

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
CÂMPUS OESTE – SEDE SÃO LUÍS DE MONTES BELOS – GO  
PÓS GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL E FORRAGICULTURA  
MESTRADO PROFISSIONAL

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO GENÓTIPO A2A2 EM BOVINOS DE APTIDÃO  
LEITEIRA DO BRASIL**

Acadêmica: Meirielly Jordana Rafael dos  
Santos  
Orientador: Prof. Dr. Osvaldo José da  
Silveira Neto

São Luís de Montes Belos, GO  
Março, 2025

MEIRIELLY JORDANA RAFAEL DOS SANTOS

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO GENÓTIPO A2A2 EM BOVINOS DE APTIDÃO  
LEITEIRA DO BRASIL**

Dissertação apresentada a Universidade Estadual de Goiás: Câmpus Oeste - sede São Luís de Montes Belos, para obtenção do título de Mestre em Produção Animal e Forragicultura.

Área de Concentração: Zootecnia  
Linha de pesquisa: Produção Animal  
Orientador: Prof. Dr. Osvaldo José da  
Silveira Neto

São Luís de Montes Belos – GO

Março, 2025

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

SS237  
d

Santos, Meirielly  
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO GENÓTIPO A2A2 EM BOVINOS DE  
APTIDÃO LEITEIRA DO BRASIL / Meirielly Santos;  
orientador Osvaldo José da Silveira Neto. -- São Luís  
de Montes Belos, 2025.  
42 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação  
Mestrado Profissional em Produção Animal e  
Forragicultura) -- Unidade de São Luís de Montes Belos,  
Universidade Estadual de Goiás, 2025.

1. Bovinos - Genética molecular. 2. Genotipagem  
Bovinos. 3. Genótipo A2A2 - Identificação. 4. Leite A2  
- Caracterização genética. 5. Produção leiteira  
Melhoramento genético. I. Silveira Neto, Osvaldo,  
orient. II. Título.

MEIRIELLY JORDANA RAFAEL DOS SANTOS

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO GENÓTIPO A2A2 EM BOVINOS DE  
APTIDÃO LEITEIRA DO BRASIL**

Aprovada em 02 de abril de 2025, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Dissertação apresentada como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Animal e Forragicultura, pela Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Oeste - Sede São Luís de Montes Belos, sob orientação do(a) professor(a) Dr(a) Osvaldo José da Silveira Neto

Banca Examinadora

*Osvaldo José da Silveira Neto*

---

Prof. Dr. Osvaldo José da Silveira Neto – UEG  
Orientador

*Rodrigo Zaiden Taveira*

---

Prof. Dr. Rodrigo Zaiden Taveira – UEG  
Membro

*Fabiola Alves Lino*

---

Profa. Dra. Fabiola Alves Lino – LINO AGROPECUARIA  
Membro

SÃO LUÍS DE MONTES BELOS - GO2025

Dedico este aos meus insubstituíveis pais, a minha heroína da vida real, vulgo minha irmã e minha amada Isabela Cristina, minha pequena gigante de quatro patas, sem vocês nada em minha vida seria possível, ou minimamente sonhável. E claro, ao meu orientador e mestre, Dr. Osvaldo Neto, pois sem sua confiança e paciência esse trabalho jamais sairia do papel.

A estes eu dedico.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, minha eterna gratidão por todo amor, apoio e dedicação incondicionais ao longo da minha vida. Vocês sempre foram minha base, me incentivando a seguir meus sonhos e me dando forças nos momentos mais desafiadores. Cada conquista minha é, na verdade, nossa, pois sem o exemplo de vocês, sem os ensinamentos e sem todo o carinho e suporte, eu não teria chegado até aqui. Obrigada por acreditarem em mim mesmo quando eu duvidei, por me guiarem com sabedoria e por serem meu maior porto seguro. Amo vocês infinitamente.

A minha amada, incomparável e super irmã, não poderia deixar de agradecer por todo suporte durante toda minha vida, sem você eu não seria nada, você me dá motivos para viver cada dia mais. Obrigada por ser VOCÊ e por me permitir ser sua irmã. O orgulho que tenho de você não cabem em palavras. Obrigada por me apoiar em tudo, por brigar quando necessário, e claro, obrigada por ser minha patrocinadora oficial em tudo. Jamais esquecerei tudo o que você fez e faz por nós. Obrigada por tentar entender um pouco da veterinária e me ajudar nessa tese, sem você, minhas quase treze mil amostras, estariam a deriva tentando se descobrirem entre girolando, gir e demais. Amo você eternamente.

À minha querida Isabela Cristina, minha companheira fiel em todos os momentos. Sua presença traz leveza e alegria aos meus dias, tornando cada desafio mais suportável e cada conquista mais especial. Seu jeitinho ranzinza, mas irresistível, sempre me arranca sorrisos mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada por estar ao meu lado com todo seu amor incondicional, por cada lambida de conforto e por ser minha parceira de vida. Você é muito mais do que uma cachorrinha; é parte do meu coração para sempre, te amo.

Dedicarei aqui um parágrafo para agradecer ao meu mestre e guia dessa vida acadêmica, e incansável orientador, Dr. Osvaldo Neto, sem você essa tese jamais passaria pelos meus pensamentos, e sem sua paciência, calma, perseverança, eu não concluiria meu mestrado. Só tenho a agradecer a Deus por ter te colocado na minha vida, desde o meu primeiro período da veterinária, lá em meados de 2016. Obrigada por me orientar durante a faculdade, o TCC, o mestrado (esse não foi um trabalho fácil eu sei rsrs) e sempre, obrigada meu amigo.

Não poderia jamais deixar de agradecer a Deus e as minhas chefonas e minhas colegas de trabalho. Marília, Ana, Aliny e chefão Leandro, que me permitiram

pesquisar e desenvolver esse trabalho, mesmo diante de todo o caos do dia a dia. Minhas colegas, meus dias são mais alegres ao lado de vocês. E em especial, para minha colega e companheira de artigo, que não mediu esforços para conseguir juntar os resultados das quase treze mil amostras, obrigada Julia Woch.

Obrigada a minha tia Bia e tio Edilson, que sei que estarão lá na casinha deles durante minha apresentação, orando para que tudo corra bem. Aos meus amigos de antes e aqueles que fiz durante essa caminhada, ao meu psicólogo Duane, que irradiou de alegria quando disse que iria realmente finalizar o mestrado, meu muito obrigada.

As dificuldades vieram, e como vieram, mas todos vocês contribuíram para que essa conclusão fosse possível, obrigada por fazerem parte da minha vida.

*“O silencio nunca foi neutro. Ou ele reforça a violência  
do opressor, ou fortalece a resistência do oprimido.”*

(Audre Lorde)



## RESUMO

Dentro do cenário da bovinocultura leiteira mundial e brasileira, a produção de leite possui um papel essencial na nutrição, na economia e no cenário social, onde o leite A2A2 tem se destacado cada vez mais no mercado mundial, principalmente devido aos seus benefícios e impacto nos produtos lácteos em geral. Há algum tempo, o leite A2 vem sendo pesquisado em virtude do seu potencial genético e suas vantagens para a saúde humana, e consequentes menores efeitos adversos em determinadas pessoas. Além de ser uma tendência global que traz benefícios e oportunidades aos produtores e laticínios, tendo um futuro promissor no mercado global com o seu crescimento significativo. Nesta conjuntura, o presente trabalho teve como objetivo relatar a ocorrência do gene A2A2 em bovinos de diversos estados do Brasil, no período de janeiro de 2023 até dezembro de 2024, que tiveram seu material testado para verificação da presença do gene, além de uma breve revisão sobre o tema e subtemas que o circundam, como raças mais predispostas, seleção, diferenças entre alergia à proteína do leite e intolerância à lactose, dentre outras. As raças com maior predisposição genética para o gene A2 estão sendo cada vez mais selecionadas por meio do melhoramento genético e das tecnologias de genotipagem, e consequentemente a procura pela verificação dessa predisposição. O tema exposto nesse trabalho vem para contribuir para futuros estudos sobre esse crescente tema e mercado.

Palavras-chave: Beta caseína. Genotipagem. Girolando. PCR. Proteína.

## **ABSTRACT**

Within the context of global and Brazilian dairy cattle farming, milk production plays an essential role in nutrition, the economy, and the social landscape. In this scenario, A2A2 milk has increasingly stood out in the global market, mainly due to its benefits and impact on dairy products in general. For some time now, A2 milk has been the subject of research due to its genetic potential and its advantages for human health, resulting in fewer adverse effects in certain individuals. In addition to being a global trend that brings benefits and opportunities to producers and dairy industries, A2 milk has a promising future in the global market with its significant growth. In this context, the present study aimed to report the occurrence of the A2A2 gene in cattle from various states of Brazil between January 2023 and December 2024. The animals had their genetic material tested to verify the presence of the gene. Additionally, this study includes a brief review of the topic and related subjects, such as the most genetically predisposed breeds, selection processes, differences between milk protein allergy and lactose intolerance, among others. Breeds with a higher genetic predisposition for the A2 gene are increasingly being selected through genetic improvement and genotyping technologies, which has consequently increased the demand for testing this predisposition. The topic addressed in this study aims to contribute to future research on this growing subject and market.

Keywords: Beta-casein. Genotyping. Girolando. PCR. Protein.

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição dos genótipos da beta caseína -----	32
Gráfico 2 – Distribuição dos genótipos da beta caseína nos anos de 2023 e 2024 –	33
Gráfico 3 – Comparativo dos genótipos da beta caseína nas raças Girolando, Gir, Sindi e Nelore -----	37

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – raças das amostras recebidas e quantitativo de cada uma -----	34
Quadro 2 – localidade de saída das amostras e quantitativo de cada uma -----	34, 35, 36

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APLV	Alergia à proteína do leite de vaca
ARMS PCR	Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction
BCM-7	$\beta$ -casomorfina-7
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
POP	Procedimento Operacional Padrão
TPO	Teste de provocação oral

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
2.1 Definição de leite comum e A2 e suas diferenças	17
2.2 História da descoberta da beta caseína	18
2.3 Diferença entre leite A2 e zero lactose	19
2.4 Raças bovinas mais predispostas ao gene A2	20
2.5 Predisposição entre machos e fêmeas para o gene A2	21
2.6 Seleção	22
2.7 Diagnóstico de Alergia à Proteína do Leite de Vaca (APLV) e Diagnóstico de Intolerância à Lactose	22
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1</b>	<b>26</b>
<b>RESUMO</b>	<b>26</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>27</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>27</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>32</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>42</b>

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1 INTRODUÇÃO

A  $\beta$ -caseína é uma das principais proteínas do leite bovino, simbolizando cerca de 25 a 35% das caseínas totais. Existem inúmeras variantes genéticas dessa proteína, sendo mais frequentes as variantes A1 e A2, que divergem entre si por uma única substituição de aminoácido (GAZI et al., 2022).

A digestão da  $\beta$ -caseína A1 no trato gastrointestinal humano pode acarretar na formação de um peptídeo bioativo denominado  $\beta$ -casomorfina-7 (BCM-7), relacionado as possíveis reações adversas no ser humano que possui a alergia desse tipo de proteína. Por outro ângulo, a  $\beta$ -caseína A2 não produz esse peptídeo no decorrer da digestão, o que tem acarretado em uma crescente demanda por leite composto exclusivamente pela proteína A2 (Sobczak et al., 2014).

É possível encontrar informações sobre a descoberta das variantes A1 e A2 da proteína  $\beta$ -caseína em estudos executados na década de 1990, quando alguns pesquisadores detectaram diferentes variantes genéticas dessa proteína, nas raças bovinas, em específico (Maluf et al., 2021).

Essas variantes derivam-se de mutações pontuais no gene da  $\beta$ -caseína, acarretando na substituição de aminoácidos específicos da proteína. A variante A1 é identificada pela existência de histidina na posição 67 da cadeia polipeptídica, enquanto a variante A2 conta com a prolina nessa mesma posição. Essa diferença supostamente sutil, influencia consideravelmente na digestão da proteína e nos possíveis efeitos na saúde humana (Sebastiani et al., 2020).

Para facilitar a identificação das variantes A1 e A2, pesquisadores desenvolveram um teste de genotipagem utilizando a técnica de tetra-primer ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction). A metodologia permite diferenciar os alelos de forma simples e econômica, envolvendo apenas uma reação de PCR (reação em cadeia de polimerase) seguida de eletroforese. Essa técnica tem sido amplamente procurada por criadores e programas de melhoramento que visam selecionar animais com genótipo A2A2, visando à produção de leite com menor potencial alergênico (Maluf et al., 2021).

A crescente demanda por leite A2A2 está relacionada aos possíveis benefícios à saúde humana. Estudos sugerem que o consumo de leite contendo  $\beta$ -caseína A2

está associado a menores riscos de doenças cardiovasculares e distúrbios gastrointestinais. Além disso, consumidores que relatam desconforto ao ingerir leite convencional podem tolerar melhor o leite A2. Essas evidências têm incentivado a genotipagem de rebanhos para aumentar a frequência do alelo A2, visando atender a um mercado consumidor mais exigente e preocupado com a saúde.

Em suma, a identificação e seleção de variantes do gene da  $\beta$ -caseína em bovinos têm ganhado destaque na pesquisa e na indústria leiteira. A predominância do alelo A2 em determinadas raças bovinas e o desenvolvimento de técnicas eficientes de genotipagem são passos importantes para a produção de leite com potencialmente menores efeitos adversos à saúde humana.

Com isto, a presente revisão teve como objetivo abordar sobre a beta caseína e levantar dados sobre a ocorrência do gene A2A2 em diversas regiões do Brasil, dentro dos anos de 2023 e 2024.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Definição de leite comum e A2 e suas diferenças

O leite é uma fonte alimentar básica e completa produzido através das secreções das glândulas mamárias dos mamíferos. As suas proteínas têm se tornado relevante tanto no setor de laticínios quanto na indústria alimentar pelos seus atributos nutricionais e funcionais elevados. Em bovinos, as proteínas do leite compreendem dois grandes grupos: as caseínas e proteínas do soro (Priyadarshini et al., 2018).

As caseínas compõem cerca de 80% das proteínas lácteas totais, e, no âmago delas, a  $\beta$ -caseína (regida pelo gene CSN2) totalizam 30%. O bovino leiteiro possui 15 variantes de  $\beta$ -caseína A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I, J, K) (GAZI et al., 2022).

Dentre essas 15 variantes que os bovinos leiteiros apresentam, as variantes A1 e A2 são as mais comumente encontradas nesses animais (Montenegro et al., 2022).

Onde a mais antiga delas é a variante A2, além de ser da qual as demais se originam por mutação. Quando comparadas, as variantes A1 e A2 se diversificam por um único aminoácido, que se encontra na posição 67 da cadeia peptídica, correspondendo então a histidina (His67) para a variante A1 e a prolina (Pro67) no caso da variante A2 (Sebastiani et al., 2020).

Têm-se um grande interesse nessas variantes, pois as mesmas afetam a concentração de gordura e proteína do leite, além das suas propriedades tecnológicas e a capacidade de afetar a saúde humana. Pois nos últimos anos, com esse crescente aumento da produção e conseqüentemente consumo dos derivados lácteos, os efeitos colaterais nos seres humanos, relacionados com a metabolização das proteínas e os açúcares presentes no leite bovino ficaram cada vez mais evidentes (Lily & Mulumebet, 2021).

O leite bovino pode ser dividido em dois grupos básicos: o leite comum, que contém uma mistura das variantes de beta-caseína A1 e A2, e o leite A2, que é composto exclusivamente pela variante A2 dessa proteína. Durante a digestão gastrointestinal da  $\beta$ -caseína A1, ocorre a liberação de um peptídeo bioativo denominado  $\beta$ -casomorfina-7 (BCM-7), este apresenta afinidade pelos receptores opioides, onde realiza a ligação a eles em tecidos neuronais e não neuronais, o que pode estar associado aos desconfortos digestivos em algumas pessoas, diminuindo a motilidade intestinal e ação da lactase (Sobczak et al., 2014).

Por outro lado, a digestão da  $\beta$ -caseína A2 não resulta na formação de BCM-7, ou a mesma ocorre em níveis baixos, o que pode reduzir a ocorrência desses desconfortos (Xu li et al., 2022).

Reconhecendo essa diferença, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou, em 20 de outubro de 2021, a Resolução 3.980, autorizando a inclusão da frase “Leite produzido a partir de vacas com genótipo A2/A2” nos rótulos de leite A2. Além disso, permitiu-se a alegação de que “O leite A2 não promove a formação de BCM-7, que pode causar desconforto digestivo” (Anvisa, 2021).

Essa medida visa informar os consumidores sobre os potenciais benefícios digestivos do leite A2, especialmente para aqueles que sofrem com os desconfortos ao consumir o leite convencional. É importante destacar que, embora o leite A2 possa ser uma alternativa para indivíduos com sensibilidade à  $\beta$ -caseína A1, ele não é adequado para pessoas com alergia à proteína do leite ou intolerância à lactose (Anvisa, 2021).

## **2.2 História da descoberta da beta caseína**

Os avanços na genética molecular ao longo dos anos proporcionaram a identificação dos alelos A1 e A2 do gene da beta-caseína no leite bovino. A beta-caseína, uma das principais proteínas do leite, possui variantes que se divergem por um único polimorfismo de nucleotídeo (SNP), impactando tanto na qualidade do leite quanto na saúde humana (Maluf et al., 2021).

A descoberta dessa variante e seus impactos para a saúde humana datam de estudos da década de 1990, quando pesquisadores identificaram que a digestão da beta-caseína A1 levava à formação da BCM-7 (Maluf et al., 2021).

Com a evolução das técnicas de biotecnologia, notadamente o PCR, fez-se capaz a inovação de metodologias mais definidas para a genotipagem dos alelos A1 e A2. A técnica de tetra-primer ARMS-PCR foi lapidada, possibilitando a diferenciação eficiente entre os alelos, o que é primordial para programas de melhoramento genético cobijando-se a produção de leite com predominância da variante A2 (Bustin, 2000).

Ademais, estudos populacionais têm auxiliado a compreender a disposição desses alelos em diversas raças bovinas. Tais conquistas não simplesmente ampliam o conhecimento sobre a genética do leite bovino, mas também expandem novos

caminhos para a produção de leite com perfis de proteína específicos, conforme as preferências e necessidades de saúde dos clientes (Pereira, 2018).

### **2.3 Diferença entre leite A2 e zero lactose**

O leite A2 e o leite zero lactose são opções que objetivam contemplar os consumidores com sensibilidades específicas ao leite convencional, mas divergem em suas composições e nos consumidores foco. Conforme já relatado, o leite A2 é produzido a partir de vacas que possuem exclusivamente a variante A2 da  $\beta$ -caseína, uma proteína do leite. Pesquisas indicam que essa variante pode ser mais facilmente digerida por algumas pessoas, reduzindo desconfortos gastrointestinais associados ao consumo de leite convencional. No entanto, é importante salientar que o leite A2 não é o mais apropriado para pessoas com alergia à proteína do leite de vaca, já que outras proteínas alergênicas continuam presentes na composição do produto (Barbosa et al., 2019).

Por outro lado, o leite zero lactose é recomendado para pessoas com intolerância à lactose, um açúcar natural do leite. Nessa circunstância, ocorre uma deficiência ou ausência da enzima lactase, responsável pela digestão da lactose, acarretando em sintomas como inchaço, diarreia e desconforto abdominal após o consumo de laticínios. Para tornar o leite adequado para esses indivíduos, a lactose é primeiramente quebrada em glicose e galactose no decorrer do processamento industrial, facilitando sua digestão (Ramalho e Ganeco, 2016).

É essencial diferenciar a intolerância à lactose da alergia à proteína do leite de vaca. Ao passo que a intolerância à lactose é uma dificuldade digestiva ligada ao açúcar do leite, a alergia abrange uma reação do sistema imunológico às proteínas do leite, como a  $\beta$ -caseína. Pacientes com alergia podem desenvolver sintomas que variam de urticária a anafilaxia, reação essa que pode ser potencialmente fatal. Sendo assim, tanto o leite A2 quanto o leite zero lactose não são seguros para pessoas com alergia à proteína do leite de vaca, já que ambos contêm essas proteínas alergênicas (Piracanjuba Health & Nutrition, 2022).

Em síntese, o leite A2 e o leite zero lactose auxiliam em necessidades distintas: o primeiro pode ser uma opção para aqueles que sofrem com desconfortos gastrointestinais com o leite convencional, provavelmente por causa da variante A1 da  $\beta$ -caseína; o segundo é indicado para indivíduos com intolerância à lactose.

Contudo, nenhum dos dois é compatível para pessoas com alergia à proteína do leite de vaca, que precisam evitar o consumo de qualquer produto lácteo que possua essas proteínas (Reagro, 2024).

Conforme já mencionado anteriormente, o leite A2 é gerado a partir de vacas geneticamente selecionadas para produzir exclusivamente a variante A2 da beta-caseína, uma proteína do leite. Essa seleção genética tem como consequência um leite que, durante a digestão, não libera a beta-casomorfina-7, o peptídeo associado aos desconfortos digestivos em algumas pessoas. A abertura do leite A2 no mercado brasileiro foi agilizada pela resolução da Anvisa que autorizou a rotulagem específica desse produto, comunicando ao consumidor sobre sua origem genética diferenciada (Forbes, 2021).

Em contrapartida, o leite zero lactose é submetido a um processo tecnológico que retira ou reduz consideravelmente o teor de lactose, transformando-o em um produto adequado para indivíduos com intolerância à lactose. Esse método envolve a adição de lactase, enzima que quebra a lactose em glicose e galactose, auxiliando sua digestão por pessoas com deficiência dessa enzima. Deve-se notar que o leite zero lactose mantém as proteínas do leite, incluindo a beta-caseína, em sua forma original (Forbes, 2021).

## **2.4 Raças bovinas mais predispostas ao gene A2**

Há pouco tempo, estudos têm pesquisado a predisposição de determinadas raças bovinas para a produção de leite com o gene A2 da beta-caseína. Algumas pesquisas mostraram que as raças zebuínas, como Gir, Guzerá e Sindi, possuem uma alta predisposição para o alelo A2, o que aponta um grande potencial para a produção de leite A2A2 (Peghini, 2019).

Em contrapartida as raças taurinas, como a Holandesa e a Jersey, manifestam uma menor incidência desse alelo, embora a raça Guernsey tenha destaque por sua maior predisposição à produção de leite A2. Tais descobertas são cruciais para o aprimoramento de estratégias de melhoramento genético, que possuem o objetivo de potencializar a produção de leite com perfil A2 (Peghini, 2019).

Estudos executados no Brasil também têm buscado explorar a frequência dos alelos A1 e A2 em diferentes raças bovinas. Uma pesquisa com rebanhos zebuínos leiteiros no estado do Rio Grande do Norte analisou 156 animais das raças Gir e

Guzerá. Os resultados mostraram uma alta frequência do alelo A2 em ambas as raças, com 98% no Gir e 97% no Guzerá. Além disso, as frequências genotípicas A2A2 foram de 96% e 93% para Gir e Guzerá, respectivamente (Lima, 2014).

Outra pesquisa com o mesmo alvo de estudo, focou na raça Crioula Lageana (também conhecida como “Franqueiro”). Onde, foram coletadas 110 amostras de animais da raça Crioula Lageana, de propriedades do Planalto Serrano Catarinense. Ao fim dessa análise descobriu-se frequências alélicas de 84% para o alelo A2 e 16% para o alelo A1. As frequências genotípicas descobertas foram 68,9% para A2A2, 1% para A1A1 e 30,1% para A1A2. Esses resultados apontam uma predominância do alelo A2 na população estudada, destacando o potencial da raça Crioula Lageana para a produção de leite A2 (Pereira, 2018).

Para facilitar a determinação das variantes A1 e A2, pesquisadores desenvolveram um teste de genotipagem utilizando a técnica de tetra-primer ARMS-PCR. A metodologia possibilita a capacidade de diferenciar os alelos de forma simples e econômica, consistindo apenas em uma reação de PCR seguida de eletroforese. Essa técnica tem se tornado abundantemente procurada por criadores e programas de melhoramento que planejam selecionar animais com genótipo A2A2, visando à produção de leite com menor potencial alergênico (Ye et al., 2001).

O cada vez mais crescente mercado por leite A2A2 pode estar relacionado aos possíveis benefícios à saúde humana. Estudos indicam que o consumo de leite contendo  $\beta$ -caseína A2 está associado a menores riscos de doenças cardiovasculares e distúrbios gastrointestinais. Ademais, consumidores que manifestam desconforto ao ingerir leite convencional podem tolerar melhor o leite A2. Essas evidências têm motivado a genotipagem de rebanhos para aumentar a frequência do alelo A2, procurando atender a um mercado consumidor mais exigente e preocupado com a saúde (Santos, 2023).

## **2.5 Predisposição entre machos e fêmeas para o gene A2**

A disposição do gene A2 entre bovinos não possui diferenças relevantes entre machos e fêmeas, uma vez que a transmissão desse gene segue os princípios mendelianos da herança autossômica. Tanto touros quanto vacas podem ser homozigotos (A2A2), heterozigotos (A1A2) ou homozigotos para o alelo A1 (A1A1). A determinação do genótipo de um animal é executada por meio de genotipagem, que

investiga o material genético para identificar a presença dos alelos A1 e A2. Essa prática é primordial para programas de melhoramento genético que desejam a produção de leite com perfil A2, suprimindo a demanda do mercado por produtos com menor potencial alergênico (Sistema FAEP, 2021).

## **2.6 Seleção**

A seleção de bovinos para a produção de leite A2 abrange a identificação e reprodução de animais com o genótipo A2A2, intencionando atender à demanda por produtos lácteos com menor potencial alergênico. Para atingir esse objetivo, é primordial realizar a genotipagem tanto de touros quanto de vacas, assegurando que ambos os pais possuam e possam transmitir o alelo A2 para a progênie (Embrapa, 2021).

A genotipagem é executada através da coleta de amostras biológicas, como sangue ou pelo que são encaminhadas para laboratórios especializados em determinar o gene predominante desses animais (Embrapa, 2021).

Com os resultados em mãos, os produtores são capazes de planejar cruzamentos estratégicos, fazendo uso de sêmens de touros A2A2 para inseminar vacas com genótipos compatíveis, garantindo a predominância do alelo A2 na descendência (Embrapa, 2021).

Ademais, a eliminação gradual de animais com genótipos A1A1 e A1A2 do rebanho agiliza a transformação do rebanho comum para um rebanho de produção exclusiva de leite A2. A escolha dessas práticas pode ser capaz de ocasionar a conversão completa do rebanho em aproximadamente duas a três gerações, em média de 10 a 15 anos, de acordo com a estratégia escolhida (Embrapa, 2021).

## **2.7 Diagnóstico de Alergia à Proteína do Leite de Vaca (APLV) e Diagnóstico de Intolerância à Lactose**

A distinção entre alergia à proteína do leite de vaca (APLV) e intolerância à lactose é essencial, pois ambas podem apresentar manifestações clínicas distintas e demandam abordagens diagnósticas específicas (Colares, 2018).

O diagnóstico da APLV inclui uma combinação de história clínica esmiuçada e testes específicos. O teste de provocação oral (TPO) é conhecido como o padrão-

ouro para confirmar a alergia, ainda que seja pouco utilizado na prática clínica por causa do risco de reações alérgicas (Dantas et al., 2014).

Além do TPO, testes cutâneos de alergia, como o *prick test*, e dosagem de IgE específica para proteínas do leite são capazes de auxiliar na identificação de sensibilizações alérgicas (Colares, 2018).

Para diagnosticar a intolerância à lactose, são realizados testes que analisam a capacidade do organismo de digerir e absorver a lactose. O teste de tolerância à lactose mensura a resposta glicêmica após ingestão de lactose, ao passo que o teste do hidrogênio expirado identifica a presença de hidrogênio no ar expirado, apontando uma má absorção de lactose (LabNetwork, 2020).

Uma opção mais atual seria o teste genético, que detecta variantes no gene da lactase ligadas à persistência ou redução da atividade enzimática, provendo informações sobre a predisposição individual à intolerância (LabNetwork, 2020).

## REFERÊNCIAS

- COLARES, A. V. Divergências entre os diagnósticos de alergia à proteína do leite de vaca (APLV): uma revisão integrativa. *Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia*, v. 5, n. 15, p. 55–63, 2018. Disponível em: <https://interfaces.unileao.edu.br/index.php/revista-interfaces/article/view/601>. Acesso em: 24/03/2025.
- DANTAS, B. C.; MIRANDA, D. F. de; ARARUNA, L. P. Teste de provocação oral no diagnóstico de alergia à proteína do leite de vaca em crianças: uma revisão integrativa. Universidade Federal de Campina Grande, 2014. Disponível em: <https://bdtd.ufcg.edu.br/jspui/handle/riufcg/21207>. Acesso em: 24/03/2025.
- Embrapa. Melhoramento genético de bovinos permite a produção de leite menos alergênico. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/29569359/cattle-breeding-allows-for-production-of-less-allergenic-milk>. Acesso em: 26/03/2025.
- GAZI, I. et al. Heterogeneity, Fractionation, and Isolation. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)*. Academic Press, 2022.
- LABNETWORK. Teste molecular para detecção de intolerância à lactose. 2020. Disponível em: <https://www.labnetwork.com.br/noticias/teste-molecular-para-deteccao-de-intolerancia-a-lactose/>. Acesso em: 24/03/2025.
- LAMA, M. A. & SILVA, I. T. Milk protein polymorphisms in Brazilian Zebu cattle. *Brazilian Journal of Genetics*, 1997.
- LILY, J. & MULUMEBET, W. Recent perspective on cow's milk allergy and dairy nutrition. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2022.
- LIMA, Tábatta Cristine Chaves de. Polimorfismo no gene da beta-caseína em rebanhos zebuínos leiteiros no Estado do Rio Grande do Norte. 2014. 58f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/22746>. Acesso em: 25/03/2025
- MAYER, H. K. et al. “A2 milk” authentication using isoelectric focusing and different PCR techniques. *Food Research International*, 2021.
- MALUF, V. H. H. K., Lima, T. R. de, Campos, R. A., Soares, I. K. de A., Pereira, H. P., Domingues, R., Reis, D. R. de L., Martins, M. F., Panetto, J. C. do C., Silva, M. V. G. B., & Machado, M. A. (2021). Desenvolvimento de teste de genotipagem em bovinos para o SNP A1/A2 do gene da beta caseína, usando a técnica de tetra-primer ARMS-PCR. *Embrapa Gado de Leite*. Disponível em: <https://www.embrapa.br/gado-de-leite/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1134696/desenvolvimento-de-teste-de-genotipagem-em-bovinos-para-o-snp-a1a2-do-gene-da-beta-caseina-usando-a-tecnica-de-tetra-primer-arms-pcr>. Acesso em: 26/03/2025.
- MONTENEGRO, J. L. et al. Worldwide Research Trends on Milk Containing Only A2  $\beta$ Casein: A Bibliometric Study. *Animals*, 2022.
- PEREIRA, Tuanne Capella. Identificação dos alelos A1 e A2 para o gene da beta caseína na raça Crioula Lageana. 2018. Trabalho de conclusão de curso - UFSC, Graduação em Zootecnia, Florianópolis.
- PRIYADARSHINI, P. et al. Impact of milk protein on human health: A1 verses A2. *International Journal of Chemical Studies*, 2018.
- RAMALHO, Maria Eduarda Oliverio; GANECO, Aline Giampietro. Intolerância à lactose e o processamento dos produtos zero lactose. *Revista Interface Tecnológica*, Taquaritinga, SP, v. 13, n. 1, p. 119–133, jul. 2016. Disponível em: <https://revista.fatectq.edu.br/interfacetecnologica/article/view/130>. Acesso em: 26/03/2025.



- RADOSAVLJEVIĆ, J. et al. Digestomics of Cow's Milk: Short Digestion-Resistant Peptides of Casein Form Functional Complexes by Aggregation. *Foods*, 2020.
- SANTOS, Augusto César Costa dos; PALLONE, Juliana Azevedo Lima. Leite A2: aspectos químicos, bioquímicos, efeitos na saúde e mercado. 2022. Disponível em: <https://downloads.editoracientifica.com.br/articles/230212218.pdf>. Acesso em: 26/03/2025.
- SANTOS, Bruna Mendonça dos. Aspectos genéticos e produtivos do leite A2A2: Revisão de literatura. 2023. Disponível em: <https://dspace.uniceplac.edu.br/bitstream/123456789/2768/1/Bruna%20Mendon%C3%A7a%20dos%20Santos.pdf>. Acesso em: 26/03/2025.
- SEBASTIANI, C. Frequencies Evaluation of  $\beta$ -Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central Italy. *Animals*, 2020.
- SISTEMA FAEP. Melhoramento genético em bovinocultura de leite. Curitiba: FAEP, 2021. Disponível em: <https://www.sistемаfaep.org.br/wp-content/uploads/2021/11/PR.0338-Melhoramento-Genetico-em-Rebanhos-Leiteiros.pdf>. Acesso em: 26/03/2025.
- 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.
- XU LI, G. Beta casein proteins – A comparison between caprine and bovine milk, *Trends in Food Science & Technology*, 2022.
- WANG, X. et al. Comparative proteomic characterization of bovine milk containing  $\beta$ -casein variants A1A1 and A2A2, and their heterozygote A1A2. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020.
- YASMIN, I. et al. Characterization and Comparative Evaluation of Milk Protein Variants from Pakistani Dairy Breeds. *Food Science Animal Resources*, 2020.
- YE, Shankuan; DHILLON, Suchita; KE, Xiayi; TARRANT, Derek; HUMPHRIES, Steve. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 17, p. e88, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11522844/>. Acesso em: 26/03/2025.

## **CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1**

### **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO GENÓTIPO A2A2 EM BOVINOS DE APTIDÃO LEITEIRA DO BRASIL**

Molecular diagnosis of the A2A2 genotype in dairy cattle from Brazil.

**RESUMO** - Dentro do cenário da bovinocultura leiteira mundial e brasileira, a produção de leite possui um papel essencial na nutrição, na economia e no cenário social, onde o leite A2A2 tem se destacado cada vez mais no mercado mundial, principalmente devido aos seus benefícios e impacto nos produtos lácteos em geral. Há algum tempo, o leite A2 vem sendo pesquisado em virtude do seu potencial genético e suas vantagens para a saúde humana, e consequentes menores efeitos adversos em determinadas pessoas. Além de ser uma tendência global que traz benefícios e oportunidades aos produtores e laticínios, tendo um futuro promissor no mercado global com o seu crescimento significativo. Nesta conjuntura, o presente trabalho teve como objetivo relatar a ocorrência do gene A2A2 em bovinos de diversos estados do Brasil, no período de janeiro de 2023 até dezembro de 2024, que tiveram seu material testado para verificação da presença do gene, além de uma breve revisão sobre o tema e subtemas que o circundam, como raças mais predispostas, seleção, diferenças entre alergia à proteína do leite e intolerância à lactose, dentre outras. As raças com maior predisposição genética para o gene A2 estão sendo cada vez mais selecionadas por meio do melhoramento genético e das tecnologias de genotipagem, e consequentemente a procura pela verificação dessa predisposição. O tema exposto nesse trabalho vem para contribuir para futuros estudos sobre esse crescente tema e mercado.

Palavras-chave: Beta caseína. Genotipagem. Girolando. PCR. Proteína.

**ABSTRACT** - Within the context of global and Brazilian dairy cattle farming, milk production plays an essential role in nutrition, the economy, and the social landscape. In this scenario, A2A2 milk has increasingly stood out in the global market, mainly due to its benefits and impact on dairy products in general. For some time now, A2 milk has been the subject of research due to its genetic potential and its advantages for human health, resulting in fewer adverse effects in certain individuals. In addition to being a global trend that brings benefits and opportunities to producers and dairy industries, A2 milk has a promising future in the global market with its significant growth. In this context, the present study aimed to report the occurrence of the A2A2 gene in cattle from various states of Brazil between January 2023 and December 2024. The animals had their genetic material tested to verify the presence of the gene. Additionally, this study includes a brief review of the topic and related subjects, such as the most genetically predisposed breeds, selection processes, differences between milk protein allergy and lactose intolerance, among others. Breeds with a higher genetic predisposition for the A2 gene are increasingly being selected through genetic improvement and genotyping technologies, which has consequently increased the demand for testing this predisposition. The topic addressed in this study aims to contribute to future research on this growing subject and market.

**Keywords:** Beta-casein. Genotyping. Girolando. PCR. Protein.

## INTRODUÇÃO

O leite bovino é um produto de imensa notoriedade nutricional, largamente consumido no Brasil e no mundo. Sua composição é complexa, contendo água, carboidratos (especialmente lactose), proteínas, lipídios, vitaminas e minerais. A quantidade e a qualidade desses elementos podem variar de acordo com diversas causas como a raça do bovino, nutrição, manejo e fatores ambientais.

Pesquisas apontam que a raça do bovino pode influenciar consideravelmente na composição do leite. Tendo como exemplo, a pesquisa de Botaro et al. (2022)

analisou que vacas da raça Jersey possuíam maiores concentrações de gordura no leite (3,97%) quando comparados com as raças Holandesa (3,54%) e Girolando (3,45%). Ainda relatando o mesmo estudo, foi apontado que fatores como o mês de coleta também podem afetar a composição do leite, com alterações nos teores de proteína total e verdadeira ao longo do ano.

A nutrição dos bovinos é outro ponto que pode impactar a qualidade do leite. Conforme Soares e Bezerra (2015), características associadas à alimentação e manejo dos animais podem influenciar a qualidade microbiológica e físico-química do leite, influenciando diretamente sua segurança e valor nutricional. O mesmo estudo destaca a necessidade de fiscalização rigorosa afim de garantir que o leite cumpra aos padrões estabelecidos, evitando riscos à saúde pública ligados ao consumo de leite de baixa qualidade.

A existência de frações proteicas específicas no leite também é pertinente para sua qualidade nutricional. A concentração de nitrogênio ureico no leite é capaz de ser influenciada pela raça do bovino, prejudicando a qualidade do leite e a saúde do animal. Essas frações proteicas executam papéis essenciais na nutrição humana e na funcionalidade tecnológica do leite na indústria alimentícia (Botaro et al., 2022).

Basicamente, a qualidade e a composição do leite bovino são persuadidas por múltiplos fatores, incluindo genética, alimentação, manejo e conformidade com regulamentações sanitárias. O entendimento desses aspectos é essencial para a produção de leite seguro e nutritivo, respondendo às necessidades dos consumidores e às exigências do mercado.

A beta-caseína é uma das principais proteínas do leite bovino, possuindo variantes genéticas que são capazes de mutar a qualidade do leite e seus efeitos na saúde humana. As variantes mais habituais são A1 e A2, que divergem por uma substituição de aminoácido na posição 67 da cadeia polipeptídica. Essa diferenciação pode influenciar na digestibilidade e na resposta do organismo frente ao consumo do leite (Pereira, 2018).

Pesquisas apontam que a digestão da beta-caseína A1 pode ocasionar a formação do peptídeo beta-casomorfina-7 (BCM-7), correlacionado com os desconfortos gastrointestinais e outros efeitos adversos para a saúde. Em contrapartida, a variante A2 não gera BCM-7 durante a digestão, vista como potencialmente menos propensa a causar tais reações adversas (Xu li et al., 2022).

A manifestação dos alelos A1 e A2 varia entre as raças bovinas. Raças zebuínas, como Sindi, Gir Leiteiro, Gir, Girolando e Guzerá, exibem uma maior predominância do alelo A2. A título de exemplo, um estudo brasileiro descobriu que a frequência do alelo A2 em animais da raça Guzerá foi de 97%, e na raça Gir, de 98%. Esses resultados apontam o potencial genético dessas raças para a produção de leite A2 (Lima, 2014).

A definição dos genótipos A1 e A2 é executada por meio de técnicas de genotipagem. A metodologia tetra-primer ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction), permite a diferenciação dos alelos A1 e A2 de forma fácil e econômica, composta por apenas uma única reação de PCR (reação em cadeia de polimerase) seguida de eletroforese. Essa técnica tem sido abrangentemente utilizada por criadores e programas de melhoramento genético objetivando à produção de animais com genótipo A2A2 (Maluf et al., 2021).

Ademais, estudos têm analisado meios inovadores para a detecção dos genótipos da beta-caseína, inclusive técnicas cromatográficas, peptídeos miméticos e bioeletrodos. Esses métodos visam aprimorar a precisão e a eficiência na identificação dos genótipos A1 e A2, auxiliando para a seleção genética e a qualidade do leite produzido (Pereira, 2018).

A seleção de bovinos para a produção de leite A2 abrange a identificação e reprodução de animais com o genótipo A2A2, intencionando atender à demanda por produtos lácteos com menor potencial alergênico. Para atingir esse objetivo, é primordial realizar a genotipagem tanto de touros quanto de vacas, assegurando que ambos os pais possuam e possam transmitir o alelo A2 para a progênie (Embrapa, 2021).

A genotipagem é executada através da coleta de amostras biológicas, como sangue ou pelo que são encaminhadas para laboratórios especializados em determinar o gene predominante desses animais (Embrapa, 2021).

Com os resultados em mãos, os produtores são capazes de planejar cruzamentos estratégicos, fazendo uso de sêmens de touros A2A2 para inseminar vacas com genótipos compatíveis, garantindo a predominância do alelo A2 na descendência (Embrapa, 2021).

Face ao exposto, objetivou-se avaliar a ocorrência de bovinos com o gene A2A2 em diversas regiões do Brasil, usando dados do período de janeiro de 2023 até dezembro de 2024.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram analisados e catalogados os resultados de amostras de bovinos testadas para definição do gene, ou seja, determinar se o animal seria A1A1, A2A2 ou A2A1. Essas amostras foram obtidas através de uma parceria com um laboratório da região do centro-oeste do Brasil, especializado em DNA e beta caseína. O mesmo recebe amostras de todo o Brasil, portanto os resultados são de inúmeros regiões do Brasil, de fêmeas e machos.

O valor do exame, no estabelecimento fornecedor dos dados, para a determinação do gene de cada animal, no período em que foram recebidas e processadas pelo laboratório, era de R\$49,90 por amostra, em uma rotina normal, onde o estabelecimento entrega o resultado e 7 dias úteis, porém o mesmo possui também a rotina de urgência com entrega do resultado em 3 dias úteis, que na época abordada era no valor de R\$99,80, qual rotina será adotada, depende da necessidade do cliente e solicitação do mesmo. Porém o processo para ambas as rotinas é o mesmo, só alterando a agilidade com que cada etapa deve ser realizada.

O laboratório segue um POP (Procedimento Operacional Padrão) para cada setor, a elaboração, execução e fiscalização é realizada pelo setor de qualidade do laboratório, afim de manter a integridade, rastreabilidade e legibilidade de cada procedimento realizado dentro do ambiente.

Os materiais são recebidos na recepção do laboratório, seja via correios, transportadoras, serviços de motoboys, ou entregues em mãos pelos próprios clientes. As amostras são recebidas e armazenadas em um armário específico para que no dia seguinte possa se realizar a contabilização e organização de todas as amostras recebidas no dia anterior, para que então, as mesmas possam ir para a rotina.

São contabilizadas e registradas, com data, nome do proprietário e tipo de exame solicitado. Após, vão para um armário com tranca, onde somente uma responsável pelo recebimento, pode realizar a atribuição de qual funcionário irá realizar o próximo passo.

Após recebidas, contabilizadas e armazenadas, as amostras vão para a próxima etapa, a de cadastro, onde uma funcionária realiza a conferência dos dados do proprietário e das amostras, para então poder iniciar o processo de cadastro. São necessários alguns dados básicos do proprietário (nome completo, RG, CPF,

endereço completo com CEP, nome da propriedade, telefone e e-mail para contato) e os dados das amostras recebidas.

Se tratando de amostra de pelo, cada uma vem armazenadas em um envelope de papel (para evitar contaminação das mesmas, por umidade), o envelope deve estar devidamente identificado, com o RG do animal, nome, data de nascimento, raça e sexo. Para amostras de sêmen ou sangue, devem também vir armazenadas nos tubos específicos para cada tipo, e com as mesmas identificações das amostras de pelo.

Após a identificação dos dados, o cadastro pode ser realizado, e cada amostra recebe uma identificação única, o número de amostra, que vem acompanhado de um código de barras para poder ser rastreado nas outras áreas.

Assim que cadastradas e identificadas com o número de amostra correspondente, vão para o processo de triagem, onde são bipadas, cortadas, e seguem para o processo de extração, após extraídas, vão para a amplificação e posterior sequenciamento. Após sequenciadas, podem ter seus resultados obtidos e ter a leitura realizada através do eletroferograma.

Essas amostras foram genotipadas para o gene da beta caseína pelos métodos de PCR por real-time, em específico para a região rs43703011, que é um polimorfismo do DNA (SNP) que permite distinguir o alelo CSN2\*A2 da proteína da  $\beta$ -caseína. Ele está localizado no eixo 7 do gene CSN2, no GenBank ID M55158.1. Essa genotipagem foi realizada com metodologia de PCR por real-time e técnica in house, com sonda específica para essa região de RS, com reagentes da TaqPath®, da Thermo Fisher Scientific®, no equipamento QuantStudio 1®. Por se tratar de uma técnica in house, a descrição das etapas, reagentes e quantitativo utilizado pelo laboratório fica censurada pelo contrato de confidencialidade.

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) é uma técnica molecular amplamente utilizada para a detecção e quantificação de variantes genéticas da beta-caseína em bovinos. Essa metodologia permite identificar com precisão as variantes A1 e A2 da beta-caseína, que diferem por uma única substituição de nucleotídeo, resultando em uma troca de aminoácido na posição 67 da proteína (Maluf et al., 2021).

O gene da beta-caseína (CSN2) é altamente polimórfico, com 12 variantes identificadas, sendo A1 e A2 as mais comuns. A técnica de qPCR, especialmente quando combinada com métodos como o tetra-primer ARMS-PCR, tem se mostrado eficaz na genotipagem dessas variantes, oferecendo uma abordagem simples e

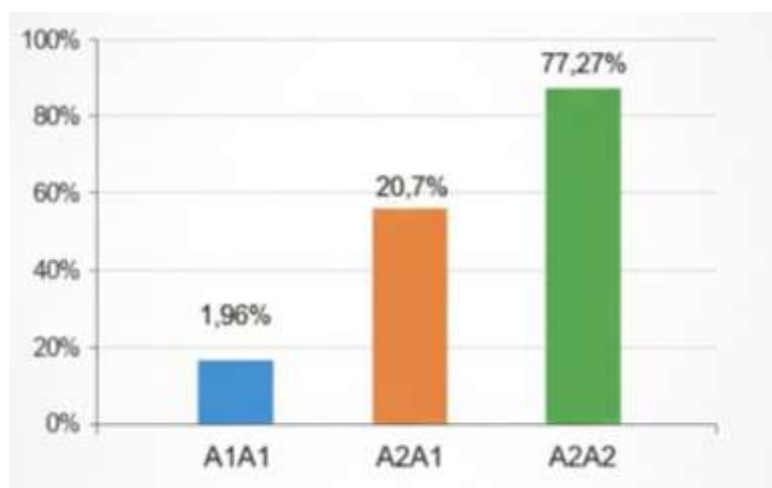
econômica para diferenciar os alelos A1 e A2 em uma única reação (Maluf et al., 2021).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas um total de 12.312 amostras de bovinos, recebidas e analisadas pelo laboratório no período de janeiro de 2023 até dezembro de 2024 para definição de quais animais portavam o gene A1A1, A2A1 e A2A2, investigando a região rs43703011.

Dentre as 12.312 amostras, o genótipo A1A1 obteve 242 animais positivos (1,96%), A2A1 com 2.557 animais positivos (20,7%) e A2A2 com 9.513 animais positivos (77,27%), segue gráfico abaixo.

**Gráfico 1 – Distribuição dos genótipos da beta caseína**

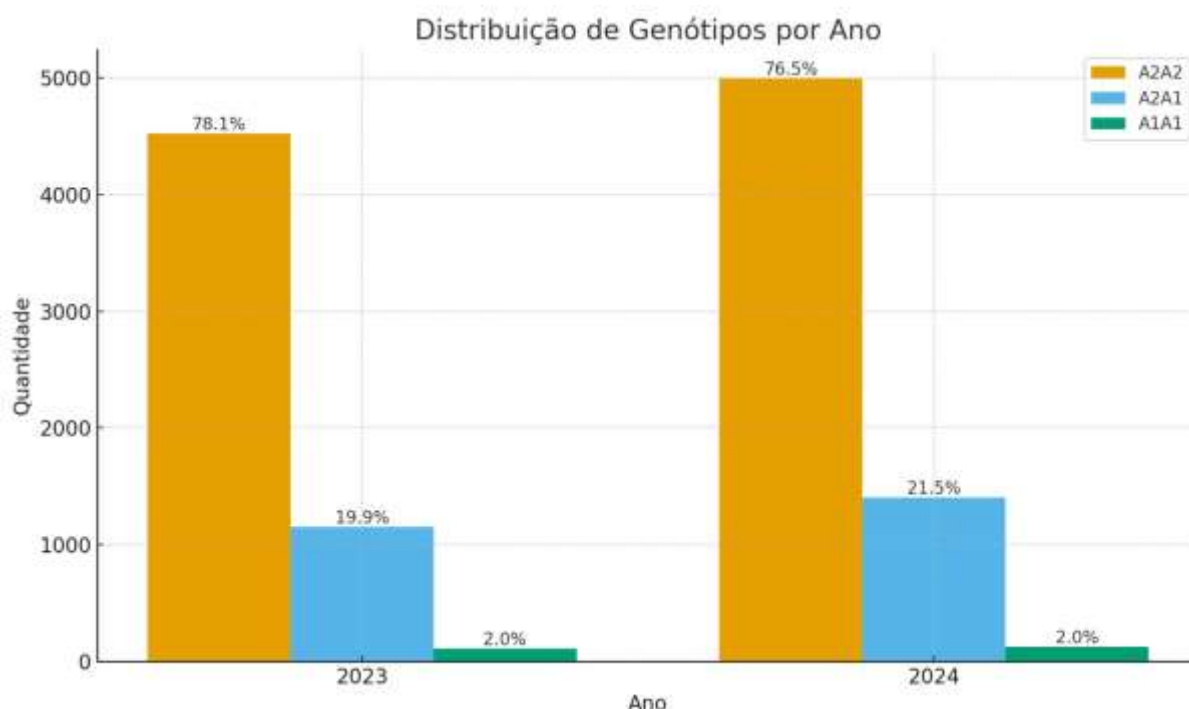


Fonte: elaboração própria, 2025.

A1A1 (azul): Representa os animais homozigotos para o alelo A1, que são 1,96% da população pesquisada. A2A1 (laranja): Refere-se aos heterozigotos, que possuem um alelo A1 e um alelo A2, representando apenas 20,7% da população pesquisada. A2A2 (verde): Representa os animais homozigotos para o alelo A2, que são a maioria da população analisada, com 77,27%.

Dentre as 12.312 amostras, 5.787 foram recebidas e analisadas no ano de 2023, onde o genótipo A1A1 obteve 113 animais positivos (2,0%), A2A1 com 1.153 animais positivos (19,9%) e A2A2 com 4.521 animais positivos (78,1%). E no ano de 2024 foram recebidas e analisadas 6.525 amostras, em que o genótipo A1A1 obteve 129 animais positivos (2,0%), A2A1 com 1.404 animais positivos (21,5%) e A2A2 com 4.992 animais obtidos (76,5%), segue gráfico abaixo.



**Gráfico 2 – Distribuição dos genótipos da beta caseína nos anos de 2023 e 2024**

Fonte: elaboração própria, 2025.

A1A1: Representado pela cor verde. A2A1: Representado pela cor azul. A2A2: Representado pela cor laranja.

A análise das 12.312 amostras revelou uma predominância significativa do genótipo A2A2, representando 77,27% da população, seguido pelo genótipo A2A1, com 20,7%, e, por último, o genótipo A1A1, presente em apenas 1,96% dos animais. Esses dados indicam que a frequência do alelo A2 é muito superior à do alelo A1, sugerindo que os rebanhos analisados já passaram por uma seleção genética direcionada à produção de leite A2. Esse resultado pode estar relacionado à crescente demanda por leite A2 no mercado, impulsionando a escolha de reprodutores com o genótipo A2A2.

Dentre as 12.312 amostras recebidas, foram analisadas diversas raças, como Brahman, Girolando, Gir e até mesmo Nelore, Caracu e demais. Foi possível verificar uma alta nas amostras das raças Girolando (7.267 animais), Gir (2.803 animais) e Sindi (1.413 animais), como pode-se observar na tabela abaixo, onde pode ser encontrado todas as raças das amostras recebidas e o respectivo quantitativo de cada uma.

**Quadro 1 – raças das amostras recebidas e quantitativo de cada uma**

Raça	Quantidade
BRAHMAN	13
CARACU	57
CRUZADAS	5
GIR	2803
GIROLANDO	7267
GIRSHYRE	1
GUZERA	195
GUZERA X HOLANDES	1
GUZERA X JERSEY	131
GUZOLANDO	62
HOLANDES	38
INDUBRASIL	1
JERSEY	11
JERSOLANDO	66
MONTBELIARD	4
NELORE	84
SINDI	1413
SINDOLANDO	4
SINJER	3
SEM RAÇA DEFINIDA	153

Fonte: elaboração própria, 2025.

Também foi possível identificar as regiões oriundas de onde cada amostra, tendo maior recebimento de amostras da região de Bom Despacho – Minas Gerais com 671 amostras e Unaí – Minas Gerais também com 671 amostras, porém recebendo de várias localidades do Brasil todo, segue abaixo tabela com identificação de todos os locais de onde foram enviadas as amostras e o quantitativo de cada.

**Quadro 2 – localidade de saída das amostras e quantitativo de cada uma**

ANDRELANDIA – MINAS GERAIS	14
APARECIDA DE GOIANIA – GOIÁS	14
ARAGUAINA – TOCANTINS	119
ARARAS – SÃO PAULO	83
BARRA DO PIRAI – RIO DE JANEIRO	92
BELA VISTA DE GOIÁS - GOIÁS	50
BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS	402
BOM DESPACHO – MINAS GERAIS	671
BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL	10
CAMPINA GRANDE – PARAÍBA	1

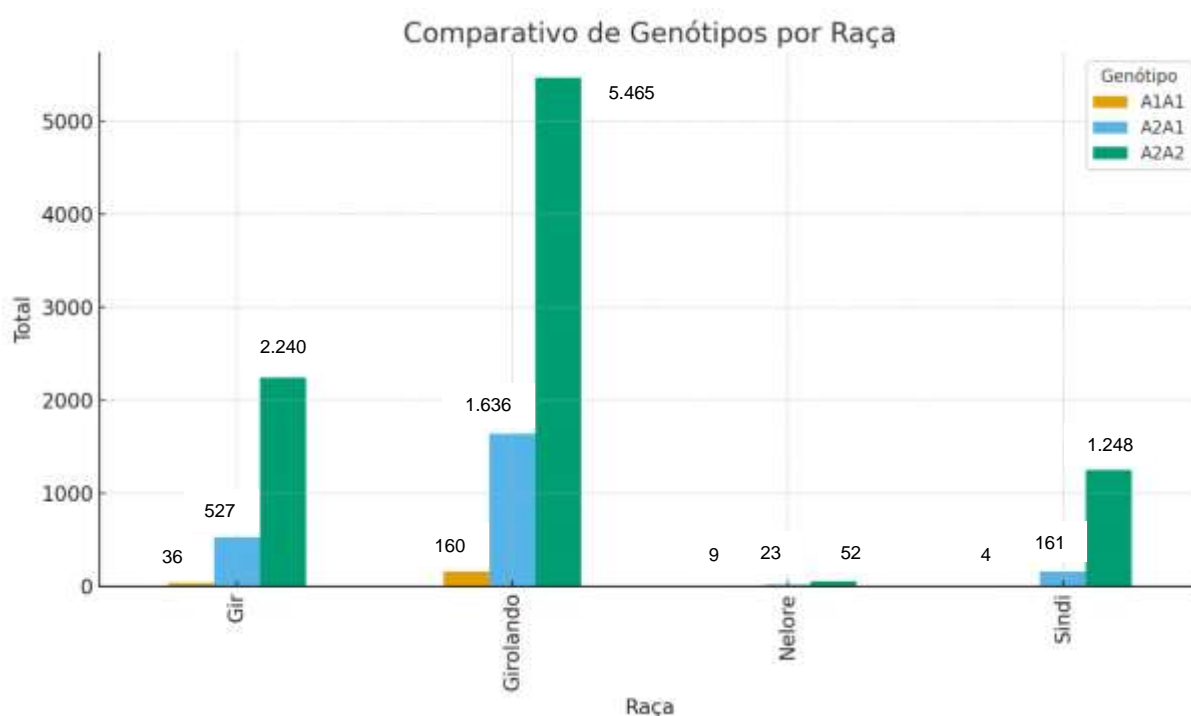
CAMPO GRANDE – MATO GROSSO DO SUL	49
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RIO DE JANEIRO	183
CARAMBEÍ - PARANÁ	189
CARATINGA – MINAS GERAIS	5
CARMO DO PARANAÍBA – MINAS GERAIS	37
CASTRO – PARANÁ	368
CIDADE DE GOIÁS – GOIÁS	103
CONTAGEM – MINAS GERAIS	93
COROMANDEL – MINAS GERAIS	1
CORRENTE – PIAUÍ	127
CRISTIANÓPOLIS – GOIÁS	231
CUIABÁ - MATO GROSSO	92
CUIABA – MATO GROSSO	104
DESCALVADO – SÃO PAULO	97
DORES DO INDAIÁ – MINAS GERAIS	7
DOURADOS – MATO GROSSO DO SUL	84
FEIRA DE SANTANA - BAHIA	122
FLORES DE GOIÁS – GOIÁS	318
GOIÂNIA – GOIÁS	55
GOVERNADOR VALADARES – MINAS GERAIS	36
GUANHÃES – MINAS GERAIS	24
GUARIBA – SÃO PAULO	206
GUAXUPÉ – MINAS GERAIS	49
HIDROLÂNDIA - GOIÁS	39
HIDROLINA - GOIÁS	49
ICONHA – ESPÍRITO SANTO	3
IMPERATRIZ – MARANHÃO	236
INHUMAS – GOIÁS	109
ITABERAÍ – GOIÁS	51
ITAPETINGA – BAHIA	23
ITUIUTABA – MINAS GERAIS	71
JARU – RONDÔNIA	123
JUARA – MATO GROSSO	15
JUIZ DE FORA - MINAS GERAIS	291
JUSSARA – GOIÁS	35
LAGOA FORMOSA - MINAS GERAIS	152
LEOPOLDINA – MINAS GERAIS	267
LINS – SÃO PAULO	90
LONDRINA - PARANÁ	105
MACEIÓ - ALAGOAS	118
MANAUS - AMAZONAS	308
MARANGUAPE – CEÁRA	183

MUNIZ FREIRE – ESPÍRITO SANTO	81
MURIAÉ – MINAS GERAIS	8
NOVA IGUAÇU – RIO DE JANEIRO	7
ORIZONA - GOIÁS	146
PARÁ DE MINAS – MINAS GERAIS	261
PATOS DE MINAS - MINAS GERAIS	215
PATROCÍNIO - MINAS GERAIS	363
PATROCINIO PAULISTA – SÃO PAULO	2
PETRÓPOLIS - RIO DE JANEIRO	6
PETROPÓLIS – RIO JANEIRO	115
PIRACANJUBA – GOIÁS	92
PIRENÓPOLIS – GOIÁS	24
POMPEU – MINAS GERAIS	293
PONTA PORÃ – MATO GROSSO DO SUL	73
PONTES E LACERDA – MATO GROSSO	5
PORTO VELHO – RONDÔNIA	126
REDENÇÃO – PARÁ	165
RIBEIRÃO PRETO – SÃO PAULO	121
RIO BRANCO - ACRE	123
RIO DE JANEIRO CAPITAL	94
SANTA ROSA – RIO GRANDE DO SUL	94
SANTA TEREZA – ESPÍRITO SANTO	128
SANTO ANTÔNIO DA ALEGRIA – SÃO PAULO	307
SANTO ANTÔNIO DO MONTE – MINAS GERAIS	276
SANTO CRISTO – RIO GRANDE DO SUL	188
SÃO FÉLIX - BAHIA	3
SÃO LUÍS DE MONTES BELOS - GOIÁS	213
SÃO PAULO CAPITAL	158
SILVÂNIA - GOIÁS	214
TERENOS – MATO GROSSO DO SUL	156
UBERABA – MINAS GERAIS	268
UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS	252
UNAÍ - MINAS GERAIS	671
VALE DO PARAÍBA – SÃO PAULO	111
VALENCIA – RIO DE JANEIRO	175
VIANÓPOLIS – GOIÁS	85
VITORIA DA CONQUISTA - BAHIA	194
XANXERÊ – SANTA CATARINA	111
<b>Total geral</b>	<b>12302</b>

Fonte: elaboração própria, 2025.

Em relação aos genótipos obtidos por cada raça e suas equivalências, foi possível observar um grande número de animais A2A2 nas raças Girolando e Gir, conforme é possível observar na abaixo, onde também podemos ver o quantitativo dos genótipos nos animais Nelore e Sindi.

**Gráfico 3 – Comparativo dos genótipos da beta caseína nas raças Girolando, Gir, Sindi e Nelore**



Fonte: elaboração própria, 2025.

Apresentação do quantitativo dos resultados obtidos para as raças Gir, Girolando, Sindi e Nelore.

Onde a cor laranja representa os genótipos A1A1, a cor azul representa os genótipos A2A1 e a cor verde representa os genótipos A2A2.

Os animais da raça Girolando testados obtiveram um total de 5.465 animais com genótipo A2A2, 1.636 animais com genótipo A2A1 e 160 animais com o genótipo A1A1. Nos animais testados da raça Gir, encontrou-se 2.240 animais com o genótipo A2A2, 527 animais com o genótipo A2A1 e 36 animais com o genótipo A1A1. Já nos animais testados da raça Sindi, 1.248 animais com o genótipo A2A2, 161 animais com o genótipo A2A1 e 4 animais com o genótipo A1A1.

Quando se fala de animais com aptidão para a bovinocultura leiteira, encontra-se essa tendência de um maior número de animais com o genótipo A2A2, devido aos

programas de melhoramento genético e até mesmo do querer do criador em trazer essa genética para o seu rebanho.

Mas algo que chama atenção também é que essa genética já está sendo passada para raças com aptidão principal para a bovinocultura de corte, como podemos observar em uma parte dos dados analisados, onde encontra-se animais da raça Nelore. Nesses dados, 84 animais eram dessa raça, onde, 52 animais possuem o genótipo A2A2, 23 animais com o genótipo A2A1 e 9 animais com o genótipo A1A1.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos demonstram uma forte prevalência do genótipo A2A2 nas amostras analisadas, indicando que grande parte dos rebanhos avaliados já apresenta um avanço significativo em direção à produção de leite composto exclusivamente pela variante A2 da  $\beta$ -caseína. Esse cenário reflete não apenas o impacto de programas de melhoramento genético e de estratégias reprodutivas direcionadas, mas também a crescente conscientização dos produtores sobre as demandas do mercado e os potenciais benefícios associados ao leite A2.

As raças zebuínas e compostas, especialmente Girolando, Gir e Sindi, confirmaram sua reconhecida predisposição ao alelo A2, apresentando elevadas frequências do genótipo A2A2. Observou-se, ainda, que essa tendência começa a se manifestar também em raças tradicionalmente destinadas ao corte, como o Nelore, evidenciando que a seleção para esse gene vem se difundindo além dos rebanhos estritamente leiteiros.

A amplitude geográfica das amostras recebidas, provenientes de diversos estados brasileiros, reforça que o interesse pela genotipagem da beta-caseína e pela produção de leite A2A2 está disseminado nacionalmente, consolidando-se como um mercado em expansão. Dessa forma, o estudo contribui para ampliar o conhecimento sobre a distribuição do genótipo A2A2 no Brasil e evidencia o potencial de crescimento desse nicho produtivo, tanto no âmbito científico quanto no econômico.

## REFERÊNCIAS

- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, New York, v. 25, n.2, p.169-93, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11013345>.> Acesso em: 26/03/2025
- COLARES, A. V. Divergências entre os diagnósticos de alergia à proteína do leite de vaca (APLV): uma revisão integrativa. *Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia*, v. 5, n. 15, p. 55–63, 2018. Disponível em: <<https://interfaces.unileao.edu.br/index.php/revista-interfaces/article/view/601>.> Acesso em: 24/03/2025.
- DANTAS, B. C.; MIRANDA, D. F. de; ARARUNA, L. P. Teste de provocação oral no diagnóstico de alergia à proteína do leite de vaca em crianças: uma revisão integrativa. Universidade Federal de Campina Grande, 2014. Disponível em: <<https://bdtd.ufcg.edu.br/jspui/handle/riufcg/21207>.> Acesso em: 24/03/2025.
- Embrapa. Melhoramento genético de bovinos permite a produção de leite menos alergênico. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/29569359/cattle-breeding-allows-for-production-of-less-allergenic-milk>.> Acesso em: 26/03/2025.
- GAZI, I. et al. Heterogeneity, Fractionation, and Isolation. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Third Edition). Academic Press, 2022.
- LABNETWORK. Teste molecular para detecção de intolerância à lactose. 2020. Disponível em: <<https://www.labnetwork.com.br/noticias/teste-molecular-para-deteccao-de-intolerancia-a-lactose/>.> Acesso em: 24/03/2025.
- LAMA, M. A. & SILVA, I. T. Milk protein polymorphisms in Brazilian Zebu cattle. *Brazilian Journal of Genetics*, 1997.
- LILY, J. & MULUMEBET, W. Recent perspective on cow's milk allergy and dairy nutrition. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2022.
- LIMA, Tábatta Cristine Chaves de. Polimorfismo no gene da beta-caseína em rebanhos zebuínos leiteiros no Estado do Rio Grande do Norte. 2014. 58f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. Disponível em: <<https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/22746>.> Acesso em: 25/03/2025
- MAYER, H. K. et al. “A2 milk” authentication using isoelectric focusing and different PCR techniques. *Food Research International*, 2021.

MALUF, V. H. H. K., Lima, T. R. de, Campos, R. A., Soares, I. K. de A., Pereira, H. P., Domingues, R., Reis, D. R. de L., Martins, M. F., Panetto, J. C. do C., Silva, M. V. G. B., & Machado, M. A. (2021). Desenvolvimento de teste de genotipagem em bovinos para o SNP A1/A2 do gene da beta caseína, usando a técnica de tetra-primer ARMS-PCR. Embrapa Gado de Leite. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/gado-de-leite/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1134696/desenvolvimento-de-teste-de-genotipagem-em-bovinos-para-o-snp-a1a2-do-gene-da-beta-caseina-usando-a-tecnica-de-tetra-primer-arms-pcr>> Acesso em: 26/03/2025.

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

PEREIRA, Tuanne Capella. Identificação dos alelos A1 e A2 para o gene da beta caseína na raça Crioula Lageana. 2018. Trabalho de conclusão de curso - UFSC, Graduação em Zootecnia, Florianópolis.

PETERS, I. R. et al. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *Journal of immunological methods*, Amsterdam, v. 286, n. 1-2, p. 203-17, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087233>> Acesso em: 26/03/2025.

PRIYADARSHINI, P. et al. Impact of milk protein on human health: A1 verses A2. *International Journal of Chemical Studies*, 2018.

RAMALHO, Maria Eduarda Oliverio; GANECO, Aline Giampietro. Intolerância à lactose e o processamento dos produtos zero lactose. *Revista Interface Tecnológica*, Taquaritinga, SP, v. 13, n. 1, p. 119–133, jul. 2016. Disponível em: <<https://revista.fatectq.edu.br/interfacetecnologica/article/view/130>> Acesso em: 26/03/2025.

RADOSAVLJEVIĆ, J. et al. Digestomics of Cow's Milk: Short Digestion-Resistant Peptides of Casein Form Functional Complexes by Aggregation. *Foods*, 2020.

SANTOS, Augusto César Costa dos; PALLONE, Juliana Azevedo Lima. Leite A2: aspectos químicos, bioquímicos, efeitos na saúde e mercado. 2022. Disponível em: <<https://downloads.editoracientifica.com.br/articles/230212218.pdf>> Acesso em: 26/03/2025.

SANTOS, Bruna Mendonça dos. Aspectos genéticos e produtivos do leite A2A2: Revisão de literatura. 2023. Disponível em: <<https://dspace.uniceplac.edu.br/bitstream/123456789/2768/1/Bruna%20Mendon%C3%A7a%20dos%20Santos.pdf>> Acesso em: 26/03/2025.



SEBASTIANI, C. Frequencies Evaluation of  $\beta$ -Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central Italy. *Animals*, 2020.

SISTEMA FAEP. Melhoramento genético em bovinocultura de leite. Curitiba: FAEP, 2021. Disponível em: <<https://www.sistemafaep.org.br/wp-content/uploads/2021/11/PR.0338-Melhoramento-Genetico-em-Rebanhos-Leiteiros.pdf>> Acesso em: 26/03/2025.

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.

XU LI, G. Beta casein proteins – A comparison between caprine and bovine milk, *Trends in Food Science & Technology*, 2022.

WANG, X. et al. Comparative proteomic characterization of bovine milk containing  $\beta$ -casein variants A1A1 and A2A2, and their heterozygote A1A2. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020.

YASMIN, I. et al. Characterization and Comparative Evaluation of Milk Protein Variants from Pakistani Dairy Breeds. *Food Science Animal Resources*, 2020.

YE, Shankuan; DHILLON, Suchita; KE, Xiayi; TARRANT, Derek; HUMPHRIES, Steve. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 17, p. e88, 2001. <Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11522844/>> Acesso em: 26/03/2025.

### **CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo permitiu uma análise abrangente sobre o gene A2A2 em bovinos de diferentes regiões do Brasil, oferecendo um panorama atualizado sobre a sua ocorrência em rebanhos leiteiros e, em menor escala, de corte. A revisão bibliográfica realizada demonstrou a relevância crescente do leite A2 no cenário mundial, impulsionada por fatores nutricionais, digestivos e de mercado. Além disso, evidenciou-se que o avanço das técnicas moleculares de genotipagem tem facilitado significativamente a identificação das variantes da  $\beta$ -caseína, contribuindo para o direcionamento de programas de melhoramento genético.

Os resultados laboratoriais apresentados contemplaram mais de doze mil amostras analisadas entre 2023 e 2024, revelando uma predominância marcante do genótipo A2A2 na população estudada. Esse achado confirma que muitos produtores brasileiros já investem ativamente na seleção de animais com o alelo A2, alinhando-se às demandas do mercado consumidor e às tendências da cadeia produtiva de leite.

O estudo também destacou a forte presença do alelo A2 em raças zebuínas e compostas, reforçando o papel dessas populações como base genética estratégica para a expansão da produção de leite A2 no país. Ademais, a grande variedade de estados e municípios de onde foram enviadas amostras demonstra que o interesse pela genotipagem está amplamente difundido em nível nacional.

Dessa forma, conclui-se que o Brasil possui um potencial expressivo para ampliar a oferta de leite A2A2, atendendo às exigências do mercado interno e externo. Os dados aqui apresentados servem como suporte relevante para pesquisas futuras e para o desenvolvimento de políticas e estratégias de seleção genética que visem aumentar a competitividade da cadeia leiteira brasileira. Espera-se que este trabalho contribua significativamente para a área de genética bovina, oferecendo informações práticas, atualizadas e aplicáveis ao setor produtivo.