

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FREQUÊNCIA GÊNICA E GENOTÍPICA DA β -CASEÍNA A1 E A2 NAS
DIFERENTES RAÇAS BOVINAS LEITEIRAS DE UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS

LUIZA DE PAULA BARBOSA E SILVA

UBERLÂNDIA - MG

2025

LUIZA DE PAULA BARBOSA E SILVA

**FREQUÊNCIA GÊNICA E GENOTÍPICA DA β -CASEÍNA A1 E A2 NAS
DIFERENTES RAÇAS BOVINAS LEITEIRAS DE UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para a aprovação na disciplina Trabalho de
Conclusão de Curso I do curso de graduação em
Biotecnologia

Orientador (a): Prof.Dra.Vivian Alonso Goulart

Co-Orientador: Dr. Phelipe Augusto Borba Martins Peres

UBERLÂNDIA - MG

2025

Sumário

<u>1.</u>	<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>4</u>
1.1.	CONSUMO E PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL	4
1.2.	IMPORTÂNCIA E COMPOSIÇÃO DO LEITE BOVINO	5
1.3.	B-CASEÍNA E A FORMAÇÃO DA B-CASOMORFINA	7
1.4.	DANOS RELACIONADOS AO CONSUMO DE LEITE A1	7
1.5.	GENOTIPAGEM DA B-CASEÍNA A1 E A2	11
<u>2.</u>	<u>JUSTIFICATIVA</u>	<u>13</u>
<u>3.</u>	<u>OBJETIVOS</u>	<u>14</u>
<u>4.</u>	<u>METODOLOGIA DA PESQUISA</u>	<u>15</u>
4.1.	COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	15
4.2.	EXTRAÇÃO DE DNA DOS BULBOS CAPILARES BOVINOS	15
4.3.	AS-PCR – AMPLIFICAÇÃO DO DNA	16
4.4.	CÁLCULO DE FREQUÊNCIAS GÊNICAS E GENOTÍPICAS.	19
<u>5.</u>	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>20</u>
5.1.	RESULTADOS	20
5.2.	DISCUSSÃO	22
<u>6.</u>	<u>CONCLUSÃO</u>	<u>26</u>
<u>7.</u>	<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>27</u>

1. INTRODUÇÃO

1.1. Consumo e Produção de leite no Brasil

O Brasil é o quinto maior país produtor de leite no mundo, apresentando, em média, um milhão de produtores rurais, o que resulta em uma produção de 34,6 bilhões de litros de leite por ano (MINISTÉRIO DA FAZENDA, 2024).

Desse modo, a produção e o consumo de leite bovino no Brasil vêm passando por transformações significativas nos últimos anos. Em 2023, segundo a Pesquisa da Pecuária Municipal do IBGE, o país atingiu uma produção recorde de 35,4 bilhões de litros de leite, mesmo com uma leve queda no número de vacas ordenhadas, reflexo da maior tecnificação no setor (IBGE, 2024). Essa produção, no entanto, contrasta com a tendência de queda no consumo interno. Dados do governo federal indicam que o consumo per capita caiu de 175 litros por habitante/ano em 2013 para cerca de 167 litros em 2022 (ABLV, 2023; BRASIL, 2024), o que representa uma redução de aproximadamente 4,5% em uma década. Entre os principais fatores associados a essa diminuição estão o aumento do custo dos produtos lácteos, a substituição por bebidas vegetais e mudanças nos hábitos alimentares da população brasileira, especialmente entre pessoas que relatam desconfortos gastrointestinais ao consumir leite de vaca. Problemas como distensão abdominal, gases, diarreia e cólicas são frequentemente associados à intolerância à lactose, mas também podem estar ligados à proteína beta-caseína A1, presente na maioria dos leites convencionais. Diante disso, muitos consumidores têm optado por alternativas vegetais como bebidas de soja, amêndoas, aveia e coco, vistas como opções mais leves, digeríveis e compatíveis com dietas restritivas ou preferências alimentares (BRASIL, 2024; EMBRAPA, 2025).

Essa retração no consumo é ainda mais preocupante quando comparada às recomendações nutricionais. De acordo com a Embrapa (EMBRAPA, 2025), o consumo ideal de leite para adultos deveria ser de cerca de 219 litros por ano, patamar bem acima da média nacional atual. Além disso, a elevada importação de lácteos em 2023 (2,2 bilhões de litros em equivalente leite) contribuiu para a queda no preço pago ao produtor, afetando a sustentabilidade da cadeia produtiva (IBGE, 2024).

Entretanto, pesquisas realizadas mostram um aumento considerado na produção e produtividade de leite entre os anos de 2011 e 2021 (ANDRADE et al., 2023), apresentando uma evolução na produção de 32,1 bilhões de litros (2011) para 35,3 bilhões de litros (2021) e uma evolução na produtividade de 1382 litros/cabeça/ano (2011) para 2214 litros/cabeça/ano (2021). Este avanço tem como justificativa a variedade de estabelecimentos e o aumento da

dispersão no espaço geográfico, tendo em vista que a produção leiteira se consolidou nas bacias leiteiras que já existiam no País (Sul e Minas Gerais), além de se intensificar em outras regiões, como o Nordeste Oriental (ANDRADE et al., 2023).

Nota-se, portanto, que apesar de uma queda na produção e consumo, o leite bovino apresentou uma evolução na produção e produtividade de leite em 10 anos (2011 a 2021). Visto que, nesses produtos há requisitos nutricionais essenciais para a vida da população, é necessário adequar a oferta procurando priorizar características do leite que não causem prejuízos ao consumidor, por exemplo, aumentar uma maior oferta de leite A2, para que uma menor quantidade de pessoas que precise optar pelo leite vegetal e garanta os nutrientes presentes no leite de vaca.

1.2. Importância e Composição do leite bovino

Sob o ponto de vista econômico, o leite bovino exerce papel fundamental na estrutura produtiva do agronegócio brasileiro, especialmente por sua capacidade territorial e impacto social. Em 2023, o valor da produção leiteira no Brasil alcançou R\$ 80,3 bilhões, representando cerca de 71,5% do valor total dos produtos de origem animal levantados pela Pesquisa da Pecuária Municipal (IBGE, 2024). A cadeia do leite é composta majoritariamente por pequenos e médios produtores, gerando milhões de empregos diretos e indiretos, principalmente em áreas rurais, onde atua como importante vetor de fixação da população no campo e dinamização das economias locais.

Além do ponto de vista econômico, o leite bovino contém valor nutritivo elevado, com alta concentração de cálcio, o qual contribui para a formação e manutenção dos ossos, vitaminas A, B1, B2, proteínas e minerais que contribuem para uma vida saudável, um crescimento ideal e a manutenção e síntese de tecidos.

Em primeiro lugar, há no leite dois principais grupos de proteínas, sendo eles as caseínas, as quais representam 80% das proteínas, e as proteínas do soro do leite, que representam 20% da quantidade de proteínas presentes no leite. Desse modo, as caseínas são divididas em quatro: alfa s1, β , kappa e a gama-caseína, sendo um produto da degradação da β -caseína. Enquanto as proteínas do soro do leite dividem-se em β -lactoglobulina (LGB), alfa-lactoalbumina (LALBA), imunoglobinas (IgGs), glicomacropéptídeos (GMP), albumina sérica bovina (BSA), lactoperoxidase, lisozima e lactoferrina, sendo essas três últimas, proteínas menores (KAMIŃSKI; CIEŚLIŃSKA; KOSTYRA, 2007).

Assim, membros de uma família multigênica codificam as caseínas, logo, os genes que codificam as quatro caseínas estão presentes no cromossomo 6 em bovinos.

Neste projeto, busca-se um maior foco nas β -caseínas, pois são nelas que ocorrerão a genotipagem do leite, buscando uma diferenciação dos alelos A1 e A2.

A pesquisa realizada por GAI et al., (2023) investigou a influência dos genótipos da β -caseína (A₁A₁, A₁A₂ e A₂A₂) nas propriedades físico-químicas e funcionais do leite bovino, apresentando que não há diferenças significativas na composição geral do leite (teor de gordura, proteína e lactose) entre os genótipos. Entretanto, leite A₁A₁ apresentou pH mais baixo, maior teor de manganês, tendência a coagular mais rapidamente e formar géis mais firmes, embora as diferenças não fossem estatisticamente significativas. Enquanto o heterozigoto teve o pH mais alto e apresentou glóbulos de gordura significativamente menores, o que pode estar relacionado à sua maior estabilidade contra a formação de nata, além de apresentar maior resistência à mudança de pH, indicando maior capacidade de tamponamento. Estes autores concluíram, portanto, que o leite A1 é mais adequado para fabricação de queijos devido à melhor coagulação, enquanto o leite A2 é ideal para produtos que necessitam de estabilidade contra a formação de nata, como iogurtes, onde a textura mais macia pode facilitar a digestão. Por último, o leite A1A2 possui características intermediárias entre a capacidade de coagulação e estabilidade contra a formação de nata.

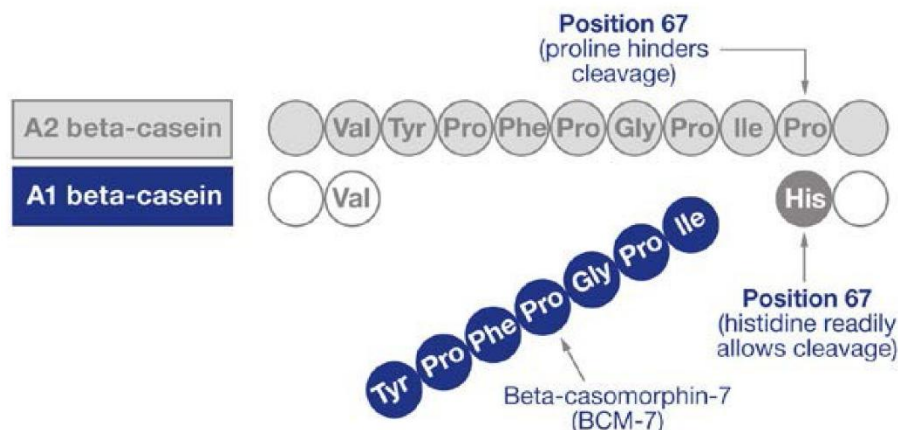
1.3. B-caseína e a formação da B-casomorfina 7

O gene CSN2 é responsável por codificar a β -caseína e está presente no cromossomo 6 em bovinos, como citado anteriormente.

Dessa maneira, a β -caseína possui 13 variantes genéticas, como A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G, sendo as formas mais comuns em gado leiteiro A1 e A2, a forma menos comum é a B e as formas raras são A3 e C (KAMIŃSKI; CIEŚLIŃSKA; KOSTYRA, 2007).

O alelo A2 é uma variante ancestral, a qual possui uma citosina na posição 304 do gene, o que resulta em uma prolina (CCT) na posição 67 da proteína. Por outro lado, o alelo A1 é uma variante resultante de uma mutação do éxon 7 do gene, apresentando uma adenina na posição 304 do gene, resultando em uma histidina (CAT) na posição 67 da proteína (KULIBABA; SAKHATSKYI; LIASHENKO, 2023). Todavia, o polimorfismo A2 possui baixa probabilidade de sofrer clivagem enzimática durante a digestão, enquanto o polimorfismo A1 apresenta maiores chances de sofrer clivagem enzimática, o que resulta em um peptídeo denominado β -casomorfina-7, um agonista conhecido do receptor μ -opioide, encontrando-se principalmente no sistema nervoso central e no sistema do trato digestivo.

Figura 1 - Diferença da posição 67 da beta-caseína A1 e A2 e a formação do BCM-7. A molécula da β -caseína A2 contém uma prolina na posição 67, enquanto a molécula da β -caseína A1 contém uma histidina, a qual sofre clivagem no processo digestivo, liberando o peptídeo bioativo, conhecido como β -casomorfina-7.



Fonte: (Kirk et al., 2017)

Em geral, as β -casomorfinas (BCMs) são peptídeos bioativos originários da β -caseína, apresentando uma cadeia de comprimento de 4-11 aminoácidos, iniciando com uma tirosina na posição 60 (KAMIŃSKI; CIEŚLIŃSKA; KOSTYRA, 2007). Estes são estáveis e contém alta resistência contra clivagens enzimáticas por enzimas proteolíticas comuns, o que resulta em uma maior durabilidade no organismo. Entretanto, a dipeptidilpeptidase IV é uma protease presente na superfície de células do intestino, fígado e sistema imunológico capaz de reconhecer alguns BCMs (geralmente apresentam prolina em posição estratégica), o que permite a clivagem por esta enzima.

Em um âmbito mais específico, a β -casomorfina-7 é um peptídeo bioativo com forte atividade opioide, assim, com o avanço das pesquisas científicas, demonstraram que o leite contendo β -caseína A1, responsável pela formação deste bioativo é capaz de causar danos ao organismo humano (Kamiński; Cieślińska; Kostyra, 2007)

1.4. Danos relacionados ao Consumo de Leite A1

Nota-se que o consumo de leite A1 pode ocasionar malefícios a saúde de pessoas que o consomem, como danos ao sistema gastrointestinal (com sintomas semelhantes à intolerância à lactose), diabetes mellitus tipo 1, doenças cardiovasculares e doenças neurológicas. Apesar de apresentar estudos que apontam esses danos, este assunto ainda necessita de muita pesquisa para uma maior comprovação desses malefícios (Kamiński; Cieślińska; Kostyra, 2007).

Uma pesquisa realizada com esportistas (Kaplan et al., 2022), além de identificar a importância nutricional do leite para praticantes de esportes, sendo rico em proteínas, lipídios,

aminoácidos e minerais, o que beneficia a recuperação muscular, resistência e hidratação, identificou que a maioria dos atletas ao consumirem o leite tradicional (contendo a β -caseína A1 e A2) apresentaram desconforto gastrointestinal, diretamente relacionado com a formação da β -casomorfina-7 durante a digestão. Assim, concluíram que o leite A2, contendo apenas a β -caseína A2, é a melhor opção para os atletas que apresentaram os sintomas ocasionados pelo consumo do leite A1, oferecendo os mesmos benefícios à saúde que o leite convencional.

Em primeiro lugar, os problemas gastrointestinais são causados pela clivagem da β -caseína A1, ao liberar o BCM-7 (agonista dos receptores μ -opioides), que pode resultar em uma redução da motilidade gastrointestinal, aumento da produção de muco, prejudicando a barreira intestinal, redução da massa bacteriana benéfica e aumento das bactérias patogênicas. Assim, com o consumo do leite A1, em comparação com o consumo do leite A2, há uma alta resposta inflamatória, devido ao BCM-7 se ligar a receptores opioides no trato gastrointestinal, modular a resposta imune e aumentar a permeabilidade intestinal devido à produção excessiva de mucina, o que permite que esse peptídeo bioativo, bactérias e outras moléculas pró-inflamatórias entrem na corrente sanguínea, ativando o sistema imunológico. Além disso, um estudo realizado em murinos, baseado no consumo de variantes semelhantes a A1 do leite de vaca com β -caseína, foi realizado para monitorar a resposta inflamatória resultante no intestino do murino, o que identificou o aumento de citocinas pró-inflamatórias e uma maior atividade da mieloperoxidase, um marcador da inflamação do intestino, promovendo uma resposta imune Th2 (Kaplan et al., 2022a).

Uma pesquisa realizada com 45 voluntários chineses (Jianqin et al., 2016), comparou participantes que consumiram leite contendo β -caseína A1 e A2 e outros que consumiram leite apenas contendo a β -caseína A2. Os resultados desse estudo apresentaram, aos que tiveram contato com a β -caseína A1, uma elevada quantidade de inchaço, flatulência, dor abdominal e borboríngos; um aumento de interleucina-4 (IL-4), imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina E (IgE) e IgG1, apontando uma maior inflamação sistêmica; uma menor concentração fecal de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), tendo em vista uma menor atividade anti-inflamatória intestinal. Por conseguinte, quando os pacientes que consumiam o leite com ambas β -caseínas passaram a consumir apenas o leite contendo a β -caseína A2, a inflamação intestinal obteve melhora. Além disso, o leite heterozigoto (A1A2) ocasionou um tempo de trânsito colônico e total de cerca de seis horas mais lento; um aumento de tempo de resposta e a taxa de erro, indicando redução da velocidade e precisão cognitiva. Tanto os pacientes intolerantes à lactose, quanto os pacientes tolerantes apresentaram piora dos sintomas gastrointestinais, o que sugere

que parte desses sintomas podem ser atribuídos ao consumo do leite contendo a β -caseína A1. Assim, os pacientes que apenas tiveram contato com a β -caseína A2, não apresentaram nenhum desses efeitos negativos no organismo (Jianqin et al., 2016).

De acordo com Chia et al. (2017), a hipótese central é que a β -caseína A1, presente na maioria das vacas do Ocidente é uma das principais causas para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Isso ocorre por meio do mimetismo celular, devido à BCM-7 possuir sequências de aminoácidos semelhantes às proteínas humanas, como o GLUT-2, um transportador de glicose presente nas células β pancreáticas. Dessa forma, o sistema imunológico produz anticorpos para o BCM-7, podendo atingir também células β pancreáticas e o GLUT-2, o que contribuiria para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 1 em pessoas geneticamente suscetíveis. A pesquisa ainda aponta que, em virtude do alto consumo de leite contendo a β -caseína A1, como na Finlândia e Suécia, houve uma alta incidência de diabetes mellitus tipo 1, enquanto Japão e Venezuela, com baixo consumo, têm baixa incidência. Outro caso é a China, em que apresentou um aumento de casos de DM1, os quais são correlacionados com o aumento do consumo de laticínios.

Para comprovar essa hipótese sobre o DM1, Chia et al. (2017) relatam um estudo realizado em camundongos utilizados como modelo de diabetes autoimune. Nele, 47% dos animais alimentados com uma dieta rica em β -caseína A1 desenvolveram diabetes mellitus tipo 1. Em contrapartida, nenhum dos camundongos que se alimentaram com uma dieta contendo β -caseína A2 desenvolveu a doença. Além disso, em um grupo experimental, os camundongos foram expostos a uma dieta com β -caseína A1 e naloxona, uma substância que é um antagonista dos receptores opioides, impedindo que o BCM-7 se ligue a eles. Dessa forma, mesmo que o BCM-7 fosse liberado, os receptores estariam bloqueados, atenuando o efeito. Esse resultado sugere fortemente a ação do opioide no desenvolvimento da doença.

Todavia, um estudo realizado por Yin; Miao; Zhang (2010) apresentou dados que divergiram com a ideia de que a BCM-7 teria relação com o desenvolvimento de DM1. Por meio de experimentos que visavam investigar os possíveis efeitos da beta-casomorfina-7 contra a hiperglicemia e o estresse oxidativo mediado por radicais livres em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, foi realizada a análise dos níveis de glicose sanguínea e da atividade de enzimas antioxidantes plasmáticas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase. Desse modo, após a administração oral de β -casomorfina-7 (7.5×10^{-8} mol/dia) por 15 dias, os ratos apresentaram redução nos níveis elevados de glicose sanguínea,

aumento da insulina plasmática e um aumento da atividade de SOD e catalase, sugerindo melhoria no status antioxidante.

Ademais, Summer et al. (2020) citam que EFSA (European Food Safety Authority, 2009) revisou os estudos disponíveis e não encontrou evidências experimentais consistentes em modelos animais que comprovem que a beta-caseína A1 seria um potencial mecanismo para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 1. Ainda concluiu, que os resultados de estudos epidemiológicos e em modelos animais foram controversos e não demonstraram mecanismos biológicos claros que expliquem a indução do DM-1 por A1 ou BCM-7.

Existem estudos que relacionam o consumo de leite contendo a β -caseína A1 (Reichelt et al., 2012) com o desenvolvimento ou agravamento do caso do Transtorno do Espectro Autista (TEA), como a Teoria do Excesso de Opioides, em que se acredita que indivíduos com TEA apresentam uma condição de aumento da permeabilidade intestinal, o que possibilitaria que peptídeos de tamanho maior, como o BCM7, atravessassem a barreira mucosa, ingressando na circulação. A hipótese também sugere que uma atividade ou expressão reduzida da Dipeptidil Peptidase IV (DPPIV), que cliva especificamente peptídeos com prolina ou alanina na penúltima posição, como é o caso do BCM7, em um subgrupo de indivíduos com TEA constituiria um fator de risco, permitindo que o BCM7 circule intacto por mais tempo.

Acredita-se, então, que esse opioide cruzaria a barreira hematoencefálica e atuaria como um agonista de receptores opioides μ (MOR) no sistema nervoso central, dificultando o desenvolvimento neurológico, a cognição e o comportamento, potencialmente exacerbando os sintomas do autismo (Reichelt et al., 2012).

Entretanto, Summer et al. (2020) compara dois estudos em que um se discute a presença de BCM7 em urinas de crianças com transtorno do espectro autista e relataram melhora com dietas sem caseína. Por outro lado, outro estudo relatou que não detectaram BCM7 na urina de crianças com TEA. Foi descrito também que mesmo que o BCM7 seja encontrado no sangue, não há comprovações de que ele cruze a barreira hematoencefálica em quantidades suficientes para afetar o cérebro. Além disso, apesar da teoria sugerir uma deficiência na enzima DPPIV, este artigo descreveu que há estudos conflitantes, pois alguns mostram níveis mais baixos de DPPIV em autistas, enquanto outros mostram níveis mais altos.

Finalizando o quesito dos malefícios causados pelo consumo do leite A1, relacionando ao consumo de leite materno e bovino no período de amamentação, de acordo com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS), é recomendado que os bebês sejam alimentados exclusivamente com leite materno durante os primeiros seis meses de vida. Essa recomendação

se baseia, entre outros fatores, nos comprovados benefícios do leite humano para a saúde infantil, os quais podem ser mais bem compreendidos ao se observar as diferenças moleculares entre o leite humano e o leite bovino (Kaplan et al., 2022b).

Uma dessas diferenças está na β -caseína: no leite materno, essa proteína possui a prolina na posição 67, caracterizando-a como uma subvariante A2. Essa composição específica dificulta a liberação do peptídeo β -casomorfina-7 durante a digestão, o que contribui para a redução de problemas gastrointestinais como diarreia, distensão abdominal e alterações nas fezes. Desse modo, estudos indicam que essa subvariante A2, presente no leite materno, associa-se a melhores índices de sobrevivência, desenvolvimento e saúde geral em comparação com bebês alimentados com fórmulas infantis que contêm tanto a variante A1 quanto a A2 da β -caseína. Além disso, a amamentação proporciona diversos benefícios imunológicos, como o fortalecimento do sistema de defesa do bebê por meio da transferência de anticorpos da mãe pelo leite. Esse processo está ligado à diminuição da incidência de doenças como otite média, meningite e da Síndrome da Morte Súbita Infantil (SMSI). A amamentação também pode atuar como fator protetivo contra o desenvolvimento de diabetes tipo 1, uma vez que retarda a introdução do leite de vaca na dieta do bebê e, conseqüentemente, o contato com a β -caseína A1 (Kaplan et al., 2022).

Apesar de existir essa hipótese em que o BCM7, ao cruzar a barreira hematoencefálica ainda imatura dos bebês, se ligaria aos receptores opioides no centro de controle respiratório do tronco cerebral, causando apneia e morte, Summer et al., (2020), demonstraram que crianças amamentadas no peito (que não consomem BCM7 bovino) também morrem de SMSI, indicando que a causa é multifatorial e não pode ser atribuída a um único peptídeo na dieta. Ademais, de acordo com EFSA (European Food Safety Authority, 2009), nenhum dado convincente apoiou a ideia de que o BCM7 ou a nutrição em geral aumentavam o risco de SMSI.

Conclui-se, então, que os principais efeitos na saúde, devido ao consumo de leite contendo a β -caseína A1, resumem-se em maior tempo de trânsito gastrointestinal, aumento de marcadores inflamatórios, sintomas como dor abdominal, inchaço e alteração no hábito intestinal, baseando-se em que esses efeitos são mais evidentes em pessoas com intolerância à lactose ou sensibilidade digestiva.

1.5. Genotipagem da B-caseína A1 e A2

O trabalho de Kulibaba et al (2023) evidenciou a genotipagem com etapas essenciais garantindo um sucesso do resultado como base para este projeto. O estudo apresentou, em primeiro lugar, a extração do DNA bovino por meio de amostras de folículos capilares de bovinos das raças Ucrânicas Black-and-White e Red-and-White, e Charolais, utilizando um método denominado AS-PCR para realizar a genotipagem do leite.

A PCR Alelo-Específica (AS-PCR) é uma técnica utilizada para identificar variantes genéticas específicas por meio de primers desenhados para se ligarem exclusivamente a determinadas versões alélicas. No estudo de Kulibaba et al (2023), essa técnica foi aplicada para detectar os alelos A1 e A2 do gene *CSN2* em bovinos, relacionado à produção de leite. Foram usados dois primers: um específico para o alelo A1, que se liga quando há uma adenina, e outro para o A2, que se liga no caso de uma prolina. A amplificação ocorre apenas quando há pareamento exato entre o primer e a sequência do DNA molde. O protocolo térmico consistiu em uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de duas fases de amplificação: a primeira com 10 ciclos de desnaturação a 94 °C, anelamento rigoroso a 66–67 °C e extensão a 72 °C; e a segunda com 25 ciclos a 94 °C, anelamento a 64–65 °C e extensão a 72 °C, finalizando com uma extensão final a 72 °C. A detecção dos genótipos foi realizada por eletroforese em gel de agarose com tampão TBE (100–120V por 30–40 min), utilizando um marcador molecular e controles positivos e negativos para validação. A visualização dos fragmentos sob luz UV (312 nm) permitiu classificar os animais como homozigotos (A1A1 ou A2A2) quando houve amplificação em apenas um dos poços, ou heterozigotos (A1A2) quando bandas específicas estavam presentes em ambos (Kulibaba et al, 2023).

Além da técnica de PCR Alelo-Específica (AS-PCR), a PCR em tempo real (qPCR) tem sido amplamente utilizada para a genotipagem do gene *CSN2* em bovinos, especialmente na identificação dos alelos A1 e A2 relacionados à β -caseína. A qPCR permite a amplificação e detecção simultânea do DNA em tempo real, utilizando sondas fluorescentes específicas que emitem sinais distintos para cada alelo. Por exemplo, Martínez et al. (2023) utilizaram um ensaio de discriminação alélica com sondas TaqMan para detectar o polimorfismo rs43703011, que diferencia os alelos A1 (histidina) e A2 (prolina) no códon 67 da β -caseína. No estudo, sondas marcadas com fluoróforos distintos, FAM para o alelo A1 e HEX para o A2, permitiram a identificação precisa dos genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 com alta sensibilidade e especificidade.

2. JUSTIFICATIVA

A β -caseína, uma das principais proteínas constituintes do leite bovino, apresenta duas variantes alélicas predominantes, sendo elas A1 e A2. Desse modo, a digestão da β -caseína A1 promove a liberação do peptídeo β -casomorfina-7 (BCM-7), um composto bioativo com propriedades imunogênicas, o qual é associado a diversos efeitos adversos a saúde humana, como a intolerância à lactose, distúrbios gastrointestinais, doenças cardiovasculares, condições neurológicas e diabetes mellitus tipo 1. Em contrapartida, o leite contendo a β -caseína A2 não gera este peptídeo durante o processo digestivo, sendo considerado uma opção potencialmente menos prejudicial e mais atrativa.

Embora exista essa relevância sanitária, científica e comercial da genotipagem da β -caseína, a aplicação na seleção genética em bovinos leiteiros ainda é incipiente, apresentando uma escassez de dados quanto à frequência dos alelos A1 e A2 nas principais raças leiteiras no país, como Holandesa, Girolando, Gir e Jersey.

Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi analisar o genótipo da β -caseína em vacas leiteiras da região do Triângulo Mineiro, identificando a distribuição dos genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 entre as diferentes raças, correlacionando com o genótipo da β -caseína.

Assim, os resultados permitirão a seleção dos animais de genótipo A2A2, em virtude da produção de leite com maior valor agregado e crescente aceitação pelo mercado.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo dessa pesquisa foi realizar a genotipagem da β -caseína A1 e A2 do gene CSN2 nas diferentes raças bovinas leiteiras, sendo elas: Holandês, Jersolando, Girolando e Meio-Sangue (cruzamento entre Girolando e Holandês), de Uberlândia.

Objetivos específicos:

- Coleta de pelos da cauda de vacas leiteiras para extração de DNA dos bulbos capilares.
- Amplificação do gene CSN2 utilizando a técnica de AS-PCR, seguida de eletroforese em gel de agarose.
- Cálculo das frequências gênicas e genotípicas da β -caseína A1 e A2.

4. METODOLOGIA DA PESQUISA

4.1. Coleta de amostras biológicas

Foram coletados cerca de 10 fios de pelos da cauda de um total de 113 vacas leiteiras, sendo 92 da raça Holandesa, 3 da raça Girolando, 3 da raça Jersolando e 15 animais classificados como Meio-sangue (cruzamentos entre Girolando e Holandês), onde foram removidos junto ao bulbo capilar com auxílio de uma pinça. Os animais são de origem da Fazenda Experimental UFU Campus Glória e animais da empresa parceira do projeto de pesquisa Embryocell, Biotecnologia Reprodutiva Ltda (Parecer 31/2024/CEUA)

4.2. Extração de DNA dos bulbos capilares bovinos

Em primeiro lugar, iniciou-se com o corte dos bulbos capilares dos pelos bovinos anteriormente coletados, em microtubos previamente identificados. Após, adicionou-se 500 uL de Tampão de Lise Nuclear (TLN), composto por 50 mL de TRIS, 20 mL de EDTA 0,5M (pH 8 e 667 mL de Cloreto de Sódio 3M. Depois, adicionou-se 10 uL de SDS 10% e 10 uL de proteinase K (20 mg/mL). Após esses passos, foi necessário homogeneizar as amostras no vórtex e incubar no banho-seco, a 60°C, overnight.

Após 24h, os microtubos foram retirados do banho-seco e adicionou-se 1/3 dos volumes das amostras de NaCl 6M. Desse modo, estes foram homogeneizados no vórtex, incubando a -20°C no freezer por 10 minutos e, depois, foi feita a centrifugação a 10.000 rpm, a 25°C, por 10 minutos. Assim, um *pellet* de proteínas se formou, restos celulares e contaminantes se estabeleceram no fundo do microtubo e o DNA ficou no sobrenadante. Dessa forma, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo previamente identificado, e o primeiro microtubo foi descartado em lixo biológico.

Em seguida, adicionou-se 650 uL de álcool etílico 100%, centrifugando a 10.000 rpm, a 25°C, por 10 minutos e, por conseguinte, formando um pellet de DNA no fundo do microtubo. Por isso, o sobrenadante foi descartado por inversão e 300 uL de álcool etílico 70% foi adicionado, centrifugando a 10.000 rpm, a 25°C, por cinco minutos. Por último, descartou-se o sobrenadante por inversão, deixando o microtubo invertido em um papel até secar e, após seco, adicionou-se 20 uL de H₂O ultrapura, para diluir o DNA e, por fim, as amostras foram homogeneizadas no vórtex.

Para comprovar a integridade do DNA extraído, realizou-se uma eletroforese. Em primeiro lugar, para fazer o gel de agarose, utilizou-se 0,8g de agarose e 100 mL de TBE 0,05X. Desse modo, no primeiro poço, utilizou-se 4 uL de gel red, 4 uL de marcador. Nos outros poços,

utilizou-se 4 uL de gel red, 2 uL de loading dye e 4 uL da amostra de DNA, sendo utilizados os seguintes parâmetros: 80V, 80 mA, 100w, por 40 minutos.

Após a eletroforese, foi realizada a quantificação do DNA no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher) e, após os resultados, diluiu-se o DNA com água ultra pura, visando uma concentração final de 50 ng/uL e um volume final de amostra de 20 uL.

4.3. AS-PCR – Amplificação do DNA

Para a reação de AS-PCR, utilizou-se três primers, um *foward* (F: 5'-AGACTGGAGCAGAGGCAGAG-3'), e dois *reverse*, um para A1 (RA1: 5'-CTTCCCTGGGCCCCATCCA-3') e outro para o A2 (RA2: 5'-CTTCCCTGGGCCCCATCCC-3'). Dessa forma, adicionou-se em dois tubos de trabalho, um para A1 e outro para A2, H₂O (Rnase e Dnase free), Primer Foward (0,2μM), Primer Reverse (0,2 μM) (específico para o tubo de trabalho) e um de Taq Green Master Mix (Promega), contendo nucleotídeos (0,2nM), TAQ polimerase (0,05 U/μL) e cloreto de magnésio (1,5 mM). Para cada animal, foram realizadas duas reações, uma para a constatação da presença do gene da β-caseína A1 e outra para a β-caseína A2, as quais a partir da amplificação realizada pelo processo da AS-PCR, foram analisadas posteriormente pela técnica de eletroforese, onde se houver um produto amplificado na reação do gene A1 aparece uma banda, o mesmo ocorre para o gene A2.

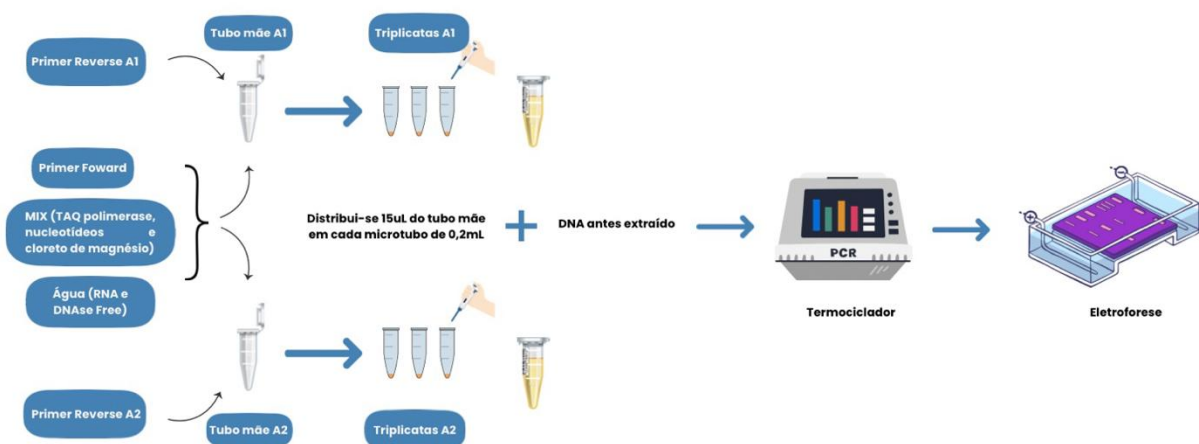
Assim, foi adicionado 15 uL da reação em microtubos de 0,2 uL, previamente identificados. Em seguida, adicionou-se 5 uL do DNA anteriormente extraído nas amostras e encaminhadas ao termociclador, onde passaram pelas duas etapas, como citadas na pesquisa realizada por Kulibaba, et al, (2023). Para o controle negativo, a reação seguiu apenas com os componentes da técnica de AS-PCR, isentas de qualquer DNA. As etapas constaram de desnaturação inicial, em uma temperatura de 94°C, em cinco minutos, com apenas uma repetição. Após, iniciou-se o estágio um com uma desnaturação, ainda a 94°C, por 30 segundos repetida 10 vezes. Em seguida, ocorreu o anelamento dos primers às fitas simples de DNA, a 67°C, com duração de 30 segundos, seguida de um processo de extensão, a 72°C, por 30 segundos. Após os 10 ciclos do estágio um, começou o estágio 2 com uma desnaturação a 94°C, por 25 minutos. Em seguida, o anelamento a 63°C e uma extensão, a 72°C, ambos por 30 segundos. Após esses 25 ciclos, ocorre uma extensão final, para completar a síntese de DNA, a 72°C, por cinco minutos com apenas uma repetição.

Após todo esse processo, foi realizada a eletroforese. Para fazer o gel de agarose, utilizou-se 1,5g de agarose em 100 mL de TBE 0,05x. No primeiro poço, adicionou-se 4 uL de

marcador (100kb de DNA) e 4 uL de gel red. Nos outros poços, adicionou-se 4 uL de gel red e 4 uL de amostra. A eletroforese foi realizada em 100V, 110mA, 100W, durante 60 minutos.

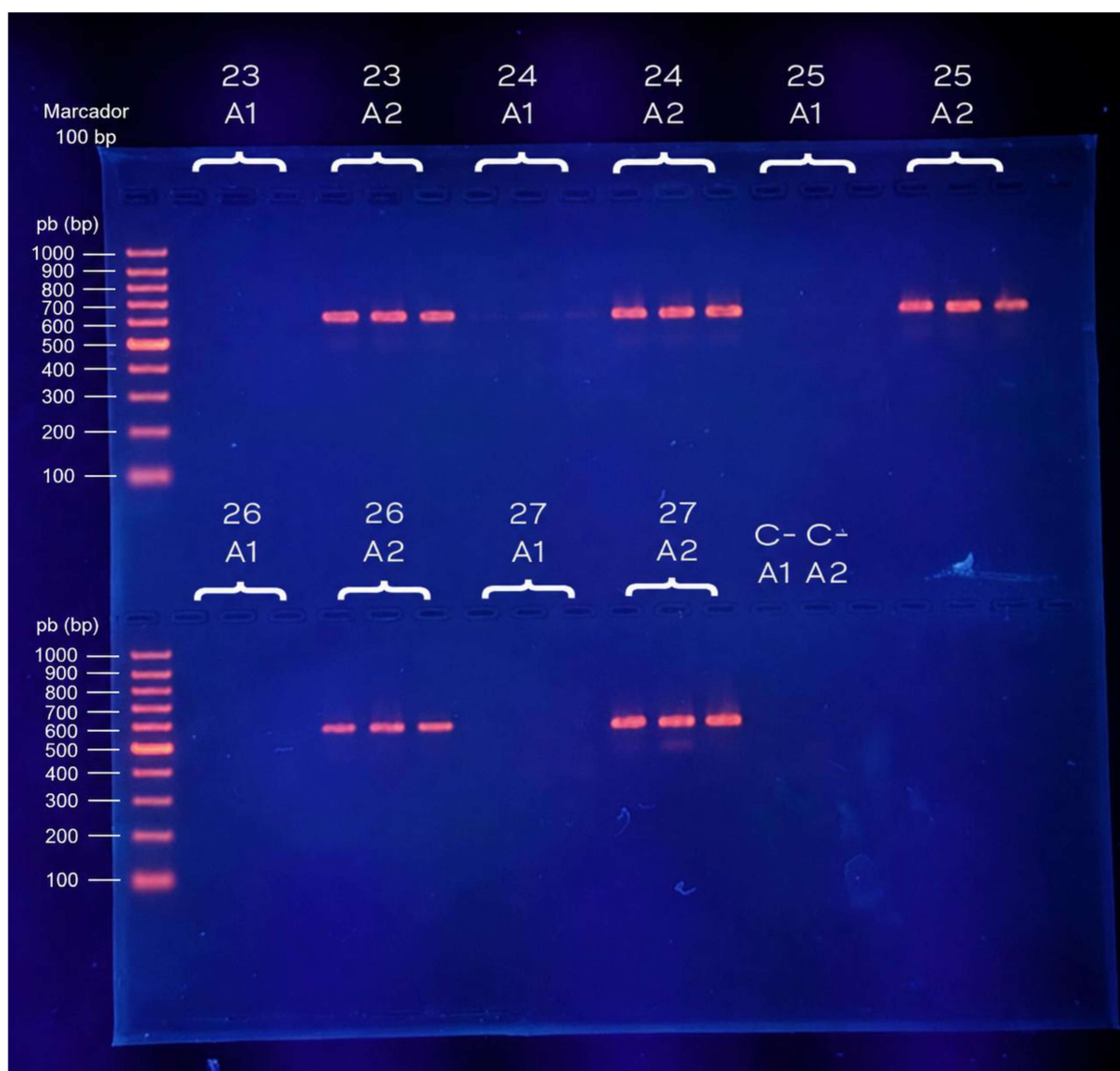
Posteriormente, o resultado foi analisado: bandas apenas no poço do A1 significa que as amostras são A1A1, bandas apenas no poço A2 significa que as amostras são A2A2 e bandas em ambos os poços significa que as amostras são A1A2.

Figura 2- Esquema do processo de AS-PCR. Em primeiro lugar, foram realizadas duas reações (uma para o gene A1 e outra para o A2); dessa forma, um tubo mãe para p(A1) e outro para q(A2). Os reagentes em comum às duas reações foram adicionados aos dois tubos, sendo eles o primer Forward, o MIX da TAQ polimerase (TAQ polimerase, nucleotídeos e o cloreto de magnésio) e a água (RNase e DNase free). Para que ocorra apenas a amplificação do gene A1, no tubo mãe A1 foi adicionado o primer Reverse A1; o mesmo ocorre no tubo mãe A2, mas adicionando o primer Reverse A2. O volume total do p(A1) foi distribuído em microtubos de 0,2mL das triplicatas da amostra A1 e o volume total do q(A2) foi distribuídos em microtubos de 0,2mL das triplicatas da amostra A2). O DNA do indivíduo antes extraído e purificado foi adicionado a cada uma das amostras e levados ao termociclador, onde ocorreu a amplificação. Em seguida, foram encaminhados à eletroforese, para averiguar o resultado.



Fonte: Elaboração própria

Figura 3 -Exemplo do resultado de uma AS-PCR em uma Eletroforese; a qual foi realizada em triplicata, onde os três primeiros poços de determinada amostra são destinados ao gene A1 e os três poços seguintes ao gene A2; a presença de bandas nos três primeiros poços indica a presença do alelo A1 e a presença de bandas nos três poços seguintes indica a presença do gene A2.



Fonte: Elaboração própria

4.4.Cálculo de Frequências gênicas e genotípicas.

No contexto da beta-caseína, os genótipos possíveis são A1A1, A1A2 e A2A2. A frequência genotípica é calculada pela razão entre o número de indivíduos com cada genótipo e o total de indivíduos avaliados. Já a frequência gênica é estimada com base no número de alelos presentes na população, considerando que cada indivíduo possui dois alelos.

A frequência do alelo A1 (representada por p) e do alelo A2 (q) pode ser obtida pelas fórmulas:

$$p = (2 \times \text{número de A1A1} + \text{número de A1A2}) / (2 \times \text{total de indivíduos})$$

$$q = (2 \times \text{número de A2A2} + \text{número de A1A2}) / (2 \times \text{total de indivíduos})$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RESULTADOS

No presente estudo, foram estimadas as frequências alélicas (A1 e A2) e genotípicas (A1A1, A1A2 e A2A2) de um total de 113 vacas leiteiras, sendo 92 da raça Holandesa, 3 da raça Girolando, 3 da raça Jersolando e 15 animais classificados como Meio-sangue (cruzamentos entre Girolando e Holandês), como mostrado na tabela 1.

Tabela 1 - Frequência gênica e genotípica da beta-caseína A1 e A2

Raça	N	A1A1 (%)	A1A2 (%)	A2A2 (%)	p(A1)	q(A2)
Holandesa	92	5,43	48,91	45,65	0,299	0,701
Meio-sangue (Girolando × Holandês)	15	6,67	53,33	40,00	0,333	0,667
Jersolando	3	0,00	66,67	33,33	0,333	0,667
Girolando	3	0,00	33,33	66,67	0,167	0,833
Total	113	5,31	49,56	45,13	0,3009	0,6991

Fonte: Elaboração própria

No rebanho Holandês (n = 92), observou-se frequência alélica de $p(A1) = 0,299$ e $q(A2) = 0,701$. A distribuição genotípica apresentou 5,43% de animais A1A1, 48,91% A1A2 e 45,65% A2A2. Esses dados indicam que quase metade dos animais já apresentam o genótipo A2A2, considerado economicamente desejável, enquanto a alta proporção de heterozigotos sugere um rebanho em processo de transição genética, possivelmente influenciado por seleção direcionada.

No grupo composto pelos animais Meio-sangue (n = 15), a frequência alélica de $p(A1)$ foi de 0,333 e a de A2 de 0,667. As frequências genotípicas observadas foram de 6,67% para A1A1, 53,33% para A1A2 e 40,00% para A2A2, mantendo o padrão encontrado no rebanho Holandês, com predominância do alelo A2 e maior concentração de heterozigotos.

Nos rebanhos Jersolando e Girolando (n = 3 para cada raça), não foram identificados indivíduos com o genótipo A1A1. No Jersolando, observou-se 66,67% de animais A1A2 e 33,33% A2A2, com frequências alélicas $p = 0,333$ e $q = 0,667$. Para a raça Girolando, as frequências genotípicas foram de 33,33% para A1A2 e 66,67% para A2A2, sendo a frequência do alelo A2 particularmente elevada ($q = 0,833$). Embora o número reduzido de animais nessas

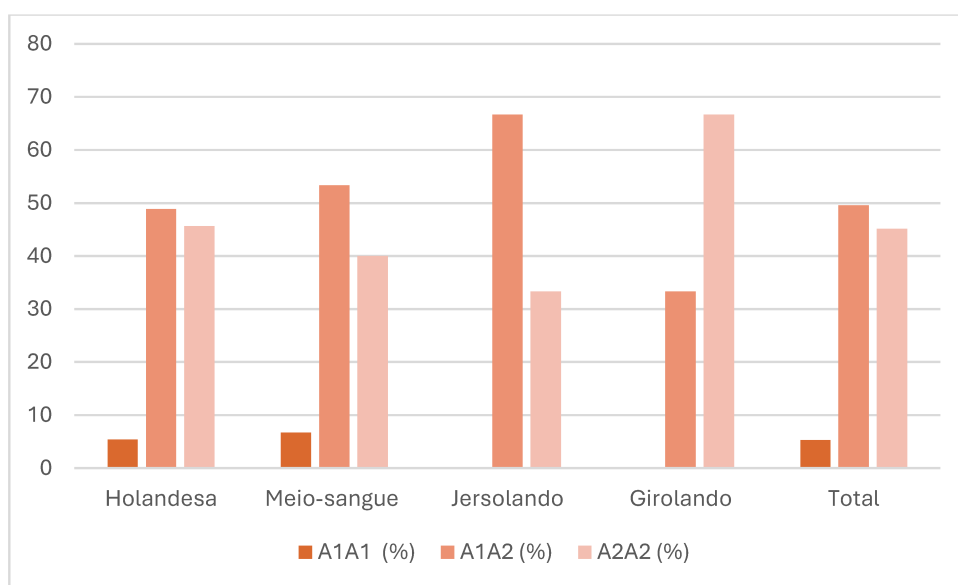
categorias limite inferências populacionais amplas, os resultados reforçam a maior prevalência do alelo A2 nesses grupos.

Ao considerar o conjunto total de animais avaliados ($n = 113$), observou-se frequência genotípica global de 5,31% para A1A1, 49,56% para A1A2 e 45,13% para A2A2. As frequências alélicas correspondentes foram de $p(A1) = 0,3009$ e $q(A2) = 0,6991$. Esses valores demonstram de forma consistente a superioridade numérica do alelo A2 na população estudada.

Com base nas frequências alélicas obtidas para a população total observadas na população analisada neste trabalho ($p = 0,3009$ para o alelo A1 e $q = 0,6991$ para o alelo A2), foram calculadas as frequências genotípicas esperadas segundo o modelo de Hardy-Weinberg (EHW). De acordo com esse princípio, espera-se que, em populações ideais, as frequências genotípicas sejam distribuídas como p^2 para A1A1, $2pq$ para A1A2 e q^2 para A2A2. Assim, os valores esperados seriam: 9,05% para A1A1, 42,04% para A1A2 e 48,87% para A2A2.

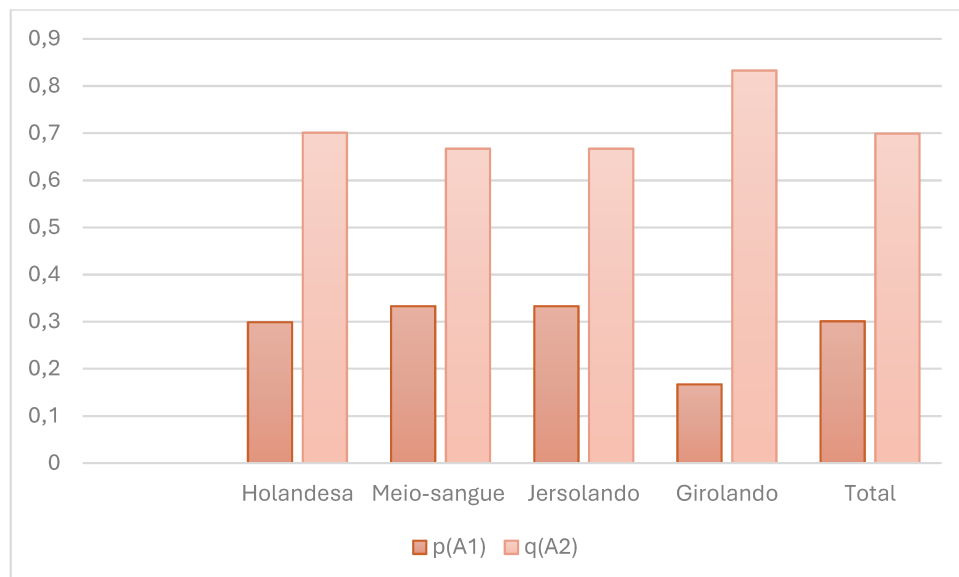
Quando comparados aos valores observados (5,31% de A1A1, 49,56% de A1A2 e 45,13% de A2A2), verifica-se que a população não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Observou-se um déficit de indivíduos homozigotos A1A1 e um excesso de heterozigotos A1A2, enquanto a frequência de A2A2 apresentou valor ligeiramente inferior ao esperado. Esses desvios sugerem a atuação de fatores evolutivos que alteram o equilíbrio populacional, como seleção, migração ou mutação.

Figura 4 - Gráfico da Frequência Genotípica. Em laranja escuro é indicado a frequência de indivíduos da raça que apresentam o genótipo A1A1; em laranja é indicado a frequência de indivíduos da raça que são heterozigotos (A1A2); em laranja claro é indicado a frequência de indivíduos da raça que são A2A2.



Fonte: Elaboração própria

Figura 5 - Gráfico da Frequência Alélica. Em laranja escuro é indicado a frequência do alelo A1 nos indivíduos de determinada raça; a cor laranja claro indica a frequência do alelo A2 nos indivíduos de certa raça.



Fonte: Elaboração própria

5.2. DISCUSSÃO

Na genética de populações, dois conceitos fundamentais para a análise da variação genética ao longo do tempo são a frequência gênica (ou alélica) e a frequência genotípica. A frequência gênica representa a proporção de cada alelo presente em um determinado locus dentro de uma população. Já a frequência genotípica indica a proporção de indivíduos que apresentam um determinado genótipo em relação ao total de indivíduos da população.

O presente estudo revelou uma frequência predominante do alelo A2 da beta-caseína no rebanho analisado do Triângulo Mineiro, com variações mínimas entre as raças leiteiras. A raça Holandesa apresentou uma frequência alélica de 70% de beta-caseína A2, enquanto Meio-Sangue apresentou uma frequência de 66,7% do alelo A2, a qual é a mesma para a raça Jersolando. O que se difere da raça Girolando, a qual teve a maior frequência gênica para a beta-caseína A2, sendo de 83,3%. Ao total, o conjunto dos 113 animais, sem diferenciá-los por raça, apresentou, aproximadamente, uma frequência de 70% do alelo A2 e 30% do alelo A1, o que demonstra uma forte pressão do mercado de laticínios para eliminar a presença do leite contendo a beta-caseína A1 das prateleiras dos estabelecimentos.

A princípio, desde a domesticação do rebanho bovino, a forma original da proteína é a β -caseína A2, todavia, devido à mutação genética transversa, por volta de cinco mil a dez mil anos atrás, a β -caseína A1 surgiu (Gomes Barbosa et al., 2019). A raça Holandesa, por exemplo, a qual neste trabalho destacou-se em relação a quantidade, no fim do século XIX foi selecionada somente para aptidão leiteira na América do Norte, em virtude de apresentar como ponto forte a capacidade de produzir uma quantidade elevada de leite, com teores de gordura e proteína reduzidos, o que na época as questões mais importantes era o volume de leite produzido e não o percentual de seus componentes (Augusto, 2023).

Com a evolução da ciência e o conhecimento presente sobre como a β -caseína A1 gera efeitos negativos ao organismo humano, os quais foram citados anteriormente nesse estudo, a indústria realocou o foco para leite contendo pelo menos ambas as β -caseínas (A1 e A2), mas com um maior foco em priorizar leites com apenas a β -caseína A2, devido à crescente demanda de consumidores por produtos que ofereçam melhor digestibilidade e bem-estar. (“Leite A2 ganha cada vez mais espaço no mercado mundial | MilkPoint”, 2016).

Dessa forma, geneticamente, a raça Holandesa possui 50% de chance de produzir leite contendo a β -caseína A2, enquanto na raça Jersey com a frequência de 75% de apresentar o alelo A2. Diferente da raça Guernsey, a qual possui pouca recorrência no território brasileiro, sendo a única da subespécie *taurus* que apresenta 100% dos animais produzindo somente o leite com a β -caseína A2 (“Melhoramento genético de bovinos permite a produção de leite menos alergênico - Portal Embrapa”, 2017). Enquanto as raças zebuínas, da subespécie *indicus*, as quais possuem grande recorrência no Brasil, por exemplo a raça Gir, cerca de 98% dos indivíduos apresentam produção de leite voltada à β -caseína A2, possivelmente não sendo afetada pela mutação genética sofrida pelas raças da subespécie *taurus* (“Mutações da Proteína do Leite | Dra. Elaine Morch”, [S.d.]).

Assim como nesta pesquisa, onde o alelo A2 possuiu destaque na frequência alélica, um estudo de cunho genético (Aparecida et al., 2024) teve como foco a avaliação da frequência dos polimorfismos A1 e A2 do gene da beta-caseína em uma população de 112 vacas mestiças Holandês-Zebu (HZ), criadas em quatro rebanhos no norte de Minas Gerais. A metodologia empregada, baseada na extração de DNA e análise por técnica de reação em cadeia da polimerase com sistema de mutação refratária à amplificação (ARMS-PCR), permitiu a genotipagem precisa dos animais. Os resultados demonstraram que 64,3% das vacas eram heterozigotas (A1A2), 29,5% eram homozigotas para A2A2 e 6,2% eram homozigotas para A1A1. A frequência gênica foi de 38,4% para o alelo A1 e 61,6% para o alelo A2, sendo o

último mais frequente para ambas as raças. Esses resultados corroboram com os desta pesquisa em relação a frequência alélica, a qual apresentou uma frequência de 70% do alelo A2 e 30% do alelo A1. Desse modo, a predominância do alelo A2 no estudo de (Aparecida et al., 2024) pode ser justificada pela composição genética (influência zebuína), pelos padrões de cruzamento utilizados na região e por possíveis pressões seletivas aplicadas ao longo das gerações.

Os resultados observados neste estudo podem ser comparados ao trabalho conduzido em Bangladesh por (Safa et al., 2023), que analisou as variantes A1 e A2 da β -caseína em bovinos mestiços Holstein-Local utilizando PCR alelo-específico. Naquela população, também observaram proporções elevadas do alelo A2 (66%) e uma concentração expressiva de heterozigotos (48%). Assim como no presente estudo, os autores atribuem tais resultados à composição genética dos rebanhos e ao nível de sangue Holandês, que tende a aumentar a presença do alelo A1 quando intensificado nos cruzamentos. A semelhança entre as frequências encontradas nas duas pesquisas reforça a ideia de que populações mestiças apresentam forte tendência à predominância do alelo A2, mesmo quando influenciadas por raças taurinas leiteiras. Dessa forma, os resultados obtidos não apenas confirmam o predomínio do alelo A2 nos rebanhos avaliados, mas também evidenciam um processo de mudança genética potencialmente influenciado pela seleção direcionada à produção de leite A2. Esse cenário destaca a relevância da genotipagem como ferramenta de apoio ao melhoramento genético e ao desenvolvimento de rebanhos mais competitivos, especialmente diante do crescente interesse comercial por produtos derivados de leite A2.

Outra pesquisa conduzida no estado do Tocantins (Oliveira et al., 2021), avaliou as frequências alélicas e genotípicas do gene β -caseína A1/A2 em bovinos leiteiros, com o objetivo de estabelecer o perfil genético dessa importante proteína do leite em rebanhos da região. Foram analisados 421 animais mestiços em lactação, a partir de amostras de DNA extraídas de bulbos de pelos e genotipadas por meio de PCR em tempo real com sistema TaqMan™. Os resultados mostraram uma clara predominância do alelo A2 (71,73%) em comparação ao alelo A1 (28,27%), indicando que o perfil genético desses rebanhos está mais direcionado para a produção de β -caseína A2. Em termos genotípicos, a maior proporção de animais foi observada no genótipo A2A2 (52,96%), seguido por A1A2 (37,53%) e A1A1 (9,50%). Assim como relatado por Tocantins, onde a elevada proporção de heterozigotos A1A2 indicou um rebanho em transição genética, corroborando com os resultados do presente estudo que também evidenciaram essa característica. No grupo Holandês, por exemplo, quase metade dos animais

eram A1A2 (48,91%), sugerindo que a população ainda carrega importante contribuição do alelo A1, embora o alelo A2 já se destaque como predominante. O mesmo padrão foi observado nos animais Meio-sangue, e até mesmo nas raças Jersolando e Girolando, onde a presença de heterozigotos também foi significativa e a ausência de animais A1A1 reforça a tendência de redução desse genótipo por influência do melhoramento genético recente. Além disso, a predominância do alelo A2 em todas as categorias acompanha a tendência descrita no estudo de Tocantins, onde a elevada frequência desse alelo foi atribuída à composição genética dos rebanhos e ao uso crescente de touros A2A2 nos programas de inseminação artificial (Oliveira et al., 2021).

Nota-se que as 50 vacas disponibilizadas pela empresa parceira neste estudo estão em processo de seleção genética, na qual há o cruzamento apenas de vacas com o genótipo A1A2 e/ou A2A2, dessa forma, vacas pertencentes ao genótipo A1A1 não são utilizadas. Outro fator é que as 63 vacas disponibilizadas pela Fazenda Experimental UFU Campus Glória passam pelo processo de fertilização *in vitro*, onde não há a reprodução assistida de vacas do genótipo A1A1. Isso agrega e apresenta forte importância nos resultados obtidos nessa pesquisa.

Além do grande interesse pela melhoria da saúde da população em relação ao consumo do leite contendo a β -caseína A2, o mercado de laticínios lucra até quatro vezes mais ao vender o leite e derivados lácteos contendo apenas o alelo A2, em comparação com o leite convencional (“Melhoramento genético de bovinos permite a produção de leite menos alergênico - Portal Embrapa”, 2017). Isso demonstra uma importante influência da crescente onda do melhoramento genético do cruzamento das diferentes raças de gado leiteiro no mundo.

Nota-se, portanto, que a predominância do alelo A2 e a baixa proporção de animais A1A1 sugerem uma possível pressão seletiva contra o alelo A1, favorecendo indivíduos A2A2. Tal cenário pode refletir a crescente demanda do mercado consumidor por leite A2, que incentiva produtores a investirem em reprodutores e matrizes com genótipo favorável. Além disso, a alta frequência de heterozigotos (49,56%), superior ao valor esperado, pode refletir práticas de acasalamento direcionado ou seleção artificial voltada para o alelo A2, uma vez que animais A2A2 são cada vez mais valorizados na produção de leite e indica que a população ainda se encontra em transição, apresentando potencial para aumento futuro de animais A2A2 por meio de estratégias de acasalamento direcionado.

Os resultados obtidos corroboram estudos prévios que descrevem mudanças estruturais em rebanhos leiteiros submetidos à seleção para o alelo A2, reforçando a importância da genotipagem como ferramenta de apoio ao melhoramento genético.

6. CONCLUSÃO

Essa pesquisa buscou analisar a frequência genica e genotípica da β -caseína em vacas leiteiras da região do Triângulo Mineiro, identificando a distribuição dos genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 entre as diferentes raças.

Dessa forma, confirmou-se por meio deste estudo a predominância do alelo A2 e o declínio do genótipo A1A1 em todas as raças, o que indica uma pressão seletiva contra o alelo A1, favorecendo indivíduos A2A2, tendo em vista a demanda do mercado consumidor por leite A2. Além disso, a alta frequência de heterozigotos reflete às práticas de acasalamento direcionado ou seleção artificial voltada para o alelo A2, apontando uma população em transição, indicando uma tendência ao aumento de indivíduos com o genótipo A2A2 no futuro.

O estudo apresentou como limitações a quantidade reduzida de indivíduos pertencentes às raças Girolando, Jersolando e Meio-Sangue, o que gerou uma maior dificuldade para comparar a frequência gênica e genotípica destas raças com a Holandesa, que apresentou um maior n. Diante dessa situação, é necessário a realização de outros estudos para uma melhor comparação dessas raças no Triângulo Mineiro.

Nota-se, portanto, uma área de pesquisa em crescente desenvolvimento e ganhando prioridade devido à grande procura do leite A2 pelos consumidores, visando uma opção potencialmente menos prejudicial e mais atrativa.

7. REFERÊNCIAS

Aparecida, Geziella Aurea *et al.* Polymorphism of the beta-casein gene in holstein-zebu cows in the north of Minas Gerais, Brazil. **Revista SODEBRAS - Soluções Para o Desenvolvimento do País**, v. 19, n. 221, 24 jun. 2024.

Augusto, Bruna Sala. Universidade estadual paulista faculdade de ciências agrárias e veterinárias Câmpus de Jaboticabal importância da raça holandesa na pecuária leiteira: revisão bibliográfica (2023).

Chia, J. S. J. *et al.* A1 beta-casein milk protein and other environmental pre-disposing factors for type 1 diabetes. **Nutrition & diabetes**, v. 7, n. 5, 15 maio 2017.

Gai, N. *et al.* Influence of β -casein genotype on physicochemical properties and functionality of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 12, p. 8357–8367, 1 dez. 2023.

Gomes Barbosa, Marina *et al.* Leites A1 e A2: revisão sobre seus potenciais efeitos no trato digestório. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 26, p. e019004–e019004, 18 fev. 2019.

Kamiński, Stanisław; Cieślińska, Anna; Kostyra, Elzbieta. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, n. 3, p. 189–198, 2007.

Kaplan, Merve *et al.* **Benefits of A2 Milk for Sports Nutrition, Health and Performance.** **Frontiers in Nutrition** Frontiers Media S.A., 13 jul. 2022a.

Kaplan, Merve *et al.* Benefits of A2 Milk for Sports Nutrition, Health and Performance. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 935344, 13 jul. 2022b.

Kirk, Ben *et al.* A2 milk enhances dynamic muscle function following repeated sprint exercise, a possible ergogenic aid for a1-protein intolerant athletes? **Nutrients**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2017.

Kulibaba, Roman; SAKHATSKYI, Mykola; LIASHENKO, Yuriy. Comparative analysis of A1 and A2 allele detection efficiency for bovine CSN2 gene by AS-PCR methods. **Acta Biochimica Polonica**, v. 70, n. 1, p. 205–209, 2023.

Leite A2 ganha cada vez mais espaço no mercado mundial | MilkPoint. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/leite-a2-ganha-cada-vez-mais-espaco-no-mercado-mundial-99123/>>. Acesso em: 11 dez. 2025.

Melhoramento genético de bovinos permite a produção de leite menos alergênico - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/29569359/melhoramento-genetico-de-bovinos-permite-a-producao-de-leite-menos-alergenico>>. Acesso em: 10 dez. 2025.

MINISTÉRIO DA FAZENDA. **Maapeamento das Cadeias de Proteínas Animal sumario executivo - Pesquisa Google.** (2024). Disponível em: <<https://shre.ink/eJQK>>. Acesso em: 4 maio. 2025.

Mutação da Proteína do Leite | Dra. Elaine Morch. Disponível em: <<http://morch.com.br/mutacao-da-proteina-do-leite/>>. Acesso em: 10 dez. 2025.

Oliveira, Rodolfo Olinto Rotoli Garcia *et al.* Allele and genotype frequency for milk beta-casein in dairy cattle in the northern region of Tocantins State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 58, p. e186603–e186603, 23 dez. 2021.

Reichelt, Karl L. *et al.* Peptides' role in autism with emphasis on exorphins. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 23, n. 0, p. 10.3402/mehd.v23i0.18958, 24 ago. 2012.

Ricardo Guimarães Andrade *et al.* evolução recente da produção e da produtividade leiteira no brasil - Pesquisa Google. v. v. 16 n. 5 (2023), 17 maio 2023.

Safa, Mahfuza Ahmed *et al.* Analysis of β -casein gene for A1 and A2 allelic variants in Holstein-Local crossbred cattle of Bangladesh using allele-specific PCR. **JABET**, v. 7, n. 1, p. 74–82, 29 out. 2023.

Summer, Andrea *et al.* Occurrence, biological properties and potential effects on human health of β -casomorphin 7: Current knowledge and concerns. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 21, p. 3705–3723, 29 nov. 2020.

Yin, Hong; MIAO, Jinfeng; ZHANG, Yuanshu. Protective effect of β -casomorphin-7 on type 1 diabetes rats induced with streptozotocin. **Peptides**, v. 31, n. 9, p. 1725–1729, set. 2010.