
- ŞAHİN, O & SAIM, B. Assessment of A1 and A2 variants in the CNS2 gene of some cattle breeds by using ACRS-PCR method. *Animal Biotechnology*, 2022.
- SALMASI, M. et al. Genetic variability of milk proteins in two cattle breeds of Piedmont region and the potential effects on milk quality. *Italian Journal of Animal Science*, 2020.
- SAMPAIO, R. F. MARCINI, M. C. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. *Brazilian Journal Physical Therapy*, 2007.

- SANCHEZ, M. P. et al. Frequencies of milk protein variants and haplotypes estimated from genotypes of more than 1 million bulls and cows of 12 French cattle breeds. *Journal of Dairy Science*, 2020.
- SEBASTIANI, C. Frequencies Evaluation of β -Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central Italy. *Animals*, 2020.
- SNEGIN, E. A. et al. Polymorphism of the *csn2* gene (versions a1/a2) in Different breeds of dairy cattle in the central black Soil region of russia. *International Journal of Ecosystems and Ecology Science*, 2021.
- SOBCZAK, M. et al. Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: current concepts and future perspectives. *Journal Gastroenterology*, 2014.
- THAKUR, N. et al. Comparative evaluation of feeding effects of A1 and A2 cow milk derived casein hydrolysates in diabetic model of rats. *Journal of Functional Foods*, 2020.
- THEKKILAVEEDU, S. et al. Lactic acid-mediated isolation of alpha-, beta- and kappa-casein fractions by isoelectric precipitation coupled with cold extraction from defatted cow milk. *International Journal of Dairy Technology*, 2020.
- VIGOLO, V. et al. Characterization of the genetic polymorphism linked to the β -casein A1/A2 alleles using different molecular and biochemical methods. *Journal of Dairy Science*, 2022.
- VILLALOBOS-CORTÉS, A. et al. Characterization of casein variants in the Guaymi and Guabala breeds through a low-density chip arrangement. *Journal of Applied Animal Research*, 2023.
- VISKER, M. H. P. W. et al. Association of bovine β -casein protein variant I with milk production and milk protein composition. *Animal Genetics*, 2011.
- XIAXIA, W. Comparative proteomic characterization of bovine milk containing β -casein variants A1A1 and A2A2, and their heterozygote A1A2. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020.
- XU LI, G. Beta casein proteins – A comparison between caprine and bovine milk, *Trends in Food Science & Technology*, 2022.
- YADAV, S. et al. Oral Feeding of Cow Milk Containing A1 Variant of β Casein Induces Pulmonary Inflammation in Male Balb/c Mice. *Scientific Reports*, 2020.
- YAMADA A, Sugimura M, Kuramoto T. Genetic polymorphism of bovine beta-casein gene in Japanese dairy farm herds. *Animal Science Journal*, 2021.
- YASMIN, I. et al. Characterization and Comparative Evaluation of Milk Protein Variants from Pakistani Dairy Breeds. *Food Science Animal Resources*, 2020.
- ZHOU, C. et al. Genome-Wide Association Study for Milk Protein Composition Traits in a Chinese Holstein Population Using a Single-Step Approach. *Frontiers in Genetics*, 2019.

- CAPÍTULO 2 -

**FREQUÊNCIAS GÊNICAS E GENOTÍPICAS DAS VARIANTES A1 E A2 DA β -
CASEÍNA EM GADO LEITEIRO MESTIÇO E SEU EFEITO NA COMPOSIÇÃO DO
LEITE**

FREQUÊNCIAS GÊNICAS E GENOTÍPICAS DAS VARIANTES A1 E A2 DA β -CASEÍNA EM GADO LEITEIRO MESTIÇO E SEU EFEITO NA COMPOSIÇÃO DO LEITE

RESUMO - Levando em consideração a importância do consumo do leite para nutrição humana e os possíveis benefícios que o leite contendo apenas a β -caseína A2 pode trazer para a saúde intestinal dos indivíduos e constituintes do leite, objetivou-se neste trabalho identificar a frequência alélica e genotípica das variantes A1 e A2 do gene da β -caseína e sua influência na composição físico-química do leite de vacas mestiças. Para identificação do perfil genético, foram coletados pelos da cauda de 51 vacas mestiças para extração do DNA e genotipagem. Posteriormente, foram calculadas as frequências gênicas e genotípicas das variantes A1 e A2 da beta-caseína. Para as coletas de leite das análises físico-químicas, foram separadas e selecionadas 20 vacas mestiças, dentre os 51 animais genotipados, sendo 10 vacas com genótipo heterozigoto A1A2 e 10 vacas com genótipo homozigoto A2A2 para a beta-caseína. Os genótipos foram associados com as seguintes características: gordura, proteína total, lactose, caseína, sólidos totais e extrato seco desengordurado, densidade e pH. Os dados da análise físico-química foram submetidos ao teste t com correção de Bonferroni a 5% de significância ($P < 0,05$). O teor de sólidos totais (12,42 e 15,31%) e gordura (2,14 e 4,05%) foram distintos entre os genótipos A1A2 e A2A2, respectivamente ($P < 0,05$). O rebanho se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Palavras-chave: Beta-casomorfina-7. CSN2. Leite A2. Polimorfismo.

GENE AND GENOTYPIC FREQUENCIES OF β -CASEIN VARIANTS A1 AND A2 IN CROSSBREED DAIRY CATTLE AND ITS EFFECT ON MILK COMPOSITION

ABSTRACT- Taking into account the importance of milk consumption for human nutrition and the possible benefits that milk containing only A2 β -casein can bring to the intestinal health of individuals and milk constituents, the objective of this work was to identify the allele and genotypic frequency of the A1 and A2 variants of the β -casein gene and their influence on the physicochemical composition of milk from crossbred cows. To identify the genetic profile, hairs from the tail of 51 crossbred cows were collected for DNA extraction and genotyping. Subsequently, the gene and genotypic frequencies of the A1 and A2 beta-casein variants were calculated. For the collection of milk for the physicochemical analyses, 20 crossbred cows were separated and selected, among the 51 genotyped animals, 10 cows with a heterozygous A1A2 genotype and 10 cows with a homozygous A2A2 genotype for beta-casein. The genotypes were associated with the following characteristics: fat, total protein, lactose, casein, total solids and defatted dry extract, density and pH. The physical-chemical analysis data were submitted to the t-test with Bonferroni correction at 5% significance ($P < 0.05$). Total solids (12.42 and 15.31%) and fat (2.14 and 4.05%) were different between A1A2 and A2A2 genotypes, respectively ($P < 0.05$). The herd is in Hardy-Weinberg equilibrium.

Keywords: Beta-casomorphin-7. CSN2. Milk A2. Polymorphism.

7. INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira é considerada uma atividade que apresenta elevada possibilidade de crescimento e exerce um papel econômico significativo nos países em desenvolvimento. O Brasil está em 3º lugar no ranking de maiores países produtores mundiais de leite (ROCHA et al., 2020).

Dada a crescente associação do consumo de leite com efeitos adversos em indivíduos suscetíveis e o aumento do interesse no consumo de alternativas ao leite, tem estimulado pesquisadores, produtores rurais e consumidores a uma nova tendência no mercado de lácteos: a produção de leite proveniente de vacas apenas com o alelo A2 da β -caseína, denominado Leite A2A2. O consumo de leite A2 tem sido associado a efeitos benéficos à saúde humana e é mais fácil de digerir em indivíduos sensíveis.

As proteínas lácteas são classificadas em dois grandes grupos: as caseínas e proteínas do soro (alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina). As caseínas constituem cerca de 80% das proteínas do leite bovino e apresentam quatro formas: α S1 (variando de 12 a 15 g/L ou 38%), α S2 (3 a 4 g/L ou 10%), β -caseína (9 a 11 g/L ou 34%) e k-caseína (2–3 g/L ou 15%) (RASIKA, 2021). Essas proteínas diferem na sequência de aminoácidos e são codificadas por quatro genes (CSN1-S1, CSN1-S2, CSN2 e CSN3), respectivamente (VISKER et al., 2011).

A β -caseína contém 209 aminoácidos e quinze variantes (A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I, J, K) (GAZI et al., 2022), no entanto, apenas sete destas (A1, A2, A3, B, C, I e E) foram detectadas em raças bovinas europeias, sendo as variantes A1 e A2 mais comuns (MONTENEGRO et al., 2022).

Estudos indicam que a β -caseína A2 é a variante mais antiga, presente no rebanho bovino desde sua domesticação, sendo considerada a forma original da proteína, da qual as demais se originaram por mutação e espalharam-se com a reprodução dirigida dos animais para o aumento da produção leiteira. É considerada uma mutação via seleção natural (MONTENEGRO et al., 2022).

A caseína A1 e A2 são diferenciadas pelo polimorfismo de um nucleotídeo no gene CSN2 localizado no cromossomo 6, o que resulta na substituição de apenas um aminoácido na posição 67ª dos 209 aminoácidos que compõem esta proteína. A variante A1 apresenta uma histidina, enquanto a variante A2 apresenta uma prolina, conforme apontado na Figura 2. (JIAQUIN et al., 2016). Essa diferença afeta a forma como essas proteínas serão hidrolisadas no trato gastrointestinal. (VITTE et al., 2022).

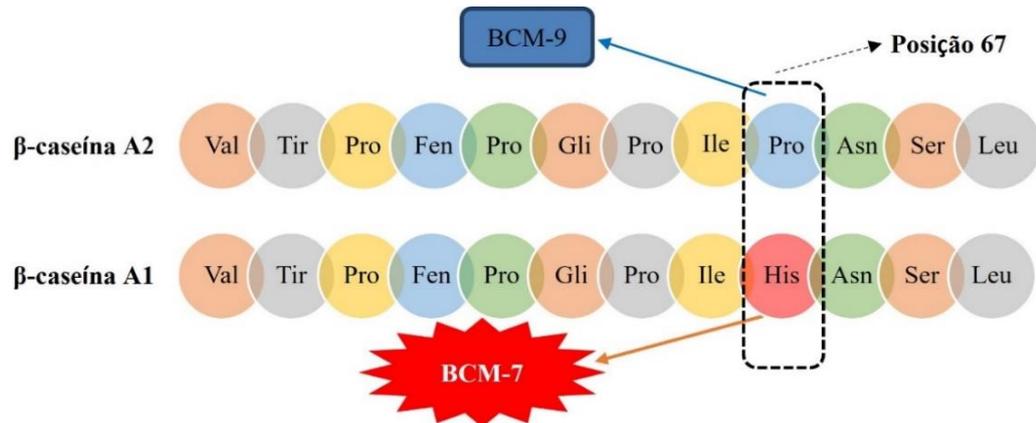


Figura 4. Fragmento das variantes genéticas A1 e A2 da β -caseína, destacando a diferenciação na posição 67 e liberação de β CM-7. Fonte: adaptado de Daniloviski et al., (2021).

O consumo do leite oriundo de vacas portadoras da variante A1 da β -caseína permite a clivagem da cadeia peptídica do aminoácido na 67ª posição liberando a Beta-Casomorfina-7 (β CM-7). A β CM-7 é composta por sete aminoácidos (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile), que atuam como fonte de peptídeos opioides no corpo durante a digestão, conhecidos como exorfinas (AYAZ et al., 2023). A presença da prolina na 67ª posição da variante A2 da β -caseína impede a quebra da sequência polipeptídica neste ponto, formando outro peptídeo denominado Beta-Casomorfina-9 (BCM-9) (MARKO et al., 2020).

A digestão gastrointestinal da β caseína A1 através da degradação proteolítica com a ajuda de diferentes enzimas como pepsina, tripsina, alcalase, quimotripsina, pancreatina e termolisina libera a β CM-7 no epitélio intestinal, que devido ao seu baixo peso molecular, atravessa a barreira hematoencefálica e distribui-se em vários órgãos e tecidos do corpo incluindo ouvido, cérebro, pâncreas e rins (VISKER et al., 2011). A β CM-7 é um agonista opioide que apresenta uma ampla variedade de potenciais efeitos à saúde, incluindo atividade imunossupressora, entretanto, mais pesquisas são necessárias nesta área (SWINBURN, 2004).

A hipótese de que uma alta ingestão de leite contendo CNS2-A1 promove doenças cardiovasculares (doença cardíaca isquêmica, aterosclerose), diabetes mellitus tipo 1, e problemas neurológicos (esquizofrenia e autismo) é intrigante, prematura e não apresenta evidências científicas suficientes (SWINBURN, 2004).

Estudos recentes demonstraram que o consumo do leite contendo a variante A1 da β -caseína aumenta a atividade de MPO (Mieloperoxidase), MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos), IgE (imunoglobulina E), IgG (imunoglobulina G), e IL-4 (interleucina 4) no trato gastrointestinal juntamente com a infiltração de leucócitos nas vilosidades intestinais. O

aumento dessas moléculas que atuam como marcadores de processos inflamatórios e desempenham papel importante nas reações alérgicas, estão atribuídas à liberação da β CM-7 (HAQ et al., 2014).

Segundo Jianquin et al. (2016), com base nos efeitos da β CM-7 no trato gastrointestinal, é possível que parte dos desconfortos atribuídos a intolerância de produtos lácteos, podem ser em decorrência dos efeitos da β CM-7 no trato gastrointestinal, em vez da lactose em si.

Devido a sua característica inflamatória, a β CM-7 pode afetar a produção e diminuição da atividade da enzima lactase, conseqüentemente, redução na motilidade e inflamação, alterando a metabolização da lactose e promovendo sintomas semelhantes de intolerância à lactose em indivíduos sensíveis à β CM-7 (BARBOSA et al., 2019).

Pesquisas recentes também detectaram a influência da variante A2 da β -caseína no aumento dos constituintes do leite, principalmente em relação à concentração de proteínas, gordura e volume (VISKER et al., 2011). Portanto, a preferência pelo alelo A2 em bovinos leiteiros pode ter várias implicações positivas não somente para humanos, mas também para produção e composição do leite. No entanto, para esclarecer os efeitos definitivos das variantes A1 e A2 da β -caseína na saúde humana e nas características de produção do leite, mais investigações são necessárias.

Tendo em vista que, as raças mestiças são responsáveis por grande parte da produção de leite no país, e que com a expansão dos cruzamentos, os níveis de mistura entre raças são imprevisíveis e a falta de registro de pedigree pode levar à falta de informações genéticas sobre os rebanhos, destaca-se a importância e utilidade do estudo desses rebanhos para sua caracterização (KHAN et al., 2023).

Diante do exposto, objetivou-se neste estudo verificar as frequências gênicas e genóticas das variantes A1 e A2 da β -caseína e seu efeito na composição do leite de vacas mestiças.

8. METODOLOGIA

8.1 Parecer do comitê de ética

Este trabalho foi submetido a avaliação e apreciação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí (CEUA/UFPI) e aprovado em 18 de março de 2022, através do protocolo N° 709/2022.

8.2 Local e rebanho do estudo

O presente experimento foi realizado no período de abril de 2021 a dezembro de 2022. Os animais utilizados neste experimento são provenientes do rebanho de uma granja leiteira, localizada no município de Paragominas - Pará. O rebanho estudado era composto por 51 vacas mestiças Holandês x Gir, com cinco composições genéticas: 1/2 HO + GL; 3/4 HO + GL; 5/8 HO + GL; 9/16 HO + GL e 13/16 HO + GL em período de lactação. A propriedade utiliza o sistema de instalação Compost Barn com dieta à base de silagem de milho, milho e farelo de soja e suplementação com NutronMilk da Nutron®. A ordenha é realizada duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas (4h e 16h).

8.3 Análise genotípica das vacas

Os animais foram genotipados para as variantes A1 e A2 da β -caseína a partir de DNA extraído dos folículos pilosos. Os pelos foram retirados da vassoura da cauda do animal, laçando-se entre 15 e 25 pelos nos dedos da mão, puxando-os com firmeza e logo em seguida, verificando se os bulbos se encontravam intactos. Em seguida, foram colocados em envelopes, identificados e armazenados a temperatura ambiente até serem enviados ao Instituto de Zootecnia em Nova Odessa-SP, responsável em realizar a extração de DNA e genotipagem.

A extração de DNA dos folículos capilares foi realizada utilizando o kit Easy-DNA™ (Cat. n° K1800-01—Protocolo n° 1—Pequenas amostras de sangue e folículos capilares; Invitrogen, Carlsbad, EUA), conforme recomendado pelo fabricante. O DNA foi diluído em 20 μ L de Tris-EDTA. A quantificação e a pureza do DNA extraído foram estimadas por leituras espectrofotométricas nas proporções de 260 nm e 260/280 nm, respectivamente. As concentrações de DNA de todas as amostras testadas foram ajustadas para 5 ng μ L⁻¹. Uma nova PCR em tempo real usando uma combinação de sondas conjugadas de ácido nucleico bloqueado modificado (LNA) foi desenvolvida para genotipar os alelos A1 e A2 do gene da β -caseína (CSN2), conforme metodologia de Gigliotti et al., (2021). Baseando-se nas amostras controles (genótipos A2A2, A1A1 e A1A2) as amostras avaliadas foram confrontadas.

Posteriormente, com o recebimento dos resultados, calculou-se as frequências alélicas e genóticas para a beta-caseína.

8.4 Cálculo das frequências gênicas e genóticas

As frequências alélicas (X_i e X_j) e genóticas (X_{ii} , X_{ij} e X_{jj}) foram determinadas por meio das seguintes equações:

$$\text{Frequências alélicas} \quad X_i = \frac{2N_{ii} + \sum N_{ij}}{2N} \times 100 \quad X_j = \frac{\sum N_{ij}}{2N} \times 100$$

$$\text{Frequências genóticas} \quad X_{ii} = \frac{N_{ii}}{N} \times 100 \quad X_{ij} = \frac{N_{ij}}{N} \times 100 \quad X_{jj} = \frac{N_{jj}}{N} \times 100$$

Onde, N_{ii} , N_{jj} e N_{ij} representam o número de homozigotos e heterozigotos observados nos alelos i e j ; e N corresponde ao número de indivíduos observados.

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

$$(X_i + X_j)^2 = X_i^2 + 2X_iX_j + X_j^2$$

Onde, X_i^2 é a frequência esperada dos homozigotos para o alelo i ; $2X_iX_j$ = frequência esperada para heterozigotos ij ; X_j^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo j .

8.5 Análise físico-química do leite

Para as coletas de leite das análises físico-químicas, foram separadas e selecionadas 20 vacas mestiças, dentre os 51 animais genotipados, sendo 10 vacas com genótipo heterozigoto A1A2 e 10 vacas com genótipo homozigoto A2A2 para a beta-caseína com três composições genéticas: 1/2 HO+GL, 3/4 HO+GL e 5/8 HO+GL. As coletas foram efetuadas 72 horas pós-parto, durante a ordenha automática das vacas, acondicionados em frascos coletores estéreis com volume de 50ml, devidamente identificados e congelados à - 20°C.

Posteriormente as amostras foram descongeladas em temperatura refrigerada e acondicionadas em frascos com conservante bronopol, sendo enviadas ao Laboratório de Qualidade do Leite do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás- LQL/CPA/EVZ/UFG responsável pela determinação da gordura, proteína total, lactose, caseína, sólidos totais e extrato seco desengordurado em instrumento de absorção infravermelha. A determinação de densidade a 15°C e pH foram efetuadas no Núcleo de Estudos, Pesquisas e Procedimentos de Alimentos da Universidade

Federal do Piauí – NUEPPA/UFPI, por meio do equipamento ultrassônico portátil analisador de leite, o Ekomilk® (Cap-Lab Ind.e Com. Ltda.). Seguindo-se as recomendações do fabricante, foi selecionado o modo de análise de leite cru no aparelho.

8.6 Análise estatística

Inicialmente, os dados referentes ao teor de gordura, proteína, lactose, extrato seco total, extrato seco desengordurado, caseína, densidade relativa a 15°C e pH do leite foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição de normalidade. Como os dados não apresentaram distribuição normal, optou-se pelo modelo linear generalizado (GLM) com distribuição gamma para utilização da estatística paramétrica.

Para efetuar o ajuste do modelo linear generalizado (GLM), foi utilizado o procedimento GENMOD para análise da associação entre as variáveis (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos não gordurosos, pH, caseína e densidade) e fatores: genótipos (A1A2, A2A2) e grau de sangue (1/2 HO, GL; 3/4 HO, GL; 5/8 HO, GL), em que se considerou a idade dos animais como covariável. As médias foram comparadas através do teste t com correção de Bonferroni a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa computacional Statistical Analysis System® Academy (SAS, 2023). O teste do qui-quadrado foi realizado para determinar se as frequências genotípicas observadas desviavam significativamente do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Frequências alélicas e genotípicas

As raças zebuínas têm sido utilizadas com sucesso na geração de mestiços e raças sintéticas no Brasil, principalmente na produção de leite. Os animais estudados revelaram-se promissores para a produção de leite contendo apenas a β -caseína A2, conforme apresentado na Tabela 3.

Dos 51 animais genotipados, apenas 1% apresentou homozigose para o alelo A1, 27% apresentaram heterozigose (A1A2) e 70% homozigose para o alelo A2. Para a frequência alélica, observou-se 16% para o alelo A1 e 84% para o alelo A2. As frequências alélicas observadas demonstraram que o alelo A2 encontra-se com frequência superior ao alelo A1 nos animais mestiços, assim como a frequência do genótipo A2A2 prevaleceu sobre os genótipos A1A1 e A1A2.

Os resultados apresentados corroboram com os resultados encontrados na literatura nacional (Sousa et al., 2019; Paschoal et al., 2017; Schettini et al., 2020), que de modo geral apresentam maior frequência do alelo A2, e de seu genótipo A2A2, em detrimento do alelo A1 e do genótipo A1A1 nas mais variadas raças.

Tabela 10. Frequência gênica e genotípica da β -caseína em vacas mestiças.

	Genótipos Observados			Frequências Alélicas	
	A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2
Frequência observada	0,019	0,27	0,70	0,156	0,843
Frequência esperada	0,024	0,26	0,71		
N	1	14	36		

Sousa et al. (2019) e Paschoal et al. (2017) trabalhando com vacas Gir observaram maior frequência para o genótipo A2A2, representando 91,2% para o primeiro autor e 59% para o segundo autor. Tais resultados estão de acordo com estudos presentes na literatura e indicam uma associação do polimorfismo genético com a raça, sendo que raças zebuínas apresentam maior prevalência do genótipo A2A2 em comparação com a taurina. Esta informação valoriza as raças zebuínas que associada aos animais de origem européia, dão origem ao gado mestiço, responsáveis por aproximadamente 70% da produção leiteira no Brasil.

Para a raça Sindi, Schettini et al. (2020) encontraram frequência de 94% para o alelo A2 e 90% para o genótipo A2A2 da mesma raça. E ainda, Silva et al. (2022) ao avaliarem 114 animais da raça Gado Curraleiro Pé Duro, encontraram frequência de 40% para o alelo A1 e 60% para o alelo A2 e as frequências dos genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 foram 20%, 39% e 41%, respectivamente.

Vários estudos vêm sendo realizados para quantificar as frequências alélicas e genotípicas nas mais variadas raças. No entanto, ainda há poucos dados sobre as frequências do gene CSN2 nas raças mestiças, principalmente animais Holandês x Gir de variadas composições genéticas.

Assim sendo, 84% dos animais desta pesquisa são portadores do alelo A2, e podem transmitir esse alelo aos seus descendentes, produzindo um leite com menores níveis de β CM-7, uma vez que, esse peptídeo tem potencial para afetar os receptores opioides do sistema nervoso, imunológico, endócrino e gastrointestinal.

Além disso, foi possível concluir que as frequências observadas estão de acordo com o que era esperado, há constância das frequências gênicas e genótípicas ao longo das gerações, ou seja, a população encontra-se em equilíbrio de Hardy Weinberg.

9.2 Associação polimórfica do gene CNS2 com características de composição do leite

A mediana, distância interquartis (1° e 3° quartis) e valores mínimos e máximos das características de composição do leite de vacas mestiças associadas aos genótipos (A1A2 e A2A2) da β -caseína foram expostos na forma de diagrama de caixa (boxplot) e estão apresentados na Figura 1. Os resultados relacionados aos dois genótipos (A1A2 e A2A2) e grau de sangue (1/2 HO, GL 3/4 HO, GL e 5/8 HO, GL) em relação aos componentes físico-químicos do leite de vacas mestiças estão descritos na Tabela 2.

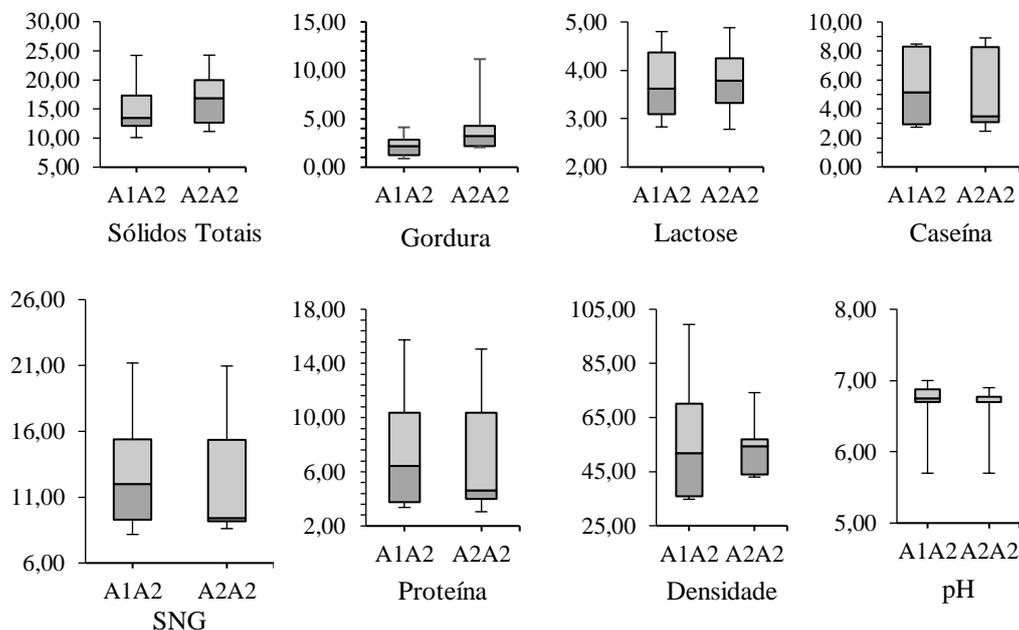


Figura 5: Estimativas das médias, medianas, mínimo, máximo e coeficiente de variação (CV) relacionadas aos parâmetros composicionais do leite de vacas mestiças A1A2 e A2A2.

Entre os componentes, a gordura apresentou maior variabilidade, com coeficiente de variação de 78,3%, seguida da caseína (61,1%) e proteína (59,2%). O teor de lactose apresentou a menor variação na composição (18,7%), pois sua quantidade é sempre constante por ser responsável pelo equilíbrio osmótico do leite, resultados estes que estão de acordo com os publicados na literatura (GONZÁLEZ, 2001).

O intervalo interquartil (diferença entre o terceiro e primeiro quartil) para os dados referente à gordura foi de 1,59 e 2,18 para os genótipos A1A2 e A2A2, respectivamente. Para

as medidas de posição foram encontrados os seguintes valores: 2,46 e 3,20 para mediana e média. O valor máximo foi de 4,12 e 11,16 e mínimo de 0,89 e 2,05 para os genótipos A1A2 e A2A2, respectivamente (Figura 5.) Essa alta faixa de variação deve-se à própria natureza variável do componente.

Os teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, caseína, sólidos não gordurosos, densidade e pH foram associados de duas maneiras: a primeira dentro dos genótipos A1A2 e A2A2 da β -caseína, a segunda levando em consideração o grau de sangue dos animais. A análise dos parâmetros da primeira revelou diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) para o rendimento de gordura e sólidos totais, enquanto na segunda não apresentou diferenças significativas.

A influência do gene CSN2 nos parâmetros de produção do leite vem sendo avaliada por diferentes autores (Nilsen et al., 2009; Hanusová et al., 2010; Visker et al., 2011; Gustavsson et al., 2014; Oleński et al., 2010; Hallén et al., 2008).

Para o teor de sólidos totais, de acordo com os resultados do teste de média, houve diferença significativa ($P < 0,05$), com média de 12,42% para o genótipo A1A2 e 15,31% para o genótipo A2A2. Gordura, proteína e lactose são os principais constituintes dos sólidos totais, e este resultado positivo provavelmente está correlacionado à maior concentração de gordura. Os valores não significativos de lactose e proteína possivelmente é devido estes parâmetros se correlacionarem negativamente com a gordura. A lactose é o principal agente osmótico do leite e quanto maior a quantidade de água retirada pela lactose, menor ou mais diluído será o teor de gordura e vice-versa.

A correlação positiva do teor de gordura está relacionada com a quantidade de proteína, indicando que o aumento no rendimento de gordura irá influenciar negativamente os níveis de proteína do leite.

No rebanho estudado, a concentração de gordura para o genótipo A1A2 foi de 2,14% e 4,05% para o genótipo A2A2. Isso quer dizer que, para cada animal A2A2 no rebanho, há um acréscimo de 1,91% nos teores de gordura do leite.

Tabela 8. Composição físico-química do leite em função dos genótipos A1A2 e A2A2 para a β -caseína e grau de sangue das vacas mestiças.

Variáveis	Genótipos		Composição Genética			EPM	p-valor ¹	p-valor ²
	A1A2	A2A2	1/2 HO, GL	3/4 HO, GL	5/8 HO, GL			
Gordura (%)	2,14	4,05	2,84	3,86	2,33	0,77	0,019*	0,536
Proteína (%)	4,95	5,69	7,69	5,90	3,32	1,33	0,549	0,203
Lactose (%)	4,12	3,88	3,63	4,08	4,31	0,21	0,460	0,404
ST (%)	12,42	15,31	16,14	15,58	10,42	1,35	0,046*	0,182
Caseína (%)	3,91	4,46	6,16	4,63	2,56	1,10	0,574	0,189
SNG (%)	10,14	10,99	13,25	11,01	8,07	1,34	0,526	0,161
Densidade (g/mL)	47,38	49,7	56,97	43,79	45,80	5,37	0,728	0,289
pH	6,82	6,77	6,76	6,72	6,91	0,03	0,232	0,209

ST = Sólidos Totais

SNG = Sólidos não gordurosos

HO = Holandesa

GL = Gir leiteiro

EPM = Erro padrão da média

p-valor¹ = probabilidade do teste t corrigido para genótipo

p-valor² = probabilidade do teste t corrigido para composição genética

Este resultado está de acordo com os resultados relatados por Marko et al. (2020) que ao avaliarem o efeito dos genótipos da β -caseína com características de produção, proteína e gordura do leite em uma população de vacas Holstein-Friesian, encontraram concentrações de gordura significativamente maiores nos animais A2A2 em relação aos genótipos A1A1 e A1A2.

Kumar et al. (2022) ao estudarem a associação do polimorfismo da β -caseína e características de produção economicamente importantes em uma população de vacas mestiças Vrindavani, revelaram que o genótipo A1A1 apresentou porcentagem de gordura significativamente menor em comparação com os genótipos A1A2 e A2A2, enquanto o genótipo A2A2 apresentou a maior porcentagem de gordura.

A gordura do leite apresenta consequências tecnológicas importantes, sobretudo associadas ao rendimento na fabricação de queijos, além de ser fonte de diversos ácidos graxos bioativos com propriedades benéficas à saúde.

No entanto, nossos resultados diferem com os obtidos por Ikonen et al. (2001); Nilsen et al. (2009); Olenski et al. (2010); Ivánkovi'c et al. (2020); e Miluchová et al. (2023) que

associaram a influência do alelo A2 da β -caseína com alta concentração de proteína e baixo teor de gordura. Miluchová et al. (2023) ao analisarem o efeito do polimorfismo do gene da beta-caseína e a associação dos genótipos com características de produção do leite em rebanhos de gado Holstein, encontraram um efeito positivo significativo do genótipo A2A2 para o teor de proteína e tendência ligeiramente negativa para o teor de gordura no leite.

As diferenças encontradas provavelmente se devem ao fato de que a gordura é o componente mais variável do leite, podendo ser afetada pelas particularidades entre as raças, a estação do parto, ou ainda, o tipo de alimentação.

Os resultados foram contraditórios, possivelmente devido ao pequeno tamanho amostral e oferece espaço para uma investigação mais aprofundada para fornecer clareza e robustez na associação do alelo A2 da β -caseína e características de produção e composição do leite.

Embora as pesquisas ainda estejam em andamento para fornecer uma resposta concreta sobre a segurança das variantes A1/A2 da β -caseína, a demanda e os preços dos produtos que contenham exclusivamente o alelo A2, estão aumentando muito rapidamente em nível nacional e internacional devido ao impacto adverso relatado da variante A1 da β -caseína na saúde humana. O mercado global de leite A2 e derivados foi avaliado em 8 bilhões de dólares no ano de 2020 com projeção de 25 bilhões para o ano de 2030, segundo a empresa Precedence Research.

A presente investigação, no entanto, lança luz sobre o desempenho comparativo das variantes de β -caseína A1/A2 em animais mestiços, garantindo mais estudos de associação genômica que podem levar ao estabelecimento de um marcador confiável para melhorar os lucros do rebanho, características de composição, qualidade do leite e a saúde humana.

9. CONCLUSÃO

A frequência do alelo A2 e a frequência do genótipo A2A2 para o gene β -caseína nos animais mestiços avaliados indicam que esses rebanhos podem produzir leite menos alergênico para indivíduos sensíveis à proteína β -caseína.

Devido à inconsistência na literatura relacionada aos efeitos dos alelos A1 e A2 da β -caseína, principalmente em relação aos teores de proteína e gordura do leite, uma investigação mais extensa com um maior número de animais é necessária.

Em conclusão, nossos resultados indicam que os genótipos da β -caseína influenciam os parâmetros composicionais do leite.

10. REFERÊNCIAS

- AYAZ, S. M. S. et al. Detection of A2A2 genotype of beta casein protein (*CSN2*) gene in local, exotic and cross bred cattle in Pakistan, **Animal Biotechnology**, 2023.
- BARBOSA, M. G. et al. Leites A1 e A2: revisão sobre seus potenciais efeitos no trato digestório. **Segurança Alimentar e Nutricional**, 2019.
- DANILOVISKI, D. et al. Health-related outcomes of genetic polymorphism of bovine β -casein variants: A systematic review of randomised controlled trials. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.
- GONZÁLEZ et al. Qualidade do leite bovino: variações no trópico e no subtropico. Editora UPF: 2011.
- GUSTAVSSON, F. et al. Effects of breed and casein genetic variants on protein profile in milk from Swedish Red, Danish Holstein, and Danish Jersey cows. **Journal Dairy Science**, 2014.
- HALLÉN, E. et al. Effect of β -casein, κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants. **Journal of Animal Breeding Genetics**, 2008.
- HANUSOVÁ, E. Genetic variants of beta-casein in Holstein dairy cattle in Slovakia. **Journal Animal Science**, 2010.
- HAQ, M.R.U. et al. Comparative evaluation of cow β -casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse. **European journal of nutrition**, 2014.
- IKONEN T. Associations between casein haplotypes and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. **Journal of Dairy Science**, 2001.
- JIANQIN, S. et al. Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 betacasein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. **Nutrition Journal**, 2016.
- KHAN, R. et al. Potential status of A1 and A2 variants of bovine beta-casein gene in milk samples of Indian cattle breeds. **Animal Biotechnology**, 2023.
- KUMAR, A. et al. Investigation of genetic polymorphism at β -casein A1/A2 loci and association analysis with production & reproduction traits in Vrindavani crossbred cows. **Animal Biotechnology**, 2022.
- MARKO, R. et al. Beta-Casein Gene Polymorphism in Serbian Holstein-Friesian Cows and Its Relationship with Milk Production Traits. **Acta Veterinaria**, 2020.
- MILUCHOVÁ, M. et al. The Effect of the Genotypes of the *CSN2* Gene on Test-Day Milk Yields in the Slovak Holstein Cow. **Agriculture**, 2023.

MONTENEGRO, J. L. et al. Worldwide Research Trends on Milk Containing Only A2 β -Casein: A Bibliometric Study. **Animals**, 2022.

NILSEN, H. Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle. **Genetics Selection Evolution**, 2009.

OLEŃSKI K. et al. Polymorphism of the beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein–Friesian bulls. **Livestock Science**, 2010.

PASCHOAL, J.J. et al. Beta caseína A2 e sua relação com a produção e composição do leite de vacas gir leiteiro. In: XXVII Congresso brasileiro de zootecnia. **Anais eletrônicos [...]** Campinas: 2017.

RASIKA, D.M.D. et al. Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. **Curr. Opin. Food Sci**, 2021.

ROCHA, D. T. et al. Cadeia Produtiva do leite no Brasil: produção primária. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de leite, 2020.

SCHETTINI, G. P. et al. Genetic potential of Sindhi cattle for A2 milk production. **Animal Production Science**, 2020.

SOUSA, N. F. M. Avaliação das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo A1/A2 no gene da beta-caseína em animais da raça gir leiteiro. In: Planeta Inovação. VIII seminário de iniciação científica do IFMG. **Anais eletrônicos[...]** Bambuí: 2019.

SWINBURN, B. Beta casein A1 and A2 in milk and human health: Report to New Zealand **Food Safety Authority**. 2004.

VISKER, M. H. P. D. et al. Association of bovine β -casein protein variant I with milk production and milk protein composition. **Animal Genetics**, 2011.

VITTE, K. DE. et. al. Relationship between β -casein genotypes (A1A1, A1A2, and A2A2) and coagulation properties of milk and the fatty acid composition and sensory characteristics of dairy products (soft cheese, sour cream, and butter) **Acta Agriculturae Scandinavica**, 2022.

FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO DA BETA CASEÍNA EM BOVINOS MISTIÇOS LEITEIROS

Kátia Regina Ferreira Sousa^{1}; Wanderson Fiares de Carvalho²; Gláucia Brandão Fagundes³; Cleidson Manoel Gomes da Silva⁴; Francisca Elda Ferreira Dias⁵; Tânia Vasconcelos Cavalcante⁶*

RESUMO

As caseínas constituem 80% das proteínas do leite bovino e são classificadas em quatro grupos (α -s1, α -s2, β e k) codificadas por diferentes genes. Neste estudo, focamos nas variantes A1 e A2 da β -caseína devido à sua influência nas características tecnológicas do leite e na saúde humana. A hidrólise da variante A1 da β -caseína leva à formação da β -casomorfina 7 (BCM-7), um peptídeo bioativo que tem sido sugerido como causa de várias doenças humanas e associado à baixa digestibilidade do leite. O potencial papel negativo desta variante na saúde humana tem estimulado o planejamento de programas de melhoramento genético de gado com base na seleção genética para aumentar a frequência da variante A2, que está associada ao aumento da digestibilidade do leite. O objetivo deste trabalho foi estimar as frequências alélicas e genotípicas para o gene da betacaseína (alelos A1 e A2) em uma população de gado mestiço. Os genótipos de β -caseína foram submetidos à PCR em Tempo Real seguida por HRM ou metodologia *rhAmp SNP Genotyping System*. Os resultados deste estudo podem ajudar na seleção de animais com a variante A2 do gene da β -caseína para produzir um leite mais digerível que contenha apenas a variante A2 da β -caseína.

Palavras-chave: Leite A2, Betacasomorfina-7, Melhoramento genético.

FREQUENCY OF GENETIC POLYMORPHISM OF BETA CASEIN IN MIXED DAIRY CATTLE

ABSTRACT

Caseins constitute 80% of bovine milk proteins and are classified into four groups (α -s1, α -s2, β and k) encoded by different genes (CSN1S1, CSN1S2, CSN2 and CSN3, respectively). In this study, we focused on the A1 and A2 variants of the β -casein allele due to their influence on the technological characteristics of milk and human health. Digestion of the A1 variant of β -casein leads to the formation of β -casomorphin 7 (BCM-7), a bioactive peptide that has been suggested as a possible cause of several human diseases and associated with poor milk digestibility. The potential negative role of the A1 variant of β -casein in human health has stimulated the design of cattle genetic improvement programs based on genetic selection to increase the frequency of the A2 variant, which is associated with increased milk digestibility. The objective of this work was to estimate the allele and genotype frequencies for the betacasein gene (A1 and A2 alleles) in a crossbred cattle population. The β -casein genotypes were submitted to Real Time PCR followed by HRM or *rhAmp SNP Genotyping System* methodology. The frequency of the desirable A2 variant of β -casein in the bovine population studied was 0.55. The frequency of the undesirable variant A1 in the bovine population studied was 0.45. The results of this study may help in the selection of animals with the A2 variant of the β -casein gene to produce a more digestible milk that contains only the A2 variant of the β -casein.

Keywords: Milk A2, Betacasomorphin-7, Genetical enhancement.

INTRODUÇÃO

Há predominância do uso do gado mestiço nos sistemas de produção de leite. Cerca de 80% da produção leiteira no Brasil é proveniente do cruzamento de animais Holandês-Zebu. Entende-se como gado mestiço aqueles animais derivados do cruzamento de uma raça taurina de origem européia com uma raça zebuína de origem indiana (EMBRAPA, 2021).

As proteínas lácteas são classificadas em dois grandes grupos: as caseínas e proteínas do soro (alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina). As caseínas constituem 80% das proteínas do leite bovino e apresentam quatro formas: α S1 (variando de 12 a 15 g/L), α S2 (3 a 4 g/L), k-caseína ((2–3 g/L) e β -caseína (9 a 11 g/L) (RASIKA, 2021). Essas proteínas diferem na sequência de aminoácidos e são codificadas por quatro diferentes genes (*CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2* e *CSN3*, respectivamente). Foram descritas treze variantes alélicas diferentes para o gene *CSN2* que codifica a β -caseína, são elas: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I e G). Entretanto, as mais frequentemente encontradas são as variantes A1 e A2. Estudos indicam que a β -caseína A2 é a forma original da proteína, presente no rebanho bovino desde sua domesticação há milhares de anos. A variante A1 é o resultado de uma mutação genética transversa, há aproximadamente 5.000-10.000 anos, e espalhou-se com a reprodução dirigida dos animais para o aumento da produção leiteira. É considerada uma mutação via seleção natural (BARBOSA et al., 2019). Espécies não bovinas domesticadas, como búfalos e caprinos, expressam apenas beta-caseína A2 (LOUISE et al., 2021).

A estrutura molecular das variantes A1 e A2 são diferenciadas pelo polimorfismo de um nucleotídeo de citosina (CCT) por uma de adenina (CAT) no gene *CSN2*, o que resulta na substituição de apenas um aminoácido na posição 67^a dos 224 aminoácidos que compõem esta proteína. A β -caseína A1 apresenta um resíduo de histidina, enquanto a β -caseína A2 apresenta um resíduo de prolina (Ramakrishnan et al., 2020). Esta mudança na 67^a posição da cadeia, apesar de ser uma pequena, faz com que as variantes sejam metabolizadas de formas distintas no trato gastrointestinal humano. Em

comparação com A2, a variante A1 é mais fácil hidrolisada por enzimas digestivas presentes no trato gastrointestinal humano, devido à ligação mais fraca entre a isoleucina e a histidina, liberando o peptídeo bioativo β -casomorfina-7 (β CM-7) (GIGLIOTI, 2020). β CM-7 é um agonista exógeno do receptor μ -opioide (MOR), que modula um grande número de funções fisiológicas, incluindo funções do sistema nervoso autônomo e endócrino, emoções e capacidade cognitiva e funções gastrointestinais. Diante disso, a β CM-7 parece ativar o receptor μ -opioide e assim influenciam as funções endócrinas, cognitivas e gastrointestinais (YAMADA et al., 2021).

A liberação de β CM-7 após a digestão gastrointestinal, têm sido considerado como potencial fator de risco à saúde humana, além de afetar propriedades nutricionais do leite. Em contrapartida, a hidrólise enzimática da beta caseína A2 não ocorre ou ocorre em uma taxa muito baixa, gerando o peptídeo beta-casomorfina-9 (β CM-9), que não possui ligação alguma com tais problemas e tem sido associado à redução nos processos de alergia a proteínas do leite e a maior facilidade de digestão (GIGLIOTI, 2020).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi estimar as frequências alélicas e genotípicas para o gene da betacaseína (alelos A1 e A2) em uma população de gado mestiço.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no ano de 2022 em uma propriedade privada localizada no município de Bom Jesus-Piauí. O rebanho era composto por 35 bovinos mestiços oriundos do cruzamento de animais Holandês x Gir.

A colheita de amostras para análise do polimorfismo foi realizada por meio da retirada de pelos da vassoura da cauda do animal, os quais foram colocados em envelopes, identificados e armazenados em temperatura ambiente até a extração de DNA. Os pelos foram retirados laçando-se entre 15 e 25 pelos nos dedos da mão e puxando-os com firmeza. Foi realizada, previamente, a limpeza, seguida da secagem dos pelos. Em seguida, foi verificado se os mesmos apresentavam os bulbos intactos, ou seja, se eles não foram quebrados antes da raiz.

Tabela 2. Ocorrência de variantes do gene β -caseína em vacas leiteiras em variados países

Referência	Raça	País	A1	A2	N
Sebastiani et al., 2020	Holstein Friesian	Itália	30.39	60.65	1629
Hohmann et al., 2021	German Hostein Simental	Alemanha	0.49	0.47	62
Teixeira et al., 2021	Guzerá	Brasil	0.10	0.90	283
Soares et al., 2019	Gir	Brasil	0.11	0.89	2088
Silva et al., (2022)	Curraleiro Pé Duro	Brasil	0.4	0.6	114
Paschoal et al., 2017	Gir	Brasil	0.07	0.1	17

CONCLUSÃO

Animais mestiços apresentam alto potencial para produção de leite A2, devido a frequência deste alelo ser superior quando comparado ao alelo A1. Entretanto, recomenda-se a realização de estudos mais abrangentes para avaliar o efeito do alelo nesta raça, bem como sua contribuição na avaliação genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, M. G. et al. Leites A1 e A2: revisão sobre seus potenciais efeitos no trato digestório. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v.26, p. 1-11, 2019.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Vacas mestiças, 2021.
- GIGLIOTTI, R. et al. New high-sensitive rhAmp method for A1 allele detection in A2 milk samples. *Food Chemistry*, v. 313, 2020.
- LOUISE, S. M. et al. Do non-bovine domestic animals produce A2 milk?: an in silico analysis. *ANIMAL BIOTECHNOLOGY*, p. 1-4,2021.
- RAMAKRISHNAN, M. et al. Milk Containing A2 β -Casein ONLY, as a Single Meal, Causes Fewer Symptoms of Lactose Intolerance than Milk Containing A1 and A2 β -Caseins in Subjects with Lactose Maldigestion and Intolerance: a randomized, double-blind, crossover trial. *Nutrients*, v. 12, n. 12, p. 3855, 2020.

RASIKA, D.M.D.; Vidanarachchi, J.V.; SILVA, R.; BALTHAZAR, C.F.; CRUZ, A.G.; SANT'ANA, J.S. et al. Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. *Curr. Opin. Food Sci*, 2021.

YAMADA, Asaha et al. Genetic polymorphism of bovine beta-casein gene in Japanese dairyfarm herds. *Animal Science Journal*, p. 1-4, 2021.

1- Mestranda no Programa de Pós-graduação em Zootecnia Tropical da Universidade Federal do Piauí- PPGZT-UFPI. E-mail: katiafiares@outlook.com

2- Professor EBTT de Agropecuária/Zootecnia do Instituto Federal do Piauí-IFPI

3- Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Zootecnia Tropical da Universidade Federal do Piauí- PPGZT-UFPI

4- Professor adjunto da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará - UNIFESSPA

5- Professora associada III da Universidade Federal do Tocantins - UFT

6- Professora Titular da Universidade Federal do Piauí - UFPI