

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DANIELLE DE CÁSSIA MARTINS DA FONSECA

Estudo dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína sobre a produção, composição e frações proteicas do leite de vacas da raça Holandesa

Pirassununga

2023

DANIELLE DE CÁSSIA MARTINS DA FONSECA

Estudo dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína sobre a produção, composição e frações proteicas do leite de vacas da raça Holandesa

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal

Pirassununga

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P676e Fonseca, Danielle de Cássia Martins da
Estudo dos alelos A1 e A2 para o gene da b-
caseína sobre a produção, composição e frações
proteicas do leite de vacas da raça Holandesa /
Danielle de Cássia Martins da Fonseca ;
orientadora Ana Maria Centola Vidal. --
Pirassununga, 2023.
160 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia
de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Abundância. 2. Genótipos. 3. Metabolismo. 4.
Proteoma. I. Vidal, Ana Maria Centola, orient. II.
Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Danielle de Cássia Martins da Fonseca

Título: **Estudo dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína sobre a produção, composição e frações proteicas do leite de vacas da raça Holandesa**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Data da Aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra.: Ana Maria Centola Vidal
FZEA / USP (Orientador(a) / Presidente)

Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro
FMVZ/ USP (Membro Titular 2)

Prof. Dr. José Esler de Freitas Júnior
UFBA (Membro Titular 3)

Profa. Dra. Bruna Maria Salotti de Souza
UFMG (Membro Titular 4)

Profa. Dra. Polyana Pizzi Rotta
UFV (Membro Titular 5)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Perfil proteico e proteoma de leite com genótipos contrastantes para o gene da beta-caseína e verificação da ação proteolítica do *Bacillus cereus* s.s. e *Pseudomonas fluorescens* e de tratamentos tecnológicos aplicados ao leite sobre a produção da beta-casomorfina-7.", protocolada sob o CEUA nº 9431111019 (10 001407), sob a responsabilidade de **Ana Maria Centola Vidal e equipe; Danielle de Cássia Martins da Fonseca; Elizangela Domenis Marino; Alenía Naiato Vasconcellos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 28/01/2020.

We certify that the proposal "Protein and protein profile of milk with contrasting genotypes for the beta-casein gene and verification of the proteolytic action of *Bacillus cereus* s.s. and *Pseudomonas fluorescent* and technological controls applied to milk on the production of beta-casomorphine-7.", utilizing 15 Bovines (15 females), protocol number CEUA 9431111019 (10 001407), under the responsibility of **Ana Maria Centola Vidal and team; Danielle de Cássia Martins da Fonseca; Elizangela Domenis Marino; Alenía Naiato Vasconcellos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 01/28/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2020** a **07/2022**

Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 5 anos**

N: **15**

Linhagem: **Holandesa P.O**

Peso: **450 a 500 kg**

Local do experimento: **Ainda não há informações**

Pirassununga, 02 de fevereiro de 2022

Prof. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra aos meus pais Marlene Martins da Fonseca (*in memoriam*) e Linor de Jesus Lima da Fonseca e ao meu irmão Danilo Martins da Fonseca. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, saúde, fé, inteligência e perseverança para conquistar essa vitória da minha vida pessoal e profissional.

Agradeço também a Deus por ter me concedido o merecimento de conviver em uma família estruturada, em um lar repleto de união e felicidade. Agradeço a aquela que me concebeu, minha querida, amada e jamais esquecida mãe Marlene Fonseca por seu amor, carinho e dedicação incansável em educar seus filhos. Agradeço ao meu pai amado, querido e amigo inseparável, Linor Fonseca que com suas palavras encorajadoras e ensinamentos sinceros que fizeram eu nunca desistir de aprender e de acreditar nas minhas capacidades. Agradeço ao meu irmão Danilo Fonseca, companheiro fiel, fonte de inspiração, de dedicação e de responsabilidade com os estudos e afazeres.

Agradeço aos meus amigos e familiares que embora distantes emanam boas energias e vibrações para meu crescimento e sucesso.

Agradeço a professora Ana Maria Centola Vidal que me concedeu a oportunidade de participar do processo seletivo do programa de Pós-Graduação em Zootecnia a nível de doutorado, me aceitou como orientada e membro do Laboratório de Qualidade de Produtos de Origem Animal (Quali-POA FZEA / USP). Obrigada professora por todos os ensinamentos. A senhora é minha fonte de inspiração profissional!

Agradeço aos pós-graduandos, mestres e doutores (Alenia, Elizangela, José, Joyce, Luisa, Marta e Thais), técnica (Andréia) e aos estagiários do Quali-POA pela acolhida, amizade, carinho, convivência, descontração e silêncio durante esses anos. Sentirei saudade de todos!

Agradeço em especial a biomédica Mirele Daiana Poleti por toda paciência, comprometimento e suporte durante a condução do projeto e experimento. Obrigada por tudo e sucesso!

Agradeço a Messy Hannear de Andrade Pantoja, minha conterrânea e contemporânea dos cursos de graduação e doutorado. Obrigada pela companhia e parceria de sempre, atravessando as madrugadas em claro e por motivos diversos. Foram muitas risadas juntas, gratidão!

Agradeço as amigas que fiz dentro da Universidade, junto aos companheiros de caminhada com quem pude trocar das mais diversas experiências pessoais e profissionais, levarei comigo boas recordações de todos vocês!

Agradeço também a equipe do serviço de pós-graduação por serem tão solícitos e práticos na tentativa de amenizar a vida dos pós-graduandos.

Agradeço aos professores Arlindo Saran Netto, Cristiane Titto, Miguel Santana por terem sido meus supervisores durante o estágio de docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino e aos professores Júlio Balieiro, Francisco Rennó e Marcos Veiga por todos os conhecimentos compartilhados.

Agradeço também aos técnicos e funcionários da Fazenda Santa Rita, pertencente a Agropecuária Agrindus S.A., em especial ao médico veterinário Guilherme Scheis e a Flaviani Zanetti que estavam sempre dispostos em me receber, sanar minhas dúvidas e acatar os meus pedidos.

Agradeço às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (nº do processo: 2019/09583-5) concedido ao projeto. O presente estudo foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo pela estrutura física e corpo docente, imprescindíveis na minha formação.

Foi por estar sobre os ombros de gigantes como vocês que eu vim mais longe.

EPÍGRAFE

“Tudo que é bom de passar é ruim de contar. E tudo que é ruim de passar é bom de contar”.

Ariano Suassuna

RESUMO

FONSECA, D. C. M. 2023. **Estudo dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína sobre a produção, composição e frações proteicas do leite de vacas da raça Holandesa.** [Study of the A1 and A2 alleles for the β -casein gene on the production, composition and protein fractions of milk from Holstein cows]. 2023. 160 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

O objetivo do presente foi estudar os desdobramentos polimórficos dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína em vacas da raça Holandesa submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais, sobre metabólitos (energéticos, enzimáticos e nitrogenados), composição do leite, contagem de células somáticas, média de produção de leite diária e dias em lactação e estudar o polimorfismo dos alelos A1 e A2 sobre as frações de caseína e proteínas séricas e correlacioná-las com características fenotípicas. Foram utilizadas 18 vacas da raça Holandesa dos três genótipos (6 A1A1; 6 A1A2; 6 A2A2) e as coletas de leite ocorreram durante a ordenha, as de sangue ocorreram por punção da artéria ou veia coccígea e as de urina mediante micção espontânea ou provocada por estímulos com massagens na região perivulvar. Para o estudo das características fenotípicas, foram determinados metabólitos (energético, enzimáticos e nitrogenados) no leite, sangue e urina, que foram realizados por meio das concentrações de glicose, gama glutamil transferase, aspartato amino transferase, uréia e nitrogênio ureico no plasma, uréia e nitrogênio ureico no leite, nitrogênio urinário e nitrogênio ureico na urina. Também foram realizadas análises de composição (teor de gordura, teor proteína, teor de lactose, teor de sólidos totais, teor de sólidos não gordurosos), contagem de células somáticas, média de produção de leite durante 30 dias e dias em lactação. Para o estudo da proteômica foi utilizada a eletroforese bi-dimensional (2-DE) e a cromatografia líquida de alta performance acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC/MS). O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado em que os genótipos foram analisados como variáveis independentes e metabólitos, composição e contagem de células somáticas do leite e a produção e dias em lactação foram analisados como variáveis dependentes. As intensidades dos volumes de expressão normalizados (IVEN) obtidas para cada *spot* foram utilizadas como variáveis dependentes nas análises proteômicas. Neste caso, utilizou-se um modelo linear misto considerando os genótipos (A1A1, A1A2 ou A2A2) como efeito fixo e os efeitos aleatórios amostras dentro de cada tratamento e o resíduo. Para avaliação das proteínas diferencialmente abundantes (DAP) significativas com as características fenotípicas avaliadas, foram utilizadas análises de correlações momento-produto de Person, por meio do procedimento CORR. Todas as análises foram realizadas no programa computacional *Statistical Analysis System*[®] versão 9.4. Nas condições que o experimento foi desenvolvido, conclui-se que para metabólitos não foram encontradas diferenças entre os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2, apenas o genótipo A2A2 foi associado com as maiores médias de concentração de glicose. Para composição e CCS do leite, não foram observadas diferenças entre os três genótipos, assim como para as características de produção e dias em lactação. Também foram identificadas frações de α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína, k-caseína, α -la e β -lg, sendo as mesmas diferencialmente abundantes nos genótipos A1A1, A1A2 e A2A2. Nas frações de caseína, para α_{S1} -caseína houve maior abundância nos homozigotos, para α_{S2} -caseína foi maior no genótipo A2A2, para β -caseína a maior abundância ocorreu no genótipo heterozigoto, porém para k-caseína a abundância oscilou entre os três genótipos, e para as frações de proteínas séricas, a α -la foi maior no genótipo A2A2 e β -lg variou entre os três genótipos. Ao relacionar as informações contidas no genoma das vacas com as informações do proteoma das amostras de leite, observou-se

associação moderada e forte entre as concentrações de glicose sanguínea, ureia e nitrogênio ureico no leite com abundância das frações α_{S1} -, β - e κ -caseína. Também foi observado uma associação moderada entre os teores de lactose e dias em lactação com a abundância da proteína sérica α -la. Conclui-se com esses resultados, que o polimorfismo no gene CSN2, possivelmente pode estar envolvido em variações qualitativas e quantitativas do perfil proteico do leite de vacas da raça Holandesa submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais e com algumas características fenotípicas.

Palavras-chaves: Abundância. Genótipos. Metabolismo. Proteoma

ABSTRACT

FONSECA, D. C. M. 2023. **Study of the A1 and A2 alleles for the β -casein gene on the production, composition and protein fractions of milk Holstein cows.** [Estudo dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína sobre a produção, composição e frações proteicas do leite de vacas da raça Holandesa]. 2023. 160f. Tese de Doutorado (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

The aim of this study was to study the polymorphic adjustments of the A1 and A2 alleles for the β -casein gene in Holstein cows experiments under the same nutritional and environmental conditions, on metabolites (energetic, enzymatic and nitrogenous), of the milk, somatic cell count, average daily milk production and days in lactation and study the polymorphism of the A1 and A2 alleles on casein and serum protein fractions and correlate them with phenotypic traits. Eighteen Holstein cows of the three genotypes (6 A1A1; 6 A1A2; 6 A2A2) were used and the milk collections occurred during milking, the blood collections occurred by puncture of the coccygeal artery or vein and the urine collections by urination or appeared by stimuli with massages in the perivulvar region. For the study of phenotypic characteristics, metabolites (energetic, enzymatic and nitrogenous) were determined in milk, blood and urine, which were carried out through the concentrations of glucose, gamma glutamyl transferase, aspartate aminotransferase, urea and urea in plasma, urea and urine ureic in milk, urination and ureic urination. Composition analyzes (fat content, protein content, lactose content, total solids content, non-fat solids content), somatic cell count, average milk production during 30 days and days in lactation were also performed. For the study of proteomics, two-dimensional electrophoresis (2-DE) and high-performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (HPLC/MS) were used. The adopted experimental design was completely randomized in which the genotypes were analyzed as independent variables and metabolites, composition and somatic cell count of milk and production and days in lactation were analyzed as dependent variables. The intensities of the normalized expression volumes (IVEN) transited for each spot were used as dependent variables in the proteomic analyses. In this case, a mixed linear model was used considering the genotypes (A1A1, A1A2 or A2A2) as a fixed effect and the random effects selected within each treatment and the residue. For the evaluation of differential abundant proteins (DAP) considerations with the phenotypic characteristics evaluations, Person moment-product correlation analyzes were used, through the CORR procedure. All analyzes were performed using the Statistical Analysis System® version 9.4 computer program. Under the conditions in which the experiment was developed, it was concluded that for metabolites there were no differences between the A1A1, A1A2 and A2A2 genotypes, only the A2A2 genotype was associated with the highest mean glucose concentrations. For milk composition and SCC, no differences were observed between the three genotypes, as well as for production characteristics and days in lactation. Fractions of α_{S1} -casein, α_{S2} -casein, β -casein, κ -casein, α -la and β -lg were also identified, with the same differentials being abundant in the A1A1, A2A2 and A1A2 genotypes. In the casein fractions, for α_{S1} -casein there was greater abundance in homozygotes, for α_{S2} -casein it was greater in the A2A2 genotype, for β -casein the greater abundance occurred in the heterozygote genotype, but for κ -casein the abundance oscillated between the three genotypes, and for serum protein fractions, α -la was higher in the A2A2 genotype and β -lg varied among the three genotypes. By relating the information contained in the genome of the cows with the information from the proteome of the milk samples, a moderate and strong association was observed between the concentrations of blood glucose, urea and ureic expression in milk with abundance of the fractions α_{S1} -, β - and κ -casein. A moderate association was also observed

between lactose contents and days in lactation with an abundance of serum α -la protein. It was concluded with these results that the polymorphism in the CSN2 gene may possibly be involved in qualitative and quantitative variations in the protein profile of milk from Holstein cows that underwent the same nutritional and environmental conditions and with some phenotypic characteristics.

Keywords: Abundance. Genotypes. Metabolism. Proteome

LISTAS DE ABREVIACOES E SIGLAS

α -la: Alfa-Lactoalbumina

2-DE: Eletroforese Bi-Dimensional

AGCC: Ácidos de Cadeia Curta

AGCL: Ácidos Graxos de Cadeia Longa

AGCM: Ácidos Graxos de Cadeia Média

AGI: Ácidos Graxos Insaturados

AGS: Ácidos Graxos Saturados

AST: Aspartato Amino Transferase

BCM-7: Beta-Casomorfina-7

Bcms: Beta-Casomorfina

BSA: Albumina Sérica Bovina

CAT: Citosina-Adenina-Timina

CCS: Contagem de Células Somáticas

CCT: Citosina-Citosina-Timina

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CLA: Ácido Linoleico Conjugado

CNV: *Copy Number Variants*

CONCEA: Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

CSN1S1: Gene Codificador da α _{S1}-Caseína

CSN1S2: Gene Codificador da α _{S2}-Caseína

CSN2: Gene Codificador da β -Caseína

CSN3: Gene Codificador da κ -Caseína

CV: Coeficiente de Variação

CWA: Clima Subtropical de Inverno Seco

DAP: *Differentially Abundant Proteins*

DEL: Dias em Lactação

DIC: Delineamento Inteiramente Casualizado

DP: Desvio Padrão

ECC: Escore de Condição Corporal

EE: Extrato Etéreo

EPM: Erro Padrão da Média

FDA: Fibra em Detergente Ácido

FDN: Fibra em Detergente Neutro
FZEA: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
GGT: Gama Glutamil Transferase
GLIC: Glicose
GORD: Gordura
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*.
IEF: *Isoelectric Focusing*
Ig: Imunoglobulinas
IgA: Imunoglobulina A
IgG1: Imunoglobulina G1
IgG2: Imunoglobulina G2
IgM: Imunoglobulina M
INMET: Instituto Nacional de Meteorologia
IPG: *Immobilized pH Gradient*
ITU: Índice de Temperatura e Umidade
IVEN: Intensidades dos Volumes de Expressão Normalizados
kDa: Kilodalton
LACT: Lactose
LAFA/ZAB: Laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Ciências Básicas
LDL: *Low Density Lipoprotein*
LEACC/ ZMV: Laboratório de Estudos Avançados em Ciência da Carne do Departamento de Medicina Veterinária
LGB: Lactoglobulina
LTF: Lactoferrina
MAX: Máximo
MED: Média
mg/dL: Miligramas por Decilitro
MIN: Mínimo
Mr: *Molecular Mass Relative*
mRNA: RNA Mensageiro
MS: *Mass Spectrometry*
NRC: *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*
NU: Nitrogênio urinário
NUL: Nitrogênio ureico no leite

NUP: Nitrogênio ureico no plasma sanguíneo
NUU: Nitrogênio ureico na urina
PASEF: *Parallel Accumulation Serial Fragmentation*
PB: Proteína Bruta
PCA: *Principal Component Analysis*
pH: Potencial Hidrogeniônico
pI: Ponto Isoelétrico
PL: Produção de Leite
PPIs: *Protein-Protein Interaction*
PROT: Proteína
PTMs: *Post-Translational Modifications*
SAS: *Statistical Analysis System*
SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
SNG: Sólidos Não Gordurosos
SNP: *Single Nucleotide Polymorphisms*
ST: Sólidos Totais
TIMS-ToF: *Trapped Ion Mobility Spectrometry-Time-Of-Flight Mass Spectrometry*
tRNA: RNA Transportador
U/L: Unidade de Massa Atômica por Litro de Sangue
UL: Ureia no Leite
USP: Universidade de São Paulo
 β -lg: Beta-lactoglobulina

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Identificação por mapeamento da proteína α_{S1} -caseína obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.....36
- Tabela 2.** Identificação por mapeamento da proteína α_{S2} -caseína obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.....38
- Tabela 3.** Identificação por mapeamento da proteína β -caseína obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.....40
- Tabela 4.** Identificação por mapeamento da proteína κ -caseína obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.....43
- Tabela 5.** Identificação por mapeamento da proteína β -lg obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.....46
- Tabela 6.** Identificação por mapeamento da proteína α -la obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.....48
- Tabela 7.** Identificação por mapeamento da proteína BSA obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.....50
- Tabela 8.** Identificação por mapeamento da proteína LF obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.....54
- Tabela 9.** Composição nutricional das dietas oferecidas para as vacas leiteiras da raça Holandesa em lactação, portadora dos três genótipos para o gene da β -caseína, em g/ kg de Matéria Seca (MS).....76
- Tabela 10.** Número de observações (N), média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MIN) e valores máximos (MAX) para concentração dos metabólitos energéticos, enzimáticos e nitrogenados expressos quantitativamente (mg/dL) e (U/L)80
- Tabela 11.** Resultados das análises de variâncias para concentração de glicose (mg/dL), gama glutamil transferase (GGT) (U/L), aspartato amino transferase (AST) (U/L), uréia no plasma (UP) (mg/dL), nitrogênio ureico no plasma (NUP) (mg/dL), uréia no leite (UL) (mg/dL), nitrogênio ureico no leite (NUL) (mg/dL), nitrogênio urinário (NU) (mg/dL) e nitrogênio ureico na urina (NUU) (mg/dL).....81
- Tabela 12.** Número de observações (N), média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MIN) e valores máximos (MAX) para composição e CCS do leite expressos qualitativamente (%) e quantitativamente (\log céls/mL⁻¹)83
- Tabela 13.** Resultados das análises de variâncias para as concentrações de teor de gordura (%), teor proteína (%), teor de lactose (%), teor de sólidos totais (%), teor de sólidos não gordurosos (%) e contagem de células somáticas (\log céls/mL⁻¹céls / mL)84
- Tabela 14.** Número de observações (N), média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MIN) e valores máximos (MAX) para média de produção

| | |
|---|-----|
| de leite diária observada nos últimos 30 dias e dias em lactação..... | 86 |
| Tabela 15. Resultados das análises de variâncias para média de produção de leite observada durante 30 dias e dias em lactação..... | 86 |
| Tabela 16. Esquema demonstrativo das corridas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) das amostras de leite de vacas portadoras dos três genótipos para o gene da β -caseína..... | 104 |
| Tabela 17. Número de observações (N), média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MIN) e valores máximos (MAX) para os <i>spots</i> diferentes estatisticamente..... | 112 |
| Tabela 18. Proteínas diferencialmente abundantes no leite de vacas da raça Holandesa dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína identificadas por HPLC/MS..... | 117 |
| Tabela 19. Número de observações (N), Média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (MIN) e máximo (MAX) para as concentrações metabólicas..... | 119 |
| Tabela 20. Número de observações (N), Média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (MIN) e máximo (MAX) para a produção, composição e CCS do leite..... | 120 |
| Tabela 21. Número de observações (N), Média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (MIN) e máximo (MAX) para a produção, composição e CCS do leite..... | 120 |
| Tabela 22. Coeficientes de correlação entre os metabólicos energéticos, enzimáticos e nitrogenados dentro de cada proteínas diferencialmente abundantes observada entre os <i>spots</i> estatisticamente significativos..... | 122 |
| Tabela 23. Coeficientes de correlação entre composição e contagem de células somáticas do leite observada entre os <i>spots</i> estatisticamente significativos..... | 124 |
| Tabela 24. Coeficientes de correlação entre média de produção de leite observada durante 30 dias e dias em lactação observada entre os <i>spots</i> estatisticamente significativos..... | 126 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema ilustrativo demonstrando a diferença no aminoácido 6, no códon 67, no éxon 7 do gene CSN2 para as variantes genéticas A1 e A2 da β -caseína e a sua consequente quebra e liberação da β -casomorfina-7.....60
- Figura 2.** Temperatura do ar na cidade de São Carlos (SP) de 10/06/2021 a 10/07/2021.....77
- Figura 3.** Umidade relativa do ar na cidade de São Carlos (SP) de 10/06/2021 a 10/07/2021.....77
- Figura 4.** Gel referência de eletroforese bi-dimensional de amostra leite de vaca portadoras do genótipo A1A1 para a o gene da β -caseína.....113
- Figura 5.** Gel referência de eletroforese bi-dimensional de amostra leite de vaca portadoras do genótipo A1A2 para a o gene da β -caseína.....114
- Figura 6.** Gel referência de eletroforese bi-dimensional de amostra leite de vaca portadoras do genótipo A2A2 para a o gene da β -caseína.....114
- Figura 7.** Estimativas de médias da intensidade do volume de cada *spot* significativo na análise de variância nos três genótipos (A1A1, A1A2, A2A2) para o gene da β -caseína.....116

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO | 22 |
| 1.1. HIPÓTESES E OBJETIVOS..... | 27 |
| CAPÍTULO 2. REVISÃO DE LITERATURA | 28 |
| 2.1. POLIMORFISMO GENÉTICO E AS PROTEÍNAS DO LEITE..... | 28 |
| 2.2. COMPOSIÇÃO DO LEITE BOVINO..... | 31 |
| 2.2.1. Caseínas | 35 |
| 2.2.2. Proteínas séricas | 44 |
| 2.3. PROTEOMA DE LEITE | 63 |
| CAPÍTULO 3. ESTUDO DOS DESDOBRAMENTOS POLIMÓRFICOS DOS ALELOS A1 E A2 PARA O GENE DA β-CASEÍNA SOBRE A PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE LEITE DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA | 69 |
| RESUMO | 69 |
| ABSTRACT | 70 |
| 3.1. INTRODUÇÃO | 71 |
| 3.1. MATERIAL E MÉTODOS | 74 |
| 3.2.1. Seleção dos animais e descrição dos tratamentos | 75 |
| 3.2.2. Característica bromatológica da dieta..... | 75 |
| 3.2.3. Condição ambiental e climática da região..... | 76 |
| 3.2.4. Coleta e Análises bioquímicas dos metabólitos energético, enzimáticos e nitrogenados..... | 78 |
| 3.2.5. Análise de composição e CCS do leite..... | 79 |
| 3.2.6. Análise de produção de leite e dias em lactação | 79 |
| 3.2.7. Análise estatística..... | 79 |
| 3.2. RESULTADOS | 80 |
| 3.3.1. Análises bioquímicas dos metabólitos energético, enzimáticos e nitrogenados..... | 80 |
| 3.3.2. Análise composição e CCS do leite..... | 83 |
| 3.3.3. Análise de produção de leite e dias em lactação | 85 |
| 3.3. DISCUSSÃO | 86 |
| 3.4. CONCLUSÃO | 91 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 93 |

| | |
|---|-----|
| CAPÍTULO 4. ESTUDO DAS FRAÇÕES PROTEICAS DO LEITE PROVENIENTE DE VACAS HOLANDESAS COM DIFERENTES GENÓTIPOS PARA O GENE DA β-CASEÍNA | 99 |
| RESUMO | 99 |
| ABSTRACT | 100 |
| 4.1. INTRODUÇÃO | 101 |
| 4.2. MATERIAL E MÉTODOS | 103 |
| 4.2.1. Seleção dos animais e descrição dos tratamentos | 103 |
| 4.2.2. Coleta e Processamento das Amostras de leite para proteômica | 104 |
| 4.2.2.1. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO LEITE | 105 |
| 4.2.2.2. ELETROFORESE BI-DIMENSIONAL (2-DE) | 106 |
| 4.2.2.3. VISUALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS | 107 |
| 4.2.2.4. ANÁLISE DAS IMAGENS | 107 |
| 4.2.2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 108 |
| 4.2.2.6. DIGESTÃO DOS <i>SPOTS</i> “ <i>IN GEL</i> ” | 108 |
| 4.2.2.7. ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS..... | 109 |
| 4.2.2.8. PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO E BUSCA EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS (MAXQUANT) | 110 |
| 4.2.3. Características fenotípicas | 110 |
| 4.2.4. Análise estatística | 111 |
| 4.3. RESULTADOS | 111 |
| 4.3.1. Proteômica | 111 |
| 4.3.1.1. ELETROFORESE BI-DIMENSIONAL..... | 111 |
| 4.3.1.2. ANÁLISE DE HPLC/MS | 116 |
| 4.4. DISCUSSÃO | 127 |
| 4.4.1. Avaliação dos <i>spots</i> em relação aos genótipos | 127 |
| 4.4.2. Relação dos <i>spots</i> estatisticamente significativos com as características fenotípicas | 129 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 133 |
| CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 137 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 138 |

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

No *rank* de produção de leite mundial oficialmente catalogado pela FAO (Organização das Nações Unidas), a Ásia ocupa a 1ª posição com 248.578.491 toneladas/ano de leite de vaca, seguida pela Europa com 226.559.636 toneladas/ano, América com 197.664.064 toneladas/ano, África com 42.509.419 toneladas/ano e em 5ª e última posição a Oceania com 30.764.979 toneladas/ano. Dentre os cinco países com produção de maior volume de leite de vaca, estão a Índia com 108.300.000 toneladas/ano de leite, seguido pelos EUA (Estados Unidos da América) com 102.629.025 toneladas/ano, China com 37.276.274 toneladas/ano, Brasil com 36.364.198 toneladas/ano e a Alemanha com 32.506.910 toneladas/ano (FAO, 2022).

De acordo com pesquisa trimestral de produção de leite realizada pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) referente ao terceiro trimestre de 2022, foram adquiridos pelas indústrias processadoras 6,10 bilhões de litros de leite, indicando uma redução de 105.083 litros, o equivalente 1,7% em relação ao 3º trimestre de 2021, e uma redução de 415.306 litros, o equivalente a 6,8% em comparação com o trimestre de 2020, reflexos dos impactos econômicos causados pela pandemia de Covid-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2 e associados às dificuldades logísticas agravadas pelo conflito territorial entre Rússia e Ucrânia (IBGE, 2022).

Quantidade de leite de vaca produzido no Brasil em 2021 foi de 35.305.047 (mil litros), sendo a maior quantidade a da região Sul, com 11.962.826 (mil litros), seguida pelas regiões Sudeste com 11.954.216 (mil litros), Nordeste com 5.547.029 (mil litros), Centro-Oeste com 3.981.998 (mil litros), e Norte com 1.858.978 (mil litros). Isoladamente, o estado de Minas Gerais foi responsável por 80,40% da produção total da região Sudeste, com aproximadamente 9.611.706 (mil litros) e o estado de São Paulo por 13,1% com 1.567.625 (mil litros) de leite produzido e faturamento estadual anual de R\$ 3.315.928 (mil reais) com a atividade leiteira, representando 13,65% da participação regional e 4,86% de contribuição nacional (IBGE, 2022).

Assim, a indústria de laticínios tem investido em inovações e desenvolvimento de novos produtos para aumentar o consumo e atender um público diferenciado. Em 2003, a *A2 Milk Company Limited* surgiu na Nova Zelândia, comercializando leite e derivados (queijos, iogurtes ou cremes) livres da variante A1 da β -caseína (beta-caseína). O leite A2 entrou fortemente no mercado deste país e cobriu quase 10% do mercado de leite na Austrália. Tendo em vista os possíveis benefícios do leite A2 para a saúde dos seres humanos, além de

evitar os efeitos negativos do consumo da β -caseína A1, muitos produtores ao redor do mundo migraram para a produção de leite A2 (MAYER et al., 2021). Essa tendência de sucesso do mercado se espalhou para outras áreas geográficas, como América do Norte, Europa e China (NYSTROM et al., 2016). Consequentemente, outras empresas dedicadas à comercialização de sêmen para fazendas leiteiras introduziram o genótipo A2A2 em seus catálogos de touros como uma característica de interesse e valor agregado para seus animais (URRUTIA et al., 2019).

O leite bovino contém aproximadamente 87% de água e 13% de matéria seca, incluindo 4,6% de lactose, 3,4% de proteína, 4,2% de gordura, 0,8% de minerais e 0,1% de vitaminas e sua composição pode ser afetada por diferentes fatores, como sistema de criação, estratégias de alimentação, estágio de lactação e estação de parição (LINDMARK-MÅNSSON, 2008; LINDMARK-MÅNSSON et al., 2003). Aproximadamente 80% das proteínas do leite bovino são constituídas por caseínas e 20% por proteínas séricas (β -lactoglobulinas (beta-), α -lactalbumina (alfa-), albumina sérica bovina, imunoglobulinas e lactoferrina) (HOLT et al., 2013; OTAVIANO et al., 2005; EIGEL et al., 1984). As caseínas são subdivididas em quatro frações: 1) fração α_{S1} -caseína (alfa s1-) que constitui cerca de 38% do total de caseínas e é codificada pelo gene CSN1S1; 2) fração α_{S2} -caseína (alfa s2-) que constitui cerca de 10% do total de caseínas e é codificada pelo gene CSN1S2; 3) fração β -caseína (beta-) que constitui cerca de 36% do total de caseínas e é codificada pelo gene CSN2 e; 4) fração κ -caseína (kappa-) que constitui cerca de 13% do total de caseínas e é codificada pelo gene CSN3 (ELFERINK et al., 2022; KAMIŃSKI et al., 2007).

A quantidade de variantes genéticas da fração β -caseína ainda é discutida pela comunidade científica. Sebastiani et al. (2020) e Caroli et al. (2009), afirmaram que a fração β -caseína contém 12 variantes genéticas que foram identificadas em raças de gado leiteiro (A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2 e I) entretanto Kamiński et al. (2007), afirmaram serem 13 variantes genéticas (A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G) sendo que apenas sete delas (A1, A2, A3, B, C, I e E) foram detectados em raças bovinas europeias. As variantes mais comuns são A1 e A2, enquanto B é menos comum e A3 e C são variantes raras na maioria das raças (SEBASTIANI et al., 2020; KAMIŃSKI et al., 2007; FARRELL et al., 2004). A variante A2 é considerada a variante mais antiga, da qual as demais se originaram por mutação (JIMÉNEZ-MONTENEGRO et al., 2022).

A fração β -caseína produzida por vacas leiteiras é controlada por um único gene, localizado no cromossomo 6, denominado CSN2 (CAROLI et al., 2009). O polimorfismo mais interessante do gene CSN2 relacionado à produção de leite acontece devido a uma

mutação via seleção natural que causa a diferença de resíduos, resultado de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no códon 67, do éxon 7, do gene da β -caseína, no qual a trinca CCT (citosina-citosina-timina) que na variante A2, codifica o aminoácido prolina, sofre alteração para a trinca CAT (citosina-adenina-timina) que na variante A1, codifica o aminoácido histidina (KAY et al., 2021; JAISWAL et al., 2013). Essa diferença estrutural vem sendo foco de pesquisas (ASLEDOTTIR et al., 2018; NGUYEN et al., 2018; BROOKE-TAYLOR et al., 2017), pois esta diferença conformacional na estrutura secundária da proteína expressa, pode exercer influência sobre as propriedades físico-químicas e microestruturais do leite (NGUYEN et al., 2018; McLACHLAN, 2001; ELLIOTT et al., 1999) e, também, porque as proteases intestinais atuam mais fortemente na ligação His-Ile (histidina-isoleucina), resultando no aparecimento da β -casomorfina-7 (beta-casomorfina-7/BCM-7) (ASLEDOTTIR et al., 2018; DE NONI et al., 2010; JINSMAA et al., 1999).

As β -casomorfina (beta-casomorfina/BCMs) são um grupo de peptídeos bioativos com propriedades opioides (DE NONI; CATTANEO, 2010) e apresentam estruturas semelhantes, com uma sequência de 4 a 11 aminoácidos (KAMIŃSKI; CIEŚLIŃSKA; KOSTYRA, 2007) e a mesma sequência para os três primeiros aminoácidos: tirosina, prolina e fenilalanina (MUEHLENKAMP et al., 1996). A sequência de aminoácidos da BCM-7 corresponde às posições 60 a 66 da cadeia da β -caseína (Tirosina-Prolina-Fenilalanina-Prolina-Glicina-Prolina-Isoleucina). A BCM-7 é uma agonista do receptor μ -opióide e é considerada uma potencial causadora de inúmeras doenças não transmissíveis, principalmente no que diz respeito ao desconforto gastrointestinal (DANIŁOSKI et al., 2021; KAY et al., 2021) e pode ter ações biológicas, incluindo a ligação a receptores opióides em tecidos neuronais e não neuronais (AUESTAD et al., 2021; SOBCZAK et al., 2014).

Estudos recentes que investigaram o conhecimento dos consumidores sobre o leite A2 revelaram que os fatores que condicionam os consumidores a comprar esses produtos são o preço; origem; e certificação de qualidade, como “orgânico” ou “tradicional”. Este mesmo trabalho revelou que o preço do *premium* que os consumidores italianos estão dispostos a pagar pelo leite A2 em relação ao leite fresco sem lactose é de aproximadamente 20 centavos de euro/litro (BENTIVOGLIO et al., 2020). Outro estudo revelou que apenas 38% de um grupo brasileiro de consumidores pagaria um preço extra pelo leite A2 em relação ao leite convencional (OLIVEIRA et al., 2019).

Estima-se que 4,52 bilhões de litros de leite inspecionados no Brasil sejam relacionados à produção de A2, no entanto esse número ainda é subjugado já que a maior parte dos produtores brasileiros não investem em genotipagem dos animais. Por outro lado, os

benefícios que podem ser atribuídos ao consumo de leite A2 juntamente com a possibilidade de venda do litro três vezes maior do que o A1, têm atraído investimento nesse setor (KARSBURG, 2022).

O mercado de leite A2 no Brasil vem realizando conquistas importantes, sendo as mais relevantes a que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelo Ofício nº 679/2019 referente à identificação e declaração de rotulagem para o leite e produtos derivados contendo somente a β -caseína A2, autorizou a comercialização de leite A2A2 e a que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pela Resolução nº 3.980/2021 aprovou a alegação de “o leite produzido a partir de vacas com o genótipo A2A2 não promove a formação de BCM-7 (beta-casomorfina-7), que pode causar desconforto digestivo” com a informação adicional de “assim como o leite convencional, o leite produzido a partir de vacas genotipadas A2A2, contendo apenas β -caseína A2, não é apropriado para pessoas que possuem alergia à proteína do leite de vaca (APLV) ou portadoras de intolerância a lactose”, autorizando a inclusão no rótulo das embalagens de leite A2 a informação de que este “leite produzido a partir de vacas com genótipo A2A2”.

Diante desse cenário promissor do mercado de leite A2, à inovação produtiva e tecnológica aplicada aos sistemas de criação têm contribuído para agregação de valor à matéria prima por meio de incentivos ao desenvolvimento de um sistema de rastreabilidade para controle, execução, garantia da identidade e qualidade. A certificação de origem é um diferencial e uma oportunidade de negócios dentro do mercado de lácteos tanto para os produtores quanto ao consumidor final por permitir a aproximação entre os elos da cadeia produtiva do leite A2, gerando assim a disseminação do conhecimento desde o sistema de criação dos animais nas propriedades, as linhas de produção e beneficiamento do leite e a acessibilidade de informação dos benefícios à saúde proporcionado pelo leite A2 (FONSECA, 2022).

Para se obter o selo de certificação A2, no Brasil, é preciso apostar em sistemas que tragam confiança e que possam provar que o leite que está sendo comercializado é de fato um leite puramente A2. Por isso, sistemas de rastreabilidade vem ganhando destaque como importantes métodos de diferenciação da produção, o que garante um maior controle da qualidade nutricional, segurança dos alimentos e origem de produtos (MORGAN et al., 2016).

Mesmo com todas as vantagens que o leite A2 possui sobre o A1, é importante investir no *marketing* para promover e torná-lo de conhecimento geral, pois é o consumidor que determina o mercado baseando-se nas informações que tem acesso, como aparência e qualidade do produto, riscos ou vantagens à saúde, e comprometimento da indústria em

relação a conservação do meio ambiente, por exemplo (SILVA, 2006). Portanto, o intenso projeto de *marketing* realizado pela fazenda para promover o leite A2 no mercado é de fundamental importância para que as vantagens oferecidas pelo produto sejam de conhecimento geral, agregando valor ao produto e conhecimento da população em relação ao que estão consumindo (PACCHIAROTTI et al., 2020).

Vários estudos avaliaram os efeitos das variantes genéticas da proteína do leite na composição e perfil protéico do leite e suas propriedades de coagulação (VITTE et al., 2022; AMALFITANO et al., 2019; VALLAS et al., 2012). No entanto, ainda existem poucos relatos sobre a influência do leite A2 na fabricação de derivados e na percepção do consumidor. Embora seja difícil determinar os efeitos genéticos sobre as variantes do gene β -caseína envolvendo características inerentes aos animais, pesquisas são necessárias para explorar o mecanismo molecular da síntese de proteínas na glândulas mamárias entre os genótipos da β -caseína (WANG et al., 2020) e a combinação de novas tecnologias aliadas à bioinformática constituem uma ferramenta promissora para estudar a biologia dos sistemas, o que pode gerar grandes conjuntos de dados para as ciências da lactação e para a produção industrial (LI et al., 2017).

1.1. HIPÓTESES E OBJETIVOS

EXPERIMENTO 1: ESTUDO DOS DESDOBRAMENTOS POLIMÓRFICOS DOS ALELOS A1 E A2 PARA O GENE DA β -CASEÍNA SOBRE A PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE LEITE DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA

A hipótese do Experimento 1 foi de que vacas com o genótipo A2A2, para o gene da β -caseína, apresentassem ou não diferenças nas características fenotípicas de produção, composição e CCS do leite em relação ao genótipo A1A1 e A1A2.

O objetivo geral do Experimento 1, foi estudar os desdobramentos polimórficos dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína sobre metabólitos (energético, enzimáticos e nitrogenados), composição do leite (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos não gordurosos), contagem de células somáticas (CCS em log céls./mL-1), média de produção de leite diária (PL) observada durante 30 dias (litros/vaca/dia) e dias em lactação (DEL) de vacas da raça Holandesa submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais.

EXPERIMENTO 2: ESTUDO DAS FRAÇÕES PROTEICAS DO LEITE PROVENIENTE DE VACAS HOLANDESAS COM DIFERENTES GENÓTIPOS PARA O GENE DA β -CASEÍNA

A hipótese do Experimento 2 foi de que vacas com o genótipo A2A2, para o gene da β -caseína, apresentassem ou não diferenças nas frações proteicas do leite em relação ao genótipo A1A1 e A1A2, e que tais diferenças, se existissem, tivessem ou não correlacionada a características fenotípicas.

O objetivo geral do Experimento 2 foi de estudar o polimorfismo dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína sobre as frações de caseína e proteínas séricas, por meio de eletroforese bi-dimensional (2-DE) e por cromatografia líquida de alta performance acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC/MS) e correlacioná-las com as características fenotípicas observadas em vacas da raça Holandesa submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais.

CAPÍTULO 2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. POLIMORFISMO GENÉTICO E AS PROTEÍNAS DO LEITE

Os polimorfismos descrevem sequências genômicas que coexistem como duas ou mais variantes de sequências em alta frequência em uma população, sendo variantes genéticas as alterações na sequência de nucleotídeos em uma posição específica do genoma em relação a um genoma de referência, podendo ocorrer em qualquer posição do genoma, incluindo as regiões gênicas, ou seja, regiões que carregam a informação para síntese de proteínas. Estas regiões são as de maior interesse em pesquisas clínicas na busca por variantes relacionadas com determinados distúrbios. O impacto de uma alteração em uma região de codificação de um gene depende principalmente de como essa variante afeta a síntese da proteína depois do processo traducional (ALBERTS, 2017).

Se uma variante é considerada formalmente como um polimorfismo ou não, depende inteiramente se sua frequência populacional é superior a 1% dos alelos na população, e não do tipo de mutação que o causou, do tamanho do segmento do genoma envolvido, ou se ele tem um efeito aparente sobre o indivíduo, ou seja, o polimorfismo genético é uma alteração na sequência de DNA (ácido desoxirribonucleico). Se a variação for encontrada em uma frequência inferior a 1% da população, denomina-se de mutação e provavelmente causa uma determinada doença (NIKIFOROV e NIKIFOROVA, 2011).

A localização de uma variante em um gene também não determina se a variante é um polimorfismo. Embora a maioria dos polimorfismos de sequência esteja localizada entre genes ou dentro de íntrons e seja irrelevante para o funcionamento de qualquer gene, outros podem estar localizados na sequência codificante dos próprios genes e resultar em proteínas variantes diferentes que podem, por sua vez, ocasionar diferenças distintivas em populações. Outros ainda estão em regiões reguladoras que também podem ter efeitos importantes sobre a transcrição ou a estabilidade do RNA (ácido ribonucleico) (THOMPSON e THOMPSON, 2016).

Os polimorfismos de DNA podem ser classificados de acordo com a forma como a sequência de DNA varia entre os diferentes alelos, sendo categorizados em polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*; SNP), que ocorre quando há substituição de um único nucleotídeo em uma posição específica do genoma; em variações de alterações estruturais, que ocorre quando o número dos cromossomos é mantido, porém pode haver alterações cromossômicas estruturais dos tipos inserções ou deleções (*indels*) tida como "simples" em que apresentam apenas dois alelos, ou seja, presença ou ausência do segmento

inserido ou deletado e tida como “microssatélite” que são multialélicas devido a números variáveis de um segmento de DNA que é inserido em tandem (repetição de um fragmento) em um determinado local; em variantes no número de cópias (*copy number variants*; CNV), que consiste na presença ou ausência de grandes segmentos do genoma e; inversões que ocorrem quando uma porção do cromossomo se separa, mas se une novamente ao cromossomo de maneira invertida (ALBERTS, 2017; THOMPSON et al., 2016).

O polimorfismo genético resulta da mudança na sequência de nucleotídeos e diferentes alelos que ocorrem no mesmo *locus* e podem codificar aminoácidos diferentes. Esses aminoácidos alterados resultam subsequentemente na geração de diferentes peptídeos bioativos com arranjo estrutural modificado. As proteínas do leite existem em várias formas devido ao polimorfismo exibido pelos genes codificadores. A maioria das variações entre os genes das caseínas são atribuídas à mutação pontual, dando origem a polimorfismos de nucleotídeo único, que muitas vezes levam a mudanças no códon, denominadas de mutação silenciosa ou sinônima. Juntamente com o arranjo estrutural e as propriedades físico-químicas, as variações genéticas e as variabilidades quantitativas das proteínas também são modificadas por essas mudanças nas sequências de nucleotídeos, que aparecem como produto da mutação (CAROLI et al., 2009).

Os polimorfismos genéticos de proteínas do leite do gênero *Bos* despertaram o interesse da comunidade científica, principalmente associado à sua evolução, estrutura populacional, reprodução e hibridização entre as espécies. Alguns estudos concentraram-se na influência das variantes genéticas das principais proteínas do leite sobre as características quantitativas e qualitativas do leite e suas propriedades nutracêuticas e tecnológicas (MARTIN et al., 2002; Di STASIO e MARIANI, 2000).

Diversos estudos foram conduzidos com o objetivo de associação entre polimorfismos genéticos e características de importância econômica. Em bovinos leiteiros, as propriedades nutricionais, comportamento reológico, características físico-químicas, aspectos composicionais, aceitabilidade sensorial, produção de leite e rendimento industrial dos derivados foram associadas ao polimorfismo em genes de caseínas. Essas modificações causam ainda a desnaturação térmica das proteínas, tamanho das micelas de caseína, tamanho dos glóbulos de gordura, teor de minerais distribuídos no leite, mudanças no ponto isoelétrico, pH (potencial hidrogeniônico) e hidrofobicidade das proteínas (KETTO et al., 2017; BIJL et al., 2014; MARTIN et al., 2013; MARTINI et al., 2007; ALLMERE et al., 1997). Compreender como tais variações influenciam nas propriedades do leite é crucial e estratégico

para as indústrias de laticínios produzirem derivados lácteos com propriedades desejadas (KETTO et al., 2018).

Um dos efeitos mais importantes dos polimorfismos das proteínas do leite sobre as características de importância econômica, é sua relação com as propriedades tecnológicas do leite. O monitoramento constante das abundâncias da proteína do leite em várias raças de bovinos é uma prática essencial para aumentar a frequência de variantes genéticas com efeitos favoráveis e otimizar sua utilização quanto aos critérios e métodos de seleção disponíveis para determinados sistemas de produção leiteira (HRISTOV et al., 2012).

As vantagens dessa abordagem estão diretamente relacionadas ao melhoramento genético das populações de bovinos de leite, ao aumento da qualidade e quantidade da produção, à diminuição da perda de produção e à melhoria da competitividade da indústria de laticínios (ZLATAREV et al., 2008).

O principal objetivo da seleção de animais na indústria de laticínios é melhorar a produção e a composição do leite (CAROLI et al., 2009). Comitês científicos estão direcionando suas linhas de pesquisas para o desenvolvimento de alimentos funcionais e no aprofundamento de estudos relacionados às variantes genéticas das proteínas do leite, principalmente relacionadas aos genes CSN1S1 (gene codificador da α_{S1} -caseína), CSN2 (gene codificador da β -caseína), CSN3 (gene codificador da κ -caseína) e LGB (lactoglobulina) por estarem associados à influência significativa em derivados lácteos, tais como na qualidade composicional, custo de produção e rendimento industrial e, hábitos alimentares saudáveis (BANGAR et al., 2021).

Apesar de todos os benefícios relacionados ao consumo de leite, como anticarcinogênico, imunomodulador, antimicrobiano, anticariogênico, efeitos anti-hipertensivos e hipocolesterolêmicos (DAVOODI et al., 2016), existem autores que relatam que a constituição de algumas proteínas do leite pode afetar a saúde humana. Propriedades hipoalergênicas de determinados tipos de leite contendo potenciais alérgenos, principalmente as α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -lactoglobulina (β -lg) e; a liberação de peptídeos bioativos resultantes da proteólise enzimática da β -caseína, que ocorre durante o processamento ou da digestão gastrointestinal do leite (CAROLI et al., 2009), tais aspectos citados podem causar reações adversas por consumo de leite e derivados e efeitos indesejáveis para todos os elos da cadeia produtiva do setor lácteo.

Polimorfismos genéticos em genes de caseínas são importantes por sua influência na composição e propriedades tecnológicas do leite (NG-KWAI-HANG, 2006; MARTIN et al.,

2002) e, também por permitirem avanços científicos nos estudos filogenéticos. Alelos das proteínas do leite vêm sendo usados na determinação da introgressão genética e no rastreamento das histórias evolutivas de raças de gado e raças de outros gêneros *Bos* (PRINZENBERG et al., 2008; IBEAGHA-AWEMU et al., 2007, 2004; WARD et al., 1997). Estudos encontraram alelos específicos de proteínas do leite nos zebuínos ou *Bos indicus* em algumas raças *Bos taurus* da Europa, indicando assim a introgressão do gene zebu (IBEAGHA-AWEMU et al., 2007; JANN et al., 2004; BEJA-PEREIRA et al., 2002).

2.2. COMPOSIÇÃO DO LEITE BOVINO

O leite contém aproximadamente 87% de água e 13% de sólidos totais, com aproximadamente 4,6% de lactose, 4,2% de gordura, 3,4% proteína, 0,8% de minerais e 0,1% de vitaminas (LINDMARK et al., 2003; WALSTRA et al., 1999).

A principal função biológica da lactose é fornecer energia para o neonato, além disso, confere um sabor adocicado ao leite. A lactose é um dissacarídeo exclusivo do leite, composto por dois monossacarídeos a D-glicose e D-galactose, unidos em uma ligação β -1,4-glicosídica, sendo que a galactose é formada a partir da própria glicose (FASSIO et al., 2018). A lactose tem duas formas isoméricas, α -lactose (alfa-) e β -lactose (beta-), que diferem na configuração estérica do grupo hidroxila substituinte da porção C1, pertencente à glicose (ILLANES et al., 2016). A α -lactose e a β -lactose também diferem em suas características químicas e físicas, como solubilidade, temperatura, pH e cristalização, ocasionando em diferenças quando incluídas como ingredientes em preparações de alimentos e medicamentos (DOMINICI et al., 2022). A temperatura tem influência direta na quantidade de lactose dissolvida na solução, ao aumentar a temperatura, a forma α -lactose aumenta sua solubilidade, deslocando o equilíbrio para a forma β -lactose. A solubilidade da α -lactose é mais dependente da temperatura do que a da β -lactose, portanto, a α -lactose irá cristalizar muito lentamente a partir da solução como cristais de tamanho irregular, que dão origem a uma textura arenosa (JOHNSON et al., 2003).

A adição de mais α -lactose à solução faz com que ocorra a mutarrotação, de modo que a forma α -lactose comece a se converter em β -lactose, assim, forma-se mais α -lactose do que pode permanecer dissolvido e a α -lactose começa a cristalizar. Este fenômeno ocorre até que se estabeleça um equilíbrio entre os dois isômeros (PORTNOY et al., 2021; CHEN et al., 2022). O pH não afeta a proporção dos anômeros de lactose em equilíbrio, enquanto

influencia a taxa na qual ocorre a mutarrotação. Em pH 5, a taxa de mutarrotação é mínima, mas aumenta em valores de pH mais altos ou mais baixos (PORTNOY et al., 2021).

Após a ingestão do leite, a lactose é hidrolisada no intestino pela enzima lactase em glicose e galactose. A disponibilidade de glicose na glândula mamária é, portanto, limitante para a síntese de lactose. Na vaca leiteira, a absorção de glicose a partir do intestino é limitada, o que significa que a quase totalidade da demanda de glicose para o metabolismo é suprida pela gliconeogênese. A etapa final da síntese da lactose ocorre nas membranas do complexo de Golgi, pela ligação de uma molécula de glicose a outra de galactose, sob ação do complexo enzimático lactose sintase. Após a síntese, a lactose é transportada em vesículas e secretadas no lúmen do alvéolo, o que causa aumento da pressão osmótica e transporte da água para o lúmen. A secreção de lactose dentro do lúmen alveolar estimula a passagem da água do sangue para o leite. A lactose é um dos principais determinantes do volume do leite, pois desempenha papel fundamental de controle da pressão osmótica da glândula mamária, juntamente com alguns íons como o de Na (sódio), Cl (cloro) e K (potássio) (SANTOS et al., 2019).

A gordura é o componente de maior variação de teores no leite, pois a síntese varia de acordo com fatores genéticos, nutricionais e fisiológicos. A principal função da gordura do leite é fornecer energia para o neonato, além de ser fonte de ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis. A gordura do leite é composta principalmente por triglicérides (> 95% da gordura total) e outros lipídios como fosfolipídios, colesterol, como e diacilgliceróis (SANTOS et al., 2019).

Os ácidos graxos são classificados de acordo com o comprimento da cadeia de carbonos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), constituídos por menos de 6 carbonos; ácidos graxos de cadeia média (AGCM) constituídos de 6 a 10 carbonos e; ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) constituídos por 12 carbonos ou mais (PAVONCELLO et al., 2022), também são classificados de acordo com a presença das ligações em ácidos graxos saturados (AGS) sendo aqueles que contêm apenas ligações simples em sua estrutura e em ácidos graxos insaturados (AGI) sendo aqueles que contêm uma ou mais duplas ligações em sua estrutura; número de duplas ligações em ácidos graxos monoinsaturados sendo aqueles que contêm uma dupla ligação na sua estrutura e em ácidos graxos poliinsaturados sendo aqueles que contêm duas ou mais ligações duplas em sua estrutura e; a configuração das duplas ligações em ácidos graxos cis e em ácidos graxos trans (SANTOS et al., 2013; RAPOSO, 2010).

Os ácidos graxos do leite também são formados por aproximadamente 70% de ácidos graxos saturados sendo eles: 4,4% de ácido butírico (C4:0), 2,4% de ácido capróico (C6:0), 1,4% de ácido caprílico (C8:0), 2,7% de ácido cáprico (C10:0), 3,3% de ácido láurico (C12:0), 10,9% de ácido mirístico (C14:0), 0,9% de ácido pentadecanóico (C15:0), 30,6% de ácido palmítico (C16:0), 0,4% de ácido heptadecanóico (C17:0), 12,2% de ácido esteárico (C18:0) e 0,2% de ácido eicosanóico (C20:0); por aproximadamente 25% de ácidos graxos monoinsaturados sendo eles: 0,3% de ácido caproléico (C10:1), 0,8% de ácido miristoléico (C14:1), 1,0% de ácido palmitoléico (C16:1) e 22,8% de ácido oléico; por 2,3% de ácido graxos poliinsaturados sendo eles: 1,6% de ácido linoléico ou ω -6 (C18:2) e 0,7% de α -linolênico ω -3 (C18:3) e, 2,7% de ácidos graxos trans sendo eles: 0,4% de ácido (16:1t), 2,1% de ácido elaídico (C18:1t) e 0,2% de ácido linolelaídico (C18:2t) e por 0,4% de ácido rumênico ou ácido linolêico (18:2 cis-9, trans-11) (ácido linolêico conjugado_CLA) (PEREIRA, 2014; MANSSON, 2008; LINDMARK MANSSON et al., 2003).

A síntese de gordura do leite ocorre nas células epiteliais secretoras, a partir dos ácidos graxos de duas origens principais: ácidos graxos de cadeia longa são absorvidos a partir do sangue (origem da dieta ou da mobilização das reservas corporais), síntese de *novo* de ácidos graxos a partir de acetato (C₂) e beta-hidroxibutirato (C₄). Dentro da célula epitelial, os triglicerídeos são sintetizados na superfície externa do retículo endoplasmático liso, ocorrendo então, a formação de gotículas de gordura. Com a fusão de várias gotículas de gordura, ocorre formação de gotículas maiores, que migram para a região apical da célula epitelial e, posteriormente, são cobertas pela membrana plasmática e secretadas no lúmen dos alvéolos. Dessa forma, a gordura do leite encontra-se na forma de emulsão de glóbulos de gordura recobertos pela membrana plasmática das células epiteliais (SANTOS et al., 2019).

A função biológica das proteínas do leite é fornecer aminoácidos essenciais, cálcio e fósforo, e proteção imunológica ao recém-nascido. As proteínas do leite podem ser classificadas em dois grandes grupos: caseínas e proteínas do soro. A caseína é a fração das proteínas do leite que se coagula em pH < 4,6; enquanto o conjunto das demais proteínas solúveis e que não sofre coagulação compõem as proteínas do soro. A caseína é uma fosfoproteína sintetizada nas células epiteliais da glândula mamária e secretada na forma de micelas de caseinato (agrupamento de várias moléculas de caseína), as quais são ligadas a íons fosfato de cálcio. São encontradas em quatro principais variantes genéticas das caseínas: α _{S1}-, α _{S2}-, β -, κ -caseína. A caseína é altamente estável em altas temperaturas e não é coagulada pela pasteurização, entretanto, quando o leite é acidificado, ocorre a desnaturação e a coagulação das micelas de caseína. As caseínas compõem aproximadamente 80% do total

de proteínas do leite, com concentração média de $26,9 \pm 1,5$ g/L. Adicionalmente, a essas classes principais, a proteólise da β -caseína pela ação da plasmina produz a γ -caseína (gama-) ($0,8 \pm 0,15$ g/L) e outros peptídeos menores. De forma similar, a proteólise da α -caseína tem como subproduto a λ -caseína (sigma-) (SANTOS et al., 2019).

Nas células epiteliais mamárias, a síntese de proteína ocorre no retículo endoplasmático rugoso, a partir de aminoácidos do sangue. A estrutura das proteínas do leite é pré-determinada pela expressão de genes específicos, os quais são controlados pelos hormônios associados à lactação. A síntese de proteínas ocorre em três etapas principais: transcrição no núcleo das células epiteliais e formação do mRNA (RNA mensageiro) a partir dos genes ativados; ativação de aminoácidos e ligação no tRNA (RNA transportador); tradução que ocorre nos ribossomos. Após a síntese, as proteínas são transportadas para o complexo de Golgi e, posteriormente, secretadas na forma de vesículas para o lúmen. A maioria das proteínas do leite é sintetizada nas células epiteliais mamárias, no entanto algumas proteínas do soro como a albumina sérica e imunoglobulinas, são sintetizadas fora da glândula mamária, transportadas pela corrente sanguínea e, posteriormente, transferidas para o lúmen alveolar. Dentre as principais proteínas do soro, umas são sintetizadas na glândula mamária β -lg e α -lactoalbumina (α -la), enquanto as outras (albumina séricas, imunoglobulinas, lactoperoxidase e lactoferrina) são transportadas a partir do sangue para o leite. A β -g é a mais abundantemente proteína do soro ($3,1 \pm 0,2$ g/L), seguida pela α -la ($1,2 \pm 0,1$ g/L), albumina sérica ($0,5 \pm 0,04$ g/L) e as imunoglobulinas ($1,0 \pm 0,1$ mg/L). As imunoglobulinas têm origem no baço e linfonodos, sendo transportadas para o leite a partir do sangue e vasos linfáticos. Os linfócitos B, produtores de anticorpos, podem se alojar na glândula mamária para o auxílio na síntese de imunoglobulinas durante a fase pré-parto de produção de colostro (SANTOS et al., 2019).

As vitaminas são substâncias orgânicas essenciais ao metabolismo, as quais são requeridas em baixas concentrações na dieta para o adequado crescimento e manutenção do metabolismo. Todas as vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis conhecidas estão presentes no leite (SANTOS et al., 2019). O leite é uma fonte de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), porém com limitadas quantidades de vitamina K. A vitamina A é um precursor do β -caroteno, responsável pela cor amarela do leite de vaca. A maioria das vitaminas hidrossolúveis do complexo B (tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido pantotênico (B5), piridoxina (B6), biotina (B7), ácido fólico (B9) e cobalamina (B12)) são sintetizadas pelos microrganismos no rúmen e, dessa forma, os teores de vitaminas no leite variam de acordo

com os teores presentes no sangue (MEHTA, 2015; MANSSON, 2008; LINDMARK MANSSON et al., 2003; PEREIRA, 2014).

O leite contém elementos inorgânicos (minerais), os quais estão diretamente associados com o balanço iônico, osmótico e estabilidade do leite. Os principais elementos minerais presentes no leite são os necessários ao desenvolvimento do esqueleto, os quais encontram-se, na forma iônica (solúvel) e ligados às micelas de caseína (Ca (cálcio), Mg (magnésio) e P (fósforo)). Dentre os principais cátions presentes no leite, destacam-se o Na^+ (cátion monovalente de sódio), K^+ (cátion monovalente de potássio), Ca^{2+} (cátion bivalente de cálcio), Mg^{2+} (cátion bivalente de magnésio) enquanto os principais ânions são Cl^- (ânion monovalente de cloro), SO_4^{2-} (ânion sulfato), CO_3^{2-} (ânion carbonato), PO_4^{3-} (ânion fosfato). O teor de alguns elementos minerais do leite como Ca, Mg e P, é maior do que a concentração sanguínea, enquanto outros como Na e Cl (cloro) têm menores teores em relação ao sangue. Essa diferença de concentração somente é possível, pois parte do cálcio e do fósforo estão ligados às moléculas de caseínas. Esses elementos minerais são importantes na estabilização das micelas de caseína do leite. As concentrações de Na, K (potássio) e Cl do leite constituem o segundo principal fator determinante do volume de água do leite, em razão da pressão osmótica desses íons, o que em conjunto com o efeito osmótico da lactose, determina o volume de água presente no leite (SANTOS et al., 2019).

Todos os minerais são distribuídos entre uma fase solúvel e uma fase coloidal, e enquanto os íons monovalentes existem em grande parte, ou totalmente, na fase solúvel tanto quanto 66% do cálcio e 55% do fósforo podem estar na fase coloidal. A distribuição de cálcio, citrato, magnésio e fosfato entre a fase solúvel e coloidal, ou seja, associada às micelas de caseína e, sua interação com as proteínas do leite têm consequências importantes para a estabilidade do leite e derivados (MEHTA, 2015).

2.2.1. Caseínas

As caseínas atuam primariamente como fonte de aminoácidos. Entretanto, sabe-se que elas apresentam funções biológicas específicas por atuarem como carreadoras de cálcio, que passam das fêmeas de mamíferos para os neonatos (HOLT et al., 2013) e, como chaperonas, que evitam a formação de agregados proteicos insolúveis, conhecidos como fibrilas amiloides (HOLT et al., 2013; TREWEEK et al., 2011), prevenindo o aparecimento de várias doenças (RAMBARAN et al., 2008).

Historicamente, as caseínas no leite do gênero *Bos* foram definidas originalmente como aquelas fosfoproteínas que precipitam do leite desnatado cru por acidificação a pH 4,6 a 20°C (O'MAHONY et al., 2014; JENNESS et al., 1956), posteriormente as caseínas foram diferenciadas de acordo com sua mobilidade eletroforética relativa em poliacrilamida alcalina ou géis de amido contendo ureia com ou sem mercaptoetanol (WHITNEY et al., 1976). Em termos estruturais, as caseínas são descritas como proteínas reomórficas, com conformação aberta e flexível. Assim, as caseínas foram identificadas de acordo com a homologia de suas estruturas primárias nas seguintes famílias: α_{S1} -, α_{S2} -, β - e κ -caseína (SWAISGOOD et al., 1975). As caseínas apresentam diferenças na sequência de aminoácidos e uma grande heterogeneidade devido a duas modificações pós-tradução, chamadas de fosforilação e glicosilação (HOLLAND et al., 2014).

α_{S1} -caseína

A família α_{S1} -caseína é a mais abundante, cerca de 38% da fração de caseína do leite bovino, é codificada pelo gene CSN1S1 (ELFERINK et al., 2022; KAMIŃSKI et al., 2007) e consiste em um componente maior e um componente menor. Ambas as proteínas são polipeptídios de cadeia simples com a mesma sequência de aminoácidos estabelecida e diferem apenas em seu grau de fosforilação (HUPPERTZ, 2013; GROSCLAUDE et al., 1973; MERCIER et al., 1971). A α_{S1} -caseína contém 199 resíduos de aminoácidos além do peptídeo sinal com 15 resíduos de aminoácidos, tornando a pré-forma com 214 aminoácidos de comprimento (FARRELL et al., 2004).

O número de acesso da α_{S1} -caseína do banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot é P02662, o *locus* é CAS1_BOVIN, o gene é CSN1S1, o número de identificação taxonômica no NCBI é 9913, já sua identificação por mapeamento está apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Identificação por mapeamento da proteína α_{S1} -caseína obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.

| Proteína | Comprimento | Peso molecular | Ponto isoelétrico | Sequência | Variantes genéticas |
|----------|-------------|----------------|-------------------|-----------|---------------------|
|----------|-------------|----------------|-------------------|-----------|---------------------|

| | | | | | | |
|--|--|--|--|---|-----|---|
| | | | | 1 | 10 | |
| | | | | Met-Lys-Leu-Leu-Ile-Leu-Thr-Cys-Leu-Val | | |
| | | | | 11 | 20 | |
| | | | | Ala-Val-Ala-Leu-Ala-Arg-Pro-Lys-His-Pro | | |
| | | | | 21 | 30 | |
| | | | | Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu-Val | | |
| | | | | 31 | 40 | |
| | | | | Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg-Phe-Phe-Val | | |
| | | | | 41 | 50 | |
| | | | | Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys-Glu | | |
| | | | | 51 | 60 | |
| | | | | Lys-Val-Asn-Glu-Leu-Ser-Lys-Asp-Ile-Gly | | |
| | | | | 61 | 70 | |
| | | | | Ser-Glu-Ser-Thr-Glu-Asp-Gln-Ala-Met-Glu | | |
| | | | | 71 | 80 | |
| | | | | Asp-Ile-Lys-Gln-Met-Glu-Ala-Glu-Ser-Ile | | |
| | | | | 81 | 90 | |
| | | | | Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser | | |
| | | | | 91 | 100 | A |
| | | | | Val-Glu-Gln-Lys-His-Ile-Gln-Lys-Glu-Asp | | B |
| | | | | 101 | 110 | C |
| | | | | Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu | | D |
| | | | | 111 | 120 | E |
| | | | | Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-Leu-Lys-Lys-Tyr-Lys | | F |
| | | | | 121 | 130 | G |
| | | | | Val-Pro-Gln-Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser | | H |
| | | | | 131 | 140 | |
| | | | | Ala-Glu-Glu-Arg-Leu-His-Ser-Met-Lys-Glu | | |
| | | | | 141 | 150 | |
| | | | | Gly-Ile-His-Ala-Gln-Gln-Lys-Glu-Pro-Met | | |
| | | | | 151 | 160 | |
| | | | | Ile-Gly-Val-Asn-Gln-Glu-Leu-Ala-Tyr-Phe | | |
| | | | | 161 | 170 | |
| | | | | Tyr-Pro-Glu-Leu-Phe-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gln | | |
| | | | | 171 | 180 | |
| | | | | Leu-Asp-Ala-Tyr-Pro-Ser-Gly-Ala-Trp-Tyr | | |
| | | | | 181 | 190 | |
| | | | | Tyr-Val-Pro-Leu-Gly-Thr-Gln-Tyr-Thr-Asp | | |
| | | | | 191 | 200 | |
| | | | | Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-Asp-Ile-Pro-Asn-Pro | | |
| | | | | 201 | 210 | |
| | | | | Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser-Glu-Lys-Thr-Thr | | |
| | | | | 211 | | |
| | | | | Met-Pro-Leu-Trp | | |

Fonte: Adaptado de UniProtKB/Swiss-Prot (2022).

α_{S2} -caseína

A família α_{S2} -caseína, que constitui até 10% da fração de caseína do leite bovino, é codificada pelo gene CSN1S2 (ELFERINK et al., 2022; KAMIŃSKI et al. 2007), consiste em 2 componentes principais e vários componentes secundários exibindo níveis variados de fosforilação pós-traducional (SWAISGOOD, 1992) e graus menores de ligação dissulfeto intermolecular (RASMUSSEN et al., 1992). As formas predominantes no leite bovino contêm uma ligação dissulfeto intramolecular e diferem apenas no grau de fosforilação. A α_{S2} -caseína

contém 207 resíduos de aminoácidos além do peptídeo sinal com 15 resíduos de aminoácidos, tornando a pré-forma com 222 aminoácidos de comprimento (FARRELL et al., 2004).

A família de proteínas da α_{S2} -caseína consiste na variante A da α_{S2} -caseína, mais frequentemente é observada em raças ocidentais, na variante D da α_{S2} -caseína observada nas raças *Vosgienne* e *Montbeliarde* (GROSCLAUDE et al., 1978) e em 3 raças espanholas (OSTA et al., 1995), na variante B da α_{S2} -caseína que foi observada com baixas frequências em zebuínos na África do Sul e a variante C da α_{S2} -caseína foi observada em *Bos grunniens* no vale do Nepal e na República da Mongólia (GROSCLAUDE et al., 1982, 1976).

O número de acesso da α_{S2} -caseína do banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot é P02663, o *locus* é CAS2_BOVIN, o gene é CSN1S2, o número de identificação taxonômica no NCBI é 9913, já sua identificação por mapeamento está apresentada na tabela 2.

Tabela 2. Identificação por mapeamento da proteína α_{S2} -caseína obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.

| Proteína | Comprimento | Peso molecular | Ponto isoelétrico | Sequência | Variantes genéticas | |
|---|-------------|----------------|-------------------|---|---------------------|---|
| α_{S2} -caseína | 222 AA | 26,019 Da | 8,55 | 1 | 10 | |
| | | | | Met-Lys-Phe-Phe-Ile-Phe-Thr-Cys-Leu-Leu | | |
| | | | | 11 | 20 | |
| | | | | Ala-Val-Ala-Leu-Ala-Lys-Asn-Thr-Met-Glu | | |
| | | | | 21 | 30 | |
| | | | | His-Val-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ser-Ile-Ile | | |
| | | | | 31 | 40 | |
| | | | | Ser-Gln-Glu-Thr-Tyr-Lys-Gln-Glu-Lys-Asn | | |
| | | | | 41 | 50 | |
| | | | | Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys-Glu-Asn-Leu | | |
| | | | | 51 | 60 | |
| | | | | Cys-Ser-Thr-Phe-Cys-Lys-Glu-Val-Val-Arg | | |
| | | | | 61 | 70 | |
| | | | | Asn-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly | | |
| | | | | 71 | 80 | A |
| | | | | Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ser-Ala-Glu-Val-Ala | | B |
| | | | | 81 | 90 | C |
| | | | | Thr-Glu-Glu-Val-Lys-Ile-Thr-Val-Asp-Asp | | D |
| | | | | 91 | 100 | |
| | | | | Lys-His-Tyr-Gln-Lys-Ala-Leu-Asn-Glu-Ile | | |
| | | | | 101 | 110 | |
| | | | | Asn-Gln-Phe-Tyr-Gln-Lys-Phe-Pro-Gln-Tyr | | |
| 111 | 120 | | | | | |
| Leu-Gln-Tyr-Leu-Tyr-Gln-Gly-Pro-Ile-Val | | | | | | |
| 121 | 130 | | | | | |
| Leu-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln-Val-Lys-Arg-Asn | | | | | | |
| 131 | 140 | | | | | |
| Ala-Val-Pro-Ile-Thr-Pro-Thr-Leu-Asn-Arg | | | | | | |
| 141 | 150 | | | | | |
| Glu-Gln-Leu-Ser-Thr-Ser-Glu-Glu-Asn-Ser | | | | | | |
| 151 | 160 | | | | | |
| Lys-Lys-Thr-Val-Asp-Met-Glu-Ser-Thr-Glu | | | | | | |

| | |
|---|-----|
| 161 | 170 |
| Val-Phe-Thr-Lys-Lys-Thr-Lys-Leu-Thr-Glu | |
| 171 | 180 |
| Glu-Glu-Lys-Asn-Arg-Leu-Asn-Phe-Leu-Lys | |
| 181 | 190 |
| Lys-Ile-Ser-Gln-Arg-Tyr-Gln-Lys-Phe-Ala | |
| 191 | 200 |
| Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-Lys-Thr-Val-Tyr-Gln | |
| 201 | 210 |
| His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln | |
| 211 | 220 |
| Pro-Lys-Thr-Lys-Val-Ile-Pro-Tyr-Val-Arg | |
| 221 | |
| Tyr-Leu | |

Fonte: Adaptado de UniProtKB/Swiss-Prot (2022).

A α_{S2} -caseína é a mais hidrofílica de todas as caseínas como resultado dos 3 agrupamentos de grupos aniônicos compostos por resíduos de fosfoseril e glutamyl. Embora relativamente hidrofóbicos, os 47 resíduos C-terminais carregam uma carga líquida positiva (cerca de +9,5) no pH do leite (SWAISGOOD, 1992). A estrutura primária da α_{S2} -caseína pode ser representada por 4 domínios: um domínio hidrofílico N-terminal com agrupamentos aniônicos, um domínio hidrofóbico central, seguido por outro domínio hidrofílico com agrupamentos aniônicos e, finalmente, um domínio hidrofóbico C-terminal carregado positivamente (SWAISGOOD, 1992). A α_{S2} -caseína também parece ser prontamente suscetível à ação de proteólise conforme avaliado pelas atividades da quimosina e da plasmina em relação às demais proteínas (McSWEENEY et al., 1994).

β -caseína

A família β -caseína, que constitui até 36% da caseína do leite bovino, é codificada pelo gene CSN2 (ELFERINK et al., 2022; KAMIŃSKI et al., 2007), é bastante complexa devido à ação da plasmina natural do leite (EIGEL et al., 1984). A clivagem da plasmina leva à formação de $\gamma 1$ -caseína, $\gamma 2$ -caseína e $\gamma 3$ -caseína, que na verdade são fragmentos de β -caseína consistindo dos resíduos f 29-209, f 106-209 e f 108-209, respectivamente (EIGEL, 1977). A β -caseína contém 209 resíduos de aminoácidos além do peptídeo sinal com 15 resíduos de aminoácidos, tornando a pré-forma com 224 aminoácidos de comprimento (FARRELL et al., 2004).

Existem autores que afirmam que o gene da β -caseína contém 13 variantes genéticas (A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G) (KAMIŃSKI et al., 2007) outros, afirmam que contém apenas 12 variantes genéticas (A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G)

(SEBASTIANI et al., 2020; CAROLI et al., 2009) e isso acontece devido a substituição de nucleotídeos do alelo A4, encontrado em bovinos nativos coreanos, ainda não ser totalmente reconhecida pela comunidade científica (KAMIŃSKI et al., 2007). Entre eles, A1 da β -caseína e A2 da β -caseína são os mais comuns, enquanto B da β -caseína é menos comum e A3 da β -caseína e C da β -caseína são raros (FARRELL et al., 2004).

O nome de acesso da β -caseína do banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot é P02666, o *locus* é CASB_BOVIN, o gene é CSN2, o número de identificação taxonômica no NCBI é 9913, já sua identificação por mapeamento está apresentada na tabela 3.

Tabela 3. Identificação por mapeamento da proteína β -caseína obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.

| Proteína | Comprimento | Peso molecular | Ponto isoeletrico | Sequência | Variantes genéticas |
|---|-------------|----------------|-------------------|---|---------------------|
| β -caseína | 224 AA | 25,107 Da | 5,26 | 1 | 10 |
| | | | | Met-Lys-Val-Leu-Ile-Leu-Ala-Cys-Leu-Val | |
| | | | | 11 | 20 |
| | | | | Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Arg-Glu-Leu-Glu-Glu | |
| | | | | 21 | 30 |
| | | | | Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser | |
| | | | | 31 | 40 |
| | | | | Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg | |
| | | | | 41 | 50 |
| | | | | Ile-Asn-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Gln-Ser | |
| | | | | 51 | 60 |
| | | | | Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Leu | |
| | | | | 61 | 70 |
| | | | | Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr | A1 |
| | | | | 71 | 80 |
| | | | | Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro | A2 |
| | | | | 81 | 90 |
| | | | | Ile-Pro-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro | A3 |
| | | | | 91 | 100 |
| | | | | Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro | A4 |
| 101 | 110 | | | | |
| Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val | B | | | | |
| 111 | 120 | | | | |
| Ser-Lys-Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys | C | | | | |
| 121 | 130 | | | | |
| His-Lys-Glu-Met-Pro-Phe-Pro-Lys-Tyr-Pro | D | | | | |
| 131 | 140 | | | | |
| Val-Glu-Pro-Phe-Thr-Glu-Ser-Gln-Ser-Leu | E | | | | |
| 141 | 150 | | | | |
| Thr-Leu-Thr-Asp-Val-Glu-Asp-Leu-His-Leu | F | | | | |
| 151 | 160 | | | | |
| Pro-Leu-Pro-Leu-Leu-Gln-Ser-Trp-Met-His | H1 | | | | |
| 161 | 170 | | | | |
| Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Thr-Val | H2 | | | | |
| 171 | 180 | | | | |
| Met-Phe-Pro-Pro-Gln-Ser-Val-Leu-Ser-Leu | I | | | | |
| 181 | 190 | | | | |
| Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln | G | | | | |
| 191 | 200 | | | | |

Lys-Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg-Asp-Met
201 210
Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu
211 220
Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe
221
Pro-Ile-Ile-Val

Fonte: Adaptado de UniProtKB/Swiss-Prot (2022).

Existem dois alelos principais de β -caseína nas populações de gado A1 e A2 em virtude do aminoácido contido na posição 67 (TAILFORD et al., 2003). A mutação natural que deu origem a essa diferença no resíduo é o resultado de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no códon 67, no éxon 7 do gene da β -caseína, no qual CCT na variante A2 da β -caseína, codificando para prolina mudou para CAT na variante A1 da β -caseína, codificando para histidina (KAY et al., 2021; KAMIŃSKI et al., 2007; TRUSWELL, 2005). Esta diferença na sequência de aminoácidos sugere uma diferença conformacional na estrutura secundária da proteína expressa. Pode exercer influência nas propriedades físicas das suas respectivas micelas de caseína (MCLACHLAN, 2001; ELLIOTT, 1999). A presença de um aminoácido particular afeta os padrões de clivagem enzimática durante a digestão *in vitro* e *in vivo*; como é improvável que as variantes do tipo A2 da β -caseína sofram clivagem enzimática na posição 67, o polimorfismo A1 da β -caseína permite a clivagem proteolítica que resulta na liberação de diferentes peptídeos, incluindo β -casomorfina-7 (BCM-7) (SUMMER et al., 2020).

κ -caseína

A família κ -caseína que constitui até 13% da caseína do leite bovino, é codificada pelo gene CSN3 (ELFERINK et al., 2022; KAMIŃSKI et al., 2007), é formada por um componente principal livre de carboidratos e no mínimo por 6 componentes secundários. Acredita-se que o componente principal (~50%) de todas as variantes de κ -caseína seja o componente isento de carboidratos. A A-1P da κ -caseína estrutura primária da proteína é o principal componente isento de carboidratos (FARRELL et al., 2004). A κ -caseína contém 169 resíduos de aminoácidos além do peptídeo sinal com 21 resíduos de aminoácidos, tornando a pré-forma com 190 aminoácidos de comprimento (FARRELL et al., 2004).

Em geral, a κ -caseína reside na superfície da micela de caseína, embora as demais caseínas aparentemente tenham uma função que exija estruturas bem definidas, a κ -caseína pode muito bem ser mais estruturada para cumprir sua função como a interface entre as

caseínas sensíveis ao cálcio e o soro do leite (HOLT, 1992; CREAMER et al., 1991; WALSTRA et al., 1990).

A família de proteínas da κ -caseína consiste em 11 variantes genéticas (A, B, C, E, F1, F2, G1, G2, H, I, J). As variantes genéticas mais comuns são A e B da κ -caseína (NEELIN, 1964; WOYCHIK, 1964). A variante B da κ -caseína difere-se da variante A pela substituição de um resíduo Ile (isoleucina) por Thr (treonina) na posição 136 e um resíduo Ala (alanina) por Asp (ácido aspártico) na posição 148 (MERCIER et al., 1973). A variante A tende a ser predominante na maioria das raças leiteiras, com exceção do gado *Jersey* (NG-KWAI-HANG e GROSCLAUDE, 2003; BECH et al., 1990; THOMPSON et al., 1974). A variantes C da κ -caseína difere da variante A da κ -caseína pela substituição de His (histidina) 97 por Arg (arginina) 97; a variante E da κ -caseína se difere da variante A da κ -caseína pela substituição de Gly (glicina) 155 por Ser (serina) 155. A letra D foi atribuída a uma nova variante por análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), mas posteriormente descobriu-se que esta variante era idêntica a variante C da κ -caseína (ERHARDT, 1989). A variante F da κ -caseína foi descoberta por análise de reação em cadeia da polimerase (PCR) de bovinos híbridos Zebu e Preto e Branco (SULIMOVA et al., 1992) cuja análise revelou alterações de nucleotídeos que codifica Asp 148, caracterizando a variante F1 da κ -caseína e His 10, caracterizando a variante F2 da κ -caseína (PRINZENBERG et al., 1996). A variante G da κ -caseína foi relatada em raças alpinas apenas com base em géis de focalização isoelétrica, mas foi confirmada como mutação pontual por PCR; esta variante G faz com que Arg 97 de κ -caseína B seja alterado para Cys 97 (ERHARDT, 1996), caracterizando a variante genética G1 da κ -caseína foi encontrada em *Bos grunniens* (SULIMINOVA et al., 1996), por uma mutação Asp148Ala, e nos códons para os resíduos 167 e 168, observou-se uma outra variante genética caracterizada por G2 da κ -caseína. Ainda foi identificada uma mutação Thr135Ile no gado *Prinzegauer*, caracterizando assim a variante genética H da κ -caseína. Outra alteração genética foi identificada sendo na Ser104Ala, caracterizando a variante I da κ -caseína (PRINZENBERG et al., 1999). Finalmente, foi descoberto uma mutação Ser155Arg em bovinos *Bos taurus* na Costa do Marfim, caracterizando a variante genética J da κ -caseína (MAHÉ et al., 1999).

O nome de acesso da κ -caseína do banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot é P02668, o *locus* é CASK_BOVIN, o gene é CSN3, o número de identificação taxonômica no NCBI é 9913, já sua identificação por mapeamento está apresentada na tabela 4.

Tabela 4. Identificação por mapeamento da proteína κ -caseína obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.

| Proteína | Comprimento | Peso molecular | Ponto isoeletrico | Sequência | Variantes genéticas |
|-------------------|-------------|----------------|-------------------|--|---------------------|
| κ -caseína | 190 AA | 21,269 Da | 6,29 | 1 Met-Met-Lys-Ser-Phe-Phe-Leu-Val-Val-Thr | 10 |
| | | | | 11 Ile-Leu-Ala-Leu-Thr-Leu-Pro-Phe-Leu-Gly | 20 |
| | | | | 21 Ala-Gln-Glu-Gln-Asn-Gln-Glu-Gln-Pro-Ile | 30 |
| | | | | 31 Arg-Cys-Glu-Lys-Asp-Glu-Arg-Phe-Phe-Ser | 40 |
| | | | | 41 Asp-Lys-Ile-Ala-Lys-Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln | 50 |
| | | | | 51 Tyr-Val-Leu-Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly | 60 |
| | | | | 61 Leu-Asn-Tyr-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Val-Ala | 70 |
| | | | | 71 Leu-Ile-Asn-Asn-Gln-Phe-Leu-Pro-Tyr-Pro | 80 |
| | | | | 81 Tyr-Tyr-Ala-Lys-Pro-Ala-Ala-Val-Arg-Ser | 90 |
| | | | | 91 Pro-Ala-Gln-Ile-Leu-Gln-Trp-Gln-Val-Ile | 100 |
| | | | | 101 Ser-Asn-Thr-Val-Pro-Ala-Lys-Ser-Cys-Gln | 110 |
| | | | | 111 Ala-Gln-Pro-Thr-Thr-Met-Ala-Arg-His-Pro | 120 |
| | | | | 121 His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro | 130 |
| | | | | 131 Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys-Thr-Glu-Ile | 140 |
| | | | | 141 Pro-Thr-Ile-Asn-Thr-Ile-Ala-Ser-Gly-Glu | 150 |
| | | | | 151 Pro-Thr-Ser-Thr-Pro-Thr-Thr-Glu-Ala-Val | 160 |
| | | | | 161 Glu-Ser-Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Glu-Asp-Ser | 170 |
| | | | | 171 Pro-Glu-Val-Ile-Glu-Ser-Pro-Pro-Glu-Ile | 180 |
| | | | | 181 Asn-Thr-Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val | 190 |

Fonte: Adaptado de UniProtKB/Swiss-Prot (2022).

Entre as 11 variantes genéticas conhecidas da κ -caseína, a variante A e a B são as mais estudadas em termos de suas características de coagulação e produção de queijos. Estudos referentes à importância econômica da indústria de queijos observaram que o leite da variante B está associado às melhores propriedades de produção de queijos em comparação ao leite da variante A da κ -caseína para os queijos Parmesão e *Cheddar* (MARZIALI et al., 1986; MARIANI et al., 1976).

O leite da variante B para κ -caseína também está associado a maior retenção de proteína e gordura no queijo, menos gordura e menos coalhada no soro (FITZGERALD et al.,

1997; HORNE et al., 1997; NUYTS-PETIT et al., 1997; TONG et al., 1994; MARZIALI et al., 1986). A variante B está associada a uma maior concentração de κ -caseína (VAN EENENNAAM et al., 1991; NG-KWAI-HANG et al., 1987; NG-KWAI-HANG et al., 1986; KROEKER et al., 1985; McLEAN, et al., 1984) levando a micelas de caseína de menor diâmetro (HORNE et al., 1997; MORINI et al., 1975), e poderia explicar a maior eficiência de retenção de gordura da coalhada e, portanto, ao maior rendimento de queijo (HORNE et al., 1997). A substituição de aminoácidos nas duas variantes genéticas resulta em uma mudança na carga elétrica do soro e na hidrofobicidade da κ -caseína e isso afetaria o estágio primário de coagulação pela quimosina. Estudos verificaram que durante a maturação do queijo, não houve diferença entre a variante A e B para κ -caseína na formação de peptídeos de baixo peso molecular ($< 0,64$ kDa) e a presença de aminoácidos livres (WALSH et al., 1999; MAYER et al., 1997; PUHAN et al., 1994; MORINI et al., 1975), tem sido relatado que os queijos *Parmigiano-Reggiano* e *Svecia* (SCHAAR et al., 1985; MORINI et al., 1975) feitos de leite de κ -caseína B apresentaram menores taxas de proteólise durante o processo e isso pode resultar em diferenças de sabor e sabor.

2.2.2. Proteínas séricas

O termo proteínas séricas ou proteínas do soro tem sido usado para descrever o grupo de proteínas do leite que permanecem solúveis no soro após a precipitação das caseínas em pH 4,6 (ponto isoelétrico) a 20°C. Tradicionalmente, as frações β -lactoglobulina (β -lg), α -lactoalbumina (α -la), albumina sérica bovina (BSA), imunoglobulinas (Ig), lactotransferrina (Lf) e proteose-peptona foram consideradas os principais componentes dessa fração. Também é reconhecido que fragmentos proteolíticos de caseína e proteínas de membrana de glóbulos de gordura que ocorrem na fração tradicional do soro tradicional, levantando incertezas sobre a utilidade deste termo (MATHER et al., 2000; EIGEL et al., 1984). No entanto, com base no conhecimento atual, o termo proteína do soro do leite deve ser usado apenas em um sentido geral para descrever as proteínas do leite solúveis em pH 4,6 e 20°C. Produtos comerciais denominados isolados ou concentrados de proteína de soro de leite são obtidos da fabricação de queijos em pH mais alto e conterão caseínas intactas, bem como seus produtos proteolíticos, como macro peptídeos e a fração proteose-peptona. Famílias individuais, como β -lg, α -la, BSA e Lf, devem ser classificadas de acordo com a homologia com a sequência primária de suas cadeias de aminoácidos. As imunoglobulinas, proteínas não exclusivas do

leite, são produtos dos linfócitos B e são o resultado do rearranjo do segmento gênico somático e da mutação somática (FARRELL et al., 2004).

β -lactoglobulina (β -lg)

A β -lg foi a primeira proteína láctea na qual o polimorfismo foi detectado (ASCHAFFENBURG e EDREWRY, 1955). Desde então, foram descobertos polimorfismos nos genes que codificam as caseínas e grande parte das principais proteínas séricas do leite (FOX e MCSWENEY, 2003). Diferenças entre genótipos podem alterar a estrutura primária das proteínas e resultar em alterações de suas propriedades físico-químicas (HILL et al., 1996). A expressão dos genes polimórficos da β -lg está relacionada às alterações das características físico-químicas da micela de caseína, e conseqüentemente, às propriedades tecnológicas do leite, já que tal proteína está positivamente associada à estabilização da micela (ROBITAILLE, 1995).

A β -lg é a proteína encontrada em maior concentração no soro de leite bovino, representando cerca de 50% das proteínas séricas e 12% do total de proteína no leite e consiste em uma sequência de 162 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 18,4 kDa (WALSTRA et al., 2005; KONTOPIDIS et al., 2004; FOX e MCSWEENEY, 1998). A β -lg é a principal proteína do soro do leite de bovino, possui 11 variantes genéticas sendo que as variantes A e B ocorrem em maior frequência na raças bovinas e a presença de uma ou outra dessas duas variantes afeta consideravelmente as propriedades do leite em parte, devido às diferentes características físico-químicas das próprias moléculas β -lg e em parte devido a variante A ser expressa em um nível mais alto que a variante B ou a variante C da β -lg (NG-KWAI-HANG e GROSCLAUDE, 2003; HILL et al., 1996; JAKOB e PUHAN, 1992; NG-KWAI-HANG e GROSCLAUDE, 1992; ASCHAFFENBURG e DREWRY, 1957).

A variante A e a B da β -lg diferem nos aminoácidos 136 e 148, respectivamente. Para a variante A na posição 136, em que a treonina é substituída por isoleucina; e na posição 148, para a variante B, o ácido aspártico é substituído por alanina (ALEXANDER et al., 1988). A β -lactoglobulina contém 162 resíduos de aminoácidos além do peptídeo sinal com 16 resíduos de aminoácidos, tornando a pré-forma com 178 aminoácidos de comprimento (FARRELL et al., 2004).

O nome de acesso da β -lg do banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot é P02754 o *locus* é LACB_BOVIN, o gene é LGB, o número de identificação taxonômica no NCBI é 9913, já sua identificação por mapeamento está apresentada na tabela 5.

Tabela 5. Identificação por mapeamento da proteína β -Ig obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.

| Proteína | Comprimento | Peso molecular | Ponto isoelétrico | Sequência | Variantes genéticas |
|---|-------------|----------------|-------------------|---|---------------------|
| β -Ig | 178 AA | 19,883 Da | 4,93 | 1 | 10 |
| | | | | Met-Lys-Cys-Leu-Leu-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu | |
| | | | | 11 | 20 |
| | | | | Thr-Cys-Gly-Ala-Gln-Ala-Leu-Ile-Val-Thr | |
| | | | | 21 | 30 |
| | | | | Gln-Thr-Met-Lys-Gly-Leu-Asp-Ile-Gln-Lys | |
| | | | | 31 | 40 |
| | | | | Val-Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met | |
| | | | | 41 | 50 |
| | | | | Ala-Ala-Ser-Asp-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala | |
| | | | | 51 | 60 |
| | | | | Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg-Val-Tyr-Val-Glu | |
| | | | | 61 | 70 |
| | | | | Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu | A |
| | | | | 71 | 80 |
| | | | | Glu-Ile-Leu-Leu-Gln-Lys-Trp-Glu-Asn-Gly | B |
| | | | | 81 | 90 |
| | | | | Glu-Cys-Ala-Gln-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Glu | C |
| | | | | 91 | 100 |
| | | | | Lys-Thr-Lys-Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys-Ile | E |
| 101 | 110 | | | | |
| Asp-Ala-Leu-Asn-Glu-Asn-Lys-Val-Leu-Val | F | | | | |
| 111 | 120 | | | | |
| Leu-Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys-Lys-Tyr-Leu-Leu | G | | | | |
| 121 | 130 | | | | |
| Phe-Cys-Met-Glu-Asn-Ser-Ala-Glu-Pro-Glu | H | | | | |
| 131 | 140 | | | | |
| Gln-Ser-Leu-Ala-Cys-Gln-Cys-Leu-Val-Arg | I | | | | |
| 141 | 150 | | | | |
| Thr-Pro-Glu-Val-Asp-Asp-Glu-Ala-Leu-Glu | J | | | | |
| 151 | 160 | | | | |
| Lys-Phe-Asp-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-Pro | W | | | | |
| 161 | 170 | | | | |
| Met-His-Ile-Arg-Leu-Ser-Phe-Asn-Pro-Thr | | | | | |
| 171 | | | | | |
| Gln-Leu-Glu-Glu-Gln-Cys-His-Ile | | | | | |

Fonte: Adaptado de UniProtKB/Swiss-Prot (2022).

O leite da variante B contém menos β -Ig e a quantidade total de proteína no leite é compensada pela maior taxa de síntese de caseína inteira (NG-KWAI-HANG et al., 1996; HILL et al., 1994; VAN den BERG et al., 1992; RAMPILLI et al., 1988; NG-KWAI-HANG et al., 1987; NG-KWAI-HANG et al., 1986; McLEAN et al., 1984; MARIANI et al., 1979; CERBULLIS et al., 1975; ASCHAFFENBURG e EDREWRY, 1955).

Alguns pesquisadores relatam que o leite de variante B da β -Ig está associado a melhores propriedades coagulantes em relação ao leite de variante A. As perdas de componentes do leite no soro foram menores para o leite de variante B devido à maior

incorporação de gordura e proteína no queijo (VAN EENENNAAM et al., 1991; MARIANI et al., 1982; MORINI et al., 1982; FEAGAN et al., 1972; SHERBON et al., 1967).

Estudos relacionados não observaram diferenças aparentes nas características de amadurecimento em termos de taxa de proteólise e propriedades sensoriais do queijo *Cheddar* produzido com leite da variante A e B da β -lg (HILL et al., 1997; IMAFINDON et al., 1995; HILL et al., 1994). A capacidade de fabricação de queijo *Cheddar* da variante C, que ocorre em baixas frequências nos rebanhos de *Jersey* na Austrália e Nova Zelândia, foi comparada com as variantes A e B da β -lg (NG-KWAI-HANG et al., 2002; PATERSON et al., 1995; BELL et al., 1962). O rendimento de queijo ajustado a 37% de umidade do leite da variante C da β -lg foi menor do que para o leite da variante A ou B. Após ajustes feitos para os teores de gordura e caseína do leite, não foram observadas diferenças nos rendimentos de queijo para os três tipos de leite. As recuperações de gordura e proteína do leite no queijo foram semelhantes para as três variantes de β -lg. A variante B da β -lg foi associada ao menor tempo de coagulação do coalho e taxa mais rápida de firmeza do que a variante A ou que a variante C. Não houve diferença nas propriedades de coagulação entre a variante A e C da β -lg (NG-KWAI-HANG et al., 2002).

α -lactoalbumina (α -la)

A α -la é a segunda proteína do soro de leite mais abundante no leite bovino. O leite contém cerca de 1,2-1,5 g/L de α -la (FARRELL et al., 2004), representando cerca de 20% do total de proteínas séricas e cerca de 3,5% do total de proteínas do leite (O'MAHONY e FOX, 2013). Na ausência de β -lg, α -la é a proteína do soro de leite mais abundante no leite humano (LÖNNERDAL, 2003). A concentração de α -la no leite humano varia devido a vários fatores, incluindo fatores genéticos, ambientais e dietéticos (SANTOS e FERREIRA, 2007; JACKSON et al., 2004). A α -la contém 123 resíduos de aminoácidos além do peptídeo sinal com 19 resíduos de aminoácidos, tornando a pré-forma com 142 aminoácidos de comprimento (FARRELL et al., 2004).

Como a α -la é encontrada em concentrações mais elevadas no leite humano (~2,8 g/l) do que no leite bovino (~1,2 g/l), a α -la bovina é frequentemente adotada para complementar a fórmula infantil. Devido à sua alta qualidade nutricional, as preparações de α -la também são empregadas em bebidas enriquecidas com proteínas e barras nutricionais (KELLY et al., 2009).

A α -la possui 3 variantes genéticas, sendo a variante A e B da α -la as mais predominantes (BHATTACHARYA et al., 1963). A variante B está presente no leite da maioria dos bovinos *Bos taurus*, e tanto a variante A, quanto a variante B são encontradas em bovinos *Bos indicus* (JENNESS, 1974). A variante A está presente em baixa frequência em algumas raças de *Bos taurus* italianas e do leste europeu (MARIANI et al., 1977), e contém um glutamato (Glu) na posição 10 da proteína madura, e a variante B tem uma substituição arginina (Arg) nessa posição (GORDON, 1971). Uma terceira variante genética é a C, também foi relatada, mas não confirmado por sequenciamento de DNA ou proteína (BELL et al., 1981), esta variante foi identificada em bovinos da raça *Bos javanicus*. A variante C foi relatada como diferente da variante B por ter uma substituição asparagina (Asn) pelo aspartato (Asp) ou glutamina (Gln) pelo glutamato (Glu). Mais recentemente, uma nova variante genética denominada D foi identificada com uma substituição Gln para His na posição 65 (VISKER et al., 2012). Comparado ao leite bovino, nenhuma variante genética da α -la foi identificada no leite de cabra, enquanto a variante A e B foram observadas em leite de ovelha (MARTIN et al., 2013). O polimorfismo genético de α -la também foi estudado no leite humano, embora em menor grau. Alguns estudos mostraram duas variantes genéticas α -la no leite humano (SANTOS et al., 2007; CHOWANADISAI et al., 2005).

O nome de acesso da α -la do banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot é P00711 o *locus* é Q28049_BOVIN, o gene é alfaLA, o número de identificação taxonômica no NCBI é 9913, já sua identificação por mapeamento está apresentada na tabela 6.

Tabela 6. Identificação por mapeamento da proteína α -la obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.

| Proteína | Comprimento | Peso molecular | Ponto isoelétrico | Sequência | Variantes genéticas | | |
|--------------|-------------|----------------|-------------------|---|---------------------|-------------|----|
| α -la | 142 AA | 14,156 Da | 4,80 | 1 | 10 | A B C | |
| | | | | Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val | 11 | | 20 |
| | | | | Gly-Ile-Leu-Phe-His-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu | 21 | | 30 |
| | | | | Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Arg-Glu | 31 | | 40 |
| | | | | Leu-Lys-Asp-Leu-Lys-Gly-Tyr-Gly-Gly-Val | 41 | | 50 |
| | | | | Ser-Leu-Pro-Glu-Trp-Val-Cys-Thr-Thr-Phe | 51 | | 60 |
| | | | | His-Thr-Ser-Gly-Tyr-Asp-Thr-Glu-Ala-Ile | 61 | | 70 |
| | | | | Val-Gln-Asn-Asn-Asp-Ser-Thr-Gly-Tyr-Gly | 71 | | 80 |
| | | | | Leu-Phe-Gln-Ile-Asn-Asn-Lys-Ile-Trp-Cys | | | |

| | |
|---|-----|
| 81 | 90 |
| Lys-Asp-Asp-Gln-Asn-Pro-His-Ser-Ser-Asn | |
| 91 | 100 |
| Ile-Cys-Asn-Ile-Ser-Cys-Asp-Lys-Phe-Leu | |
| 101 | 110 |
| Asp-Asp-Asp-Leu-Thr-Asp-Asp-Ile-Met-Cys | |
| 111 | 120 |
| Val-Lys-Lys-Ile-Leu-Asp-Lys-Val-Gly-Ile | |
| 121 | 130 |
| Asn-Tyr-Trp-Leu-Ala-His-Lys-Ala-Leu-Cys | |
| 131 | 140 |
| Ser-Glu-Lys-Leu-Asp-Gln-Trp-Leu-Cys-Glu | |
| 142 | |
| Lys-Leu | |

Fonte: Adaptado de UniProtKB/Swiss-Prot (2022).

A proteína do soro do leite α -la, tem uma função fisiológica específica e definida na glândula mamária. Dentro do complexo de Golgi da célula epitelial mamária, α -la interage com a enzima β -1,4-galactosiltransferase expressa de forma ubíqua para formar o complexo lactose sintase. A α -la modifica a especificidade do substrato da β -1,4-galactosiltransferase, permitindo a formação de lactose a partir de glicose e UDP-galactose (FARRELL et al., 2004).

A participação da α -la é relatada na síntese de lactose na glândula mamária, sendo a principal função biológica, regulação da produção de lactose e da secreção do leite, que facilita a produção de leite, e é tida como fonte de energia no recém-nascido (LONNERDAL e LIEN, 2003; WIT, 1998). A α -la também é relatada como tendo atividade anti-carcinogênica, em culturas de linha de células de câncer de mamífero, demonstrou-se restringir a divisão celular (GANJAM et al., 1997) e induzir apoptose (HAKANSSON et al., 1995). Devido ao alto teor de triptofano da α -la (~6% p/p), sugere-se ser uma boa fonte de triptofano (~4,8% p/p) para a síntese do neurotransmissor serotonina (MADUREIRA et al., 2007). Além disso, uma dieta rica em α -la tende a aumentar as proporções de aminoácidos neutros grandes de triptofano no plasma e o desempenho cognitivo em indivíduos vulneráveis ao estresse (MARKUS et al., 2005).

Albumina Sérica Bovina (BSA)

A albumina sérica, a principal proteína encontrada no soro sanguíneo, ocorre em todos os tecidos e secreções do corpo; tem um papel principal no transporte, metabolismo e distribuição de ligantes contribuindo para a pressão osmótica do sangue e conferindo proteção contra radicais livres (CARTER e HO, 1994). A BSA encontrada no leite é fisicamente e

imunologicamente (COULSON e STEVENS, 1950; POLIS et al., 1950) idêntica à albumina sérica do sangue, e representa cerca de 1,5% da proteína total do leite e cerca de 8% da proteína total do soro do leite (FARRELL et al., 2004).

A BSA é encontrada no leite em uma concentração de aproximadamente 0,13 g/L (LEVIEUX et al., 1999), não é sintetizada pela glândula mamária, mas é extravasada da corrente sanguínea para o leite. A BSA é relatada como uma proteína muito funcional, ligando-se a lipídios, ácidos graxos livres e compostos de sabor (KINSELLA et al., 1989) e também forma géis firmes semelhantes aos da β -lg (MATSUDOMI et al., 1991) e a firmeza do gel é aumentada quando proteínas como α -la e β -lg estão presentes (MATSUDOMI et al., 1994, 1992). A BSA também é relacionada com propriedades emulsificantes e antioxidantes que protegem os lipídios contra a oxidação induzida por fenólicos (SAITO et al., 2006; TONG et al., 2000; WANISKA et al., 1981).

O nome de acesso da BSA do banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot é P02769 o *locus* é ALBU_BOVIN, o gene é ALB, o número de identificação taxonômica no NCBI é 9913, já sua identificação por mapeamento está apresentada na tabela 7.

Tabela 7. Identificação por mapeamento da proteína BSA obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.

| Proteína | Comprimento | Peso molecular | Ponto isoelétrico | Sequência |
|---|-------------|----------------|-------------------|---|
| BSA | 607 AA | 69,293 Da | 5,82 | 1 |
| | | | | Met-Lys-Trp-Val-Thr-Phe-Ile-Ser-Leu-Leu |
| | | | | 11 |
| | | | | Leu-Leu-Phe-Ser-Ser-Ala-Tyr-Ser-Arg-Gly |
| | | | | 21 |
| | | | | Val-Phe-Arg-Arg-Asp-Thr-His-Lys-Ser-Glu |
| | | | | 31 |
| | | | | Ile-Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly-Glu |
| | | | | 41 |
| | | | | Glu-His-Phe-Lys-Gly-Leu-Val-Leu-Ile-Arg |
| | | | | 51 |
| | | | | Phe-Ser-Gln-Tyr-Leu-Gln-Gln-Cys-Pro-Phe |
| | | | | 61 |
| | | | | Asp-Glu-His-Val-Lys-Leu-Val-Asn-Glu-Leu |
| | | | | 71 |
| | | | | Thr-Glu-Phe-Ala-Lys-Thr-Cys-Val-Ala-Asp |
| | | | | 81 |
| Glu-Ser-His-Ala-Gly-Cys-Glu-Lys-Ser-Leu | | | | |
| 91 | | | | |
| His-Thr-Leu-Phe-Gly-Asp-Glu-Leu-Cys-Lys | | | | |
| 101 | | | | |
| Va-Ala-Ser-Leu-Arg-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp | | | | |
| 111 | | | | |
| Met-Ala-Asp-Cys-Cys-Glu-Lys-Gln-Glu-Pro | | | | |
| 121 | | | | |
| 130 | | | | |

| | |
|---|-----|
| Glu-Arg-Asn-Glu-Cys-Phe-Leu-Ser-His-Lys | |
| 131 | 140 |
| Asp-Asp-Ser-Pro-Asp-Leu-Pro-Lys-Leu-Lys | |
| 141 | 150 |
| Pro-Asp-Pro-Asn-Thr-Leu-Cys-Asp-Glu-Phe | |
| 151 | 160 |
| Lys-Ala-Asp-Glu-Lys-Lys-Phe-Trp-Gly-Lys | |
| 161 | 170 |
| Tyr-Leu-Tyr-Glu-Ile-Ala-Arg-Arg-His-Pro | |
| 171 | 180 |
| Tyr-Phe-Tyr-Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Tyr-Tyr | |
| 181 | 190 |
| Ala-Asn-Lys-Tyr-Asn-Gly-Val-Phe-Gln-Glu | |
| 191 | 200 |
| Cys-Cys-Gln-Ala-Glu-Asp-Lys-Gly-Ala-Cys | |
| 201 | 210 |
| Leu-Leu-Pro-Lys-Ile-Glu-Thr-Met-Arg-Glu | |
| 211 | 220 |
| Lys-Val-Leu-Ala-Ser-Ser-Ala-Arg-Gln-Arg | |
| 221 | 230 |
| Leu-Arg-Cys-Ala-Ser-Ile-Gln-Lys-Phe-Gly | |
| 231 | 240 |
| Glu-Arg-Ala-Leu-Lys-Ala-Trp-Ser-Val-Ala | |
| 241 | 250 |
| Arg-Leu-Ser-Gln-Lys-Phe-Pro-Lys-Ala-Glu | |
| 251 | 260 |
| Phe-Val-Glu-Val-Thr-Lys-Leu-Val-Thr-Asp | |
| 261 | 270 |
| Leu-Thr-Lys-Val-His-Lys-Glu-Cys-Cys-His | |
| 271 | 280 |
| Gly-Cys-Leu-Leu-Glu-Cys-Ala-Asp-Asp-Arg | |
| 281 | 290 |
| Ala-Asp-Leu-Ala-Lys-Tyr-Ile-Cys-Asp-Asn | |
| 291 | 300 |
| Gln-Asp-Thr-Ile-Ser-Ser-Lys-Leu-Lys-Glu | |
| 301 | 310 |
| Cys-Cys-Asp-Lys-Pro-Leu-Leu-Glu-Lys-Ser | |
| 311 | 320 |
| His-Cys-Ile-Ala-Glu-Val-Glu-Lys-Asp-Ala | |
| 321 | 330 |
| Ile-Pro-Glu-Asn-Leu-Pro-Pro-Leu-Thr-Ala | |
| 331 | 340 |
| Asp-Phe-Ala-Glu-Asp-Lys-Asp-Val-Cys-Lys | |
| 341 | 350 |
| Asn-Tyr-Gln-Glu-Ala-Lys-Asp-Ala-Phe-Leu | |
| 351 | 360 |
| Gly-Ser-Phe-Leu-Tyr-Glu-Tyr-Ser-Arg-Arg | |
| 361 | 370 |
| His-Pro-Glu-Tyr-Ala-Val-Ser-Val-Leu-Leu | |
| 371 | 380 |
| Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Tyr-Glu-Ala-Thr-Leu | |
| 381 | 390 |
| Glu-Glu-Cys-Cys-Ala-Lys-Asp-Asp-Pro-His | |
| 391 | 400 |
| Ala-Cys-Tyr-Ser-Thr-Val-Phe-Asp-Lys-Leu | |
| 401 | 410 |
| Lys-His-Leu-Val-Asp-Glu-Pro-Gln-Asn-Leu | |
| 411 | 420 |
| Ile-Lys-Gln-Asn-Cys-Asp-Gln-Phe-Glu-Lys | |

| | |
|---|-----|
| 421 | 430 |
| Leu-Gly-Glu-Tyr-Gly-Phe-Gln-Asn-Ala-Leu | |
| 431 | 440 |
| Ile-Val-Arg-Tyr-Thr-Arg-Lys-Val-Pro-Gln | |
| 441 | 450 |
| Val-Ser-Thr-Pro-Thr-Leu-Val-Glu-Val-Ser | |
| 451 | 460 |
| Arg-Ser-Leu-Gly-Lys-Val-Gly-Thr-Arg-Cys | |
| 461 | 470 |
| Cys-Thr-Lys-Pro-Glu-Ser-Glu-Arg-Met-Pro | |
| 471 | 480 |
| Cys-Thr-Glu-Asp-Tyr-Leu-Ser-Leu-Ile-Leu | |
| 481 | 490 |
| Asn-Arg-Leu-Cys-Val-Leu-His-Glu-Lys-Thr | |
| 491 | 500 |
| Pro-Val-Ser-Glu-Lys-Val-Thr-Lys-Cys-Cys | |
| 501 | 510 |
| Thr-Glu-Ser-Leu-Val-Asn-Arg-Arg-Pro-Cys | |
| 511 | 520 |
| Phe-Ser-Ala-Leu-Thr-Pro-Asp-Glu-Thr-Tyr | |
| 521 | 530 |
| Val-Pro-Lys-Ala-Phe-Asp-Glu-Lys-Leu-Phe | |
| 531 | 540 |
| Thr-Phe-His-Ala-Asp-Ile-Cys-Thr-Leu-Pro | |
| 541 | 550 |
| Asp-Thr-Glu-Lys-Gln-Ile-Lys-Lys-Gln-Thr | |
| 551 | 560 |
| Ala-Leu-Val-Glu-Leu-Leu-Lys-His-Lys-Pro | |
| 561 | 570 |
| Lys-Ala-Thr-Glu-Glu-Gln-Leu-Lys-Thr-Val | |
| 571 | 580 |
| Met-Glu-Asn-Phe-Val-Ala-Phe-Val-Asp-Lys | |
| 581 | 590 |
| Cys-Cys-Ala-Ala-Asp-Asp-Lys-Glu-Ala-Cys | |
| 591 | 600 |
| Phe-Ala-Val-Glu-Gly-Pro-Lys-Leu-Val-Val | |
| 601 | 607 |
| Ser-Thr-Gln-Thr-Ala-Leu-Ala | |

Fonte: Adaptado de UniProtKB/Swiss-Prot (2022).

Imunoglobulina (Ig)

As Igs são glicoproteínas globulares encontradas no leite e colostro bovino, cada uma compreendendo dois subdomínios glicosilados “pesados” e dois subdomínios de cadeia “leve” projetados para ligar antígenos e induzir processos de defesa do hospedeiro e, assim, oferecer imunidade passiva ao lactante. As quatro Igs encontradas no leite bovino são IgG1, IgG2, IgA e IgM em concentrações de aproximadamente 0,60, 0,12, 0,13 e 0,04 g/l, respectivamente (GAPPER et al., 2007; KORHONEN et al., 2000). Concentrações muito mais altas de imunoglobulinas são encontradas no sangue e no colostro. As imunoglobulinas estão presentes no colostro e leite para proteger a mucosa intestinal contra microrganismos

patogênicos. No colostro, elas estão presentes em concentrações mais altas para conferir imunidade passiva ao neonato ruminante até que seu sistema imunológico amadureça (KELLY et al., 2009).

As Igs são intrinsecamente heterogêneas devido à sua função fisiológica, particularmente na sequência primária responsável pela ligação ao antígeno e são proteínas nutricionalmente valiosas devido à sua riqueza em aminoácidos contendo enxofre. O colostro, que é a fonte mais rica de Igs bovinas, está em desenvolvimento particular como ingrediente de alimentos e bebidas, visando mercados globais lucrativos e em ascensão. Igs derivadas de leite bovino e colostro são frequentemente adicionadas à fórmula infantil e outros produtos alimentícios para ajudar a reduzir infecções virais e microbianas e melhorar a imunidade passiva do indivíduo. O colostro é uma fonte muito rica de Igs e está sendo comercializado como um suplemento esportivo para melhorar o desempenho (GAPPER et al., 2007).

Lactoferrina ou Lactotransferrina (LF)

Uma família de proteínas específicas de ligação ao ferro ocorre no leite. A principal proteína bovina é a LF ou lactotransferrina para distinguí-la da transferrina sérica que também ocorre no leite, particularmente no colostro (GROVES 1971, 1960). A LF é de origem mamária e pode ser encontrada no leite da maioria das espécies (SCHANBACHER et al., 1993). No entanto, a LF também ocorre em secreções de outras células epiteliais bem como em leucócitos polimorfonucleares (BAGGIOLINI, 1972; MASSON et al., 1966). A proteína de referência mamária ocorre em uma concentração entre 20 e 200 µg/L. A concentração real varia e aumenta visivelmente em resposta à inflamação ou infecção (FARRELL et al., 2004).

A LF é o menor componente proteico do leite, encontrado em uma concentração entre 31 e 350 µg/ml, dependendo do estágio de lactação, quantidade de leite produzida e contagem de células somáticas (CHENG et al., 2008). A LF é uma glicoproteína de ligação de ferro de peso molecular de 80.000 Da, da família das transferrinas encontrada na maioria dos fluidos biológicos e envolvida no sistema imunológico inato dos mamíferos. A LF é encontrada como nativa, apo-LF sem ferro (<5% da saturação), enquanto a LF saturada de ferro é conhecida como e holo- LF (HABIB et al., 2021).

Além das propriedades antimicrobianas da LF, também é relatado que possui propriedades estimulantes do sistema imunológico. Acredita-se que a capacidade da LF de melhorar o sistema imunológico seja devido à sua capacidade de aumentar a atividade dos macrófagos, induzir citocinas inflamatórias, incluindo interleucina-8, fator de necrose tumoral

alfa e óxido nítrico, e estimular a proliferação de linfócitos, monócitos ativos, células natural *killer* e neutrófilos (MADUREIRA et al., 2007; LEGRAND et al., 2005).

A LF também é relatada como tendo propriedades anticancerígenas (PARODI, 2007), por aumentar a deposição de cálcio nos osteoblastos (TAKAYAMA e MIZUMACHI, 2008) e por melhorar o desempenho de crescimento de animais de criação (MADUREIRA et al., 2007; WANG et al., 2008).

O nome de acesso da LF do banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot é P24627 o *locus* é TRFL_BOVIN, o gene é LTF, o número de identificação taxonômica no NCBI é 9913, já sua identificação por mapeamento está apresentada na tabela 8.

Tabela 8. Identificação por mapeamento da proteína LF obtida pelo banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot e do ExPASy.

| Proteína | Comprimento | Peso molecular | Ponto isoeletrico | Sequência |
|----------|-------------|----------------|-------------------|---|
| | | | | 1 10 |
| | | | | Met-Lys-Leu-Phe-Val-Pro-Ala-Leu-Leu-Ser |
| | | | | 11 20 |
| | | | | Leu-Gly-Ala-Leu-Gly-Leu-Cys-Leu-Ala-Ala |
| | | | | 21 30 |
| | | | | Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile |
| | | | | 31 40 |
| | | | | Ser-Gln-Pro-Glu-Trp-Phe-Lys-Cys-Arg-Arg |
| | | | | 41 50 |
| | | | | Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala |
| | | | | 51 60 |
| | | | | Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe |
| | | | | 61 70 |
| | | | | Ala-Leu-Glu-Cys-Ile-Arg-Ala-Ile-Arg-Glu |
| | | | | 71 80 |
| | | | | Lys-Lys-Ala-Asp-Ala-Val-Thr-Leu-Asp-Gly |
| | | | | 81 90 |
| | | | | Gly-Met-Val-Phe-Glu-Ala-Gly-Arg-Asp-Pro |
| LF | 708 AA | 78,056 Da | 8,69 | 91 100 |
| | | | | Tyr-Lys-Leu-Arg-Pro-Val-Ala-Ala-Glu-Ile |
| | | | | 101 110 |
| | | | | Tyr-Gly-Thr-Lys-Glu-Ser-Pro-Gln-Thr-His |
| | | | | 111 120 |
| | | | | Tyr-Tyr-Ala-Val-Ala-Val-Val-Lys-Lys-Gly |
| | | | | 121 130 |
| | | | | Ser-Asn-Phe-Gln-Leu-Asp-Gln-Leu-Gln-Gly |
| | | | | 131 140 |
| | | | | Arg-Lys-Ser-Cys-His-Thr-Gly-Leu-Gly-Arg |
| | | | | 141 150 |
| | | | | Ser-Ala-Gly-Trp-Ile-Ile-Pro-Met-Gly-Ile |
| | | | | 151 160 |
| | | | | Leu-Arg-Pro-Tyr-Leu-Ser-Trp-Thr-Glu-Ser |
| | | | | 161 170 |
| | | | | Leu-Glu-Pro-Leu-Gln-Gly-Ala-Val-Ala-Lys |
| | | | | 171 180 |
| | | | | Phe-Phe-Ser-Ala-Ser-Cys-Val-Pro-Cys-Ile |
| | | | | 181 190 |

| | |
|---|-----|
| Asp-Arg-Gln-Ala-Tyr-Pro-Asn-Leu-Cys-Gln | 200 |
| 191 | |
| Leu-Cys-Lys-Gly-Glu-Gly-Glu-Asn-Gln-Cys | 210 |
| 201 | |
| Ala-Cys-Ser-Ser-Arg-Glu-Pro-Tyr-Phe-Gly | 220 |
| 211 | |
| Tyr-Ser-Gly-Ala-Phe-Lys-Cys-Leu-Gln-Asp | 230 |
| 221 | |
| Gly-Ala-Gly-Asp-Val-Ala-Phe-Val-Lys-Glu | 240 |
| 231 | |
| Thr-Thr-Val-Phe-Glu-Asn-Leu-Pro-Glu-Lys | 250 |
| 241 | |
| Ala-Asp-Arg-Asp-Gln-Tyr-Glu-Leu-Leu-Cys | 260 |
| 251 | |
| Leu-Asn-Asn-Ser-Arg-Ala-Pro-Val-Asp-Ala | 270 |
| 261 | |
| Phe-Lys-Glu-Cys-His-Leu-Ala-Gln-Val-Pro | 280 |
| 271 | |
| Ser-His-Ala-Val-Val-Ala-Arg-Ser-Val-Asp | 290 |
| 281 | |
| Gly-Lys-Glu-Asp-Leu-Ile-Trp-Lys-Leu-Leu | 300 |
| 291 | |
| Ser-Lys-Ala-Gln-Glu-Lys-Phe-Gly-Lys-Asn | 310 |
| 301 | |
| Lys-Ser-Arg-Ser-Phe-Gln-Leu-Phe-Gly-Ser | 320 |
| 311 | |
| Pro-Pro-Gly-Gln-Arg-Asp-Leu-Leu-Phe-Lys | 330 |
| 321 | |
| Asp-Ser-Ala-Leu-Gly-Phe-Leu-Arg-Ile-Pro | 340 |
| 331 | |
| Ser-Lys-Val-Asp-Ser-Ala-Leu-Tyr-Leu-Gly | 350 |
| 341 | |
| Ser-Arg-Tyr-Leu-Thr-Thr-Leu-Lys-Asn-Leu | 360 |
| 351 | |
| Arg-Glu-Thr-Ala-Glu-Glu-Val-Lys-Ala-Arg | 370 |
| 361 | |
| Tyr-Thr-Arg-Val-Val-Trp-Cys-Ala-Val-Gly | 380 |
| 371 | |
| Pro-Glu-Glu-Gln-Lys-Lys-Cys-Gln-Gln-Trp | 390 |
| 381 | |
| Ser-Gln-Gln-Ser-Gly-Gln-Asn-Val-Thr-Cys | 400 |
| 391 | |
| Ala-Thr-Ala-Ser-Thr-Thr-Asp-Asp-Cys-Ile | 410 |
| 401 | |
| Val-Leu-Val-Leu-Lys-Gly-Glu-Ala-Asp-Ala | 420 |
| 411 | |
| Leu-Asn-Leu-Asp-Gly-Gly-Tyr-Ile-Tyr-Thr | 430 |
| 421 | |
| Ala-Gly-Lys-Cys-Gly-Leu-Val-Pro-Val-Leu | 440 |
| 431 | |
| Ala-Glu-Asn-Arg-Lys-Ser-Ser-Lys-His-Ser | 450 |
| 441 | |
| Ser-Leu-Asp-Cys-Val-Leu-Arg-Pro-Thr-Glu | 460 |
| 451 | |
| Gly-Tyr-Leu-Ala-Val-Ala-Val-Val-Lys-Lys | 470 |
| 461 | |
| Ala-Asn-Glu-Gly-Leu-Thr-Trp-Asn-Ser-Leu | 480 |
| 471 | |
| Lys-Asp-Lys-Lys-Ser-Cys-His-Thr-Ala-Val | |

| | |
|---|-----|
| 481 | 490 |
| Asp-Arg-Thr-Ala-Gly-Trp-Asn-Ile-Pro-Met | |
| 491 | 500 |
| Gly-Leu-Ile-Val-Asn-Gln-Thr-Gly-Ser-Cys | |
| 501 | 510 |
| Ala-Phe-Asp-Glu-Phe-Phe-Ser-Gln-Ser-Cys | |
| 511 | 520 |
| Ala-Pro-Gly-Ala-Asp-Pro-Lys-Ser-Arg-Leu | |
| 521 | 530 |
| Cys-Ala-Leu-Cys-Ala-Gly-Asp-Asp-Gln-Gly | |
| 531 | 540 |
| Leu-Asp-Lys-Cys-Val-Pro-Asn-Ser-Lys-Glu | |
| 541 | 550 |
| Lys-Tyr-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Gly-Ala-Phe-Arg | |
| 551 | 560 |
| Cys-Leu-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Asp-Val-Ala | |
| 561 | 570 |
| Phe-Val-Lys-Asn-Asp-Thr-Val-Trp-Glu-Asn | |
| 571 | 580 |
| Thr-Asn-Gly-Glu-Ser-Thr-Ala-Asp-Trp-Ala | |
| 581 | 590 |
| Lys-Asn-Leu-Asn-Arg-Glu-Asp-Phe-Arg-Leu | |
| 591 | 600 |
| Leu-Cys-Leu-Asp-Gly-Thr-Arg-Lys-Pro-Val | |
| 601 | 610 |
| Thr-Glu-Ala-Gln-Ser-Cys-His-Leu-Ala-Val | |
| 611 | 620 |
| Ala-Pro-Asn-His-Ala-Val-Val-Ser-Arg-Ser | |
| 621 | 630 |
| Asp-Arg-Ala-Ala-His-Val-Lys-Gln-Val-Leu | |
| 631 | 640 |
| Leu-His-Gln-Gln-Ala-Leu-Phe-Gly-Lys-Asn | |
| 641 | 650 |
| Gly-Lys-Asn-Cys-Pro-Asp-Lys-Phe-Cys-Leu | |
| 651 | 660 |
| Phe-Lys-Ser-Glu-Thr-Lys-Asn-Leu-Leu-Phe | |
| 661 | 670 |
| Asn-Asp-Asn-Thr-Glu-Cys-Leu-Ala-Lys-Leu | |
| 671 | 680 |
| Gly-Gly-Arg-Pro-Thr-Tyr-Glu-Glu-Tyr-Leu | |
| 681 | 690 |
| Gly-Thr-Glu-Tyr-Val-Thr-Ala-Ile-Ala-Asn | |
| 691 | 700 |
| Leu-Lys-Lys-Cys-Ser-Thr-Ser-Pro-Leu-Leu | |
| 701 | 708 |
| Glu-Ala-Cys-Ala-Phe-Leu-Thr-Arg | |

Fonte: Adaptado de UniProtKB/Swiss-Prot (2022).

2.1. LEITE PROVENIENTE DE VACAS PORTADORAS DO GENÓTIPO A2A2 PARA β -CASEÍNA

A produção de leite e sua composição estão sujeitas às constantes influências que as modificam. Vários fatores interferem de forma complexa na qualidade do leite, entre eles: fator genético (espécie, raça dos animais, individualidade animal), fatores intrínsecos do

animal (idade, estágio de lactação, número de lactações), fatores nutricionais (tipo de alimento e disponibilidade, forma de conservação, adequação da dieta às exigências do animal) e fatores ambientais (condições ambientais, estresse, estação do ano, manejo) (FERRARI et al., 2022; ZANELA et al., 2015; STOOP et al., 2009). Além disso, a qualidade do leite cru e segurança dos alimentos dependem de fatores extrínsecos (sanidade, contagem microbiana e de células somáticas e ausência de resíduos de contaminantes químicos e biológicos) (AKKERMAN et al., 2021).

É sabido que o leite obtido de diferentes raças da mesma espécie e submetidos ao mesmo sistema de criação, incluindo a alimentação é caracterizado por apresentarem composição físico-química parecida, mas não iguais (POULSEN et al., 2016). Dentro da mesma raça, diferentes vacas podem produzir leite com diferentes variantes genéticas das principais frações proteicas, e em diferentes raças as frequências dessas variantes genéticas não são as mesmas (CAROLI et al., 2009). Além disso, a concentração de uma determinada fração proteica no leite e suas variantes genéticas não são independentes entre si, pois diferentes variantes genéticas podem apresentar oscilações nos níveis de penetrância, causando diferenças nas concentrações dessa fração proteica no leite (HECK et al., 2009). De fato, o polimorfismo nos genes que codificam as principais frações proteicas do leite é responsável por mudanças qualitativas e quantitativas no perfil proteico do leite (AMALFITANO et al., 2020).

Com base nos fatores genéticos, recentemente, a qualidade foi associada a um polimorfismo de nucleotídeo único no gene CSN2, essencial para a codificação da β -caseína (DANILOSKI et al., 2021). A β -caseína do leite possui 209 aminoácidos, peso molecular de 25,107 Da, ponto isoelétrico de 5,26 e 13 variantes genéticas A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G (UNIPROTKB/SWISS-PROT, 2022; GALLINAT et al., 2013; CAROLI et al., 2009; KAMIŃSKI et al., 2007) sendo as variantes genéticas mais comuns A1 e A2 da β -caseína (GUANTARIO et al., 2020). A variante genética A2, que é a variante ancestral compartilhada com outras espécies silvestres e domésticas relacionadas aos animais de origem zebuína (*Bos indicus*) (BISUTTI et al., 2022), enquanto a variante genética A1 da β -caseína é frequentemente encontrada nos animais de origem taurina (*Bos taurus*), sendo maior nas raças Holandesa e Pardo-Suíço, intermediária na raça Jersey e muito baixa na raça Guernsey (KAMIŃSKI et al., 2007).

A diferença entre as variantes genéticas A1 e a A2 da β -caseína é devido ao polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) códon 67, no éxon 7, do gene CSN2 da β -caseína em que ocorre a substituição de um resíduo de aminoácido prolina (Pro) na variante A2 por

um resíduo de aminoácido histidina (His) na variante A1 (SUMMER et al., 2020; KAMIŃSKI et al., 2007; TRUSWELL, 2005). A presença desse SNP, codificada pelo gene CSN2, identificado por BTA6.88331153, no cromossomo 6, na posição 88331153 sob número de identificação no banco de dados de SNP rs43703011 foi observada por Nilsen et al. (2009).

Enquanto a variante genética A2 da β -caseína apresenta uma ligação peptídica entre prolina e isoleucina (Pro-Ile), a variante genética A1 apresenta a ligação peptídica entre histidina e isoleucina (His-Ile). Essa diferença estrutural tem sido foco de diversas pesquisas (ASLEDOTTIR et al., 2018; NGUYEN et al., 2018; BROOKE-TAYLOR et al., 2017), pois esta diferença conformacional na estrutura secundária da proteína expressa, pode exercer influência sobre as propriedades físico-químicas e microestruturais do leite (ENGUYEN et al., 2018; McLACHLAN, 2001; LLIOTT et al., 1999) e, também, porque as proteases intestinais atuam mais fortemente na ligação His-Ile, resultando no aparecimento de um peptídeo bioativo, a β -casomorfina-7 (BCM-7) (ASLEDOTTIR et al., 2018; DE NONI et al., 2010; JINSMAA et al., 1999). A β -caseína bovina é fonte de peptídeos bioativos que manifestam atividades antimicrobianas, anti-hipertensiva, antitrombótica e imunomoduladora (PHELAN et al., 2009; CLARE et al., 2000).

Biopeptídeos, peptídeos biologicamente ativos (bioativos) ou bio-funcionais são fragmentos específicos de proteínas que têm efeito positivo nas funções ou condições do corpo e podem exercer influências na saúde (KITTS e WEILER, 2003). Tais peptídeos, são inativos dentro da sequência da proteína original e podem ser liberados por proteólise enzimática durante a digestão gastrointestinal (hidrólise no estômago por enzimas digestivas) ou no processamento de alimentos (digestão) ou maturação durante o processamento tecnológico), ou produzidos pelo próprio organismo. A proteólise durante a fermentação do leite e a maturação do queijo (usando enzimas microbianas) também leva à formação de vários peptídeos bioativos (FITZGERALD et al., 2006; KORHONEN et al., 2006; GOBBETTI et al., 2002; KOSTYRA et al., 2002; JINSMAA et al., 1999; KORHONEN et al., 1998; HARTWIG et al., 1997; MEISEL, 1997).

Os peptídeos bioativos originados da proteólise das caseínas com ação opióide apresentam atividade semelhante à dos opióides endógenos (endorfinas) que atuam tanto no sistema nervoso central como em órgãos periféricos produzindo vários efeitos fisiológicos. Peptídeos opióides derivados da caseína são denominados casomorfina (NÓBREGA, 2017).

O termo “opioide” refere-se a substâncias químicas que têm uma atividade semelhante à da morfina no corpo. Alguns deles são conhecidos por desempenhar um papel importante na

resposta ao estresse e à dor e no controle da ingestão de alimentos. Esses agentes agem ligando-se aos μ -receptores opioides, que são encontrados principalmente no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal (TESCHEMACHER, 2003).

Os diferentes opioides liberados da β -caseína são chamados de β -casomorfina (BCMs). Essas casomorfina criptografadas são formadas por proteólise enzimática ou alguns outros procedimentos, como fermentação usando culturas proteolíticas ou proteólise por enzimas microbianas ou derivadas de plantas, podendo até liberar esses peptídeos criptografados. Vários outros fatores que determinam o tipo de formação de β -casomorfina de produtos lácteos incluem tratamentos térmicos, a sanidade da glândula mamária e, por último, mas não menos importante, a sequência de β -caseína também determina os BCMs específicos liberados do leite ou derivados (SODHI, 2022).

As β -casomorfina (BCMs) são um grupo de peptídeos originários da β -caseína com um comprimento de cadeia de 4 a 11 aminoácidos, todos começando com um resíduo de tirosina (Tyr) na posição 60 (KOSTYRA et al., 2004). O grupo desses peptídeos isolados da β -caseína bovina são a BCM-4 [60 (Tyr-Pro-Phe-Pro) 63], BCM-5 [60 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly) 64], BCM-6 [60 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro) 65], BCM-7 [60 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) 66], BCM-8 [60 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro) 67], BCM-9 [60 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn) 68], BCM-10 [60 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn-Ser) 69], BCM-11 [60 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu) 70] (EFSA, 2009; TOELSTEDE et al., 2008; KAMIŃSKI et al., 2007; SAITO et al., 2000).

A BCM-7 da β -caseína foi isolada pela primeira vez em 1979, como sendo um peptídeo opioide que possui características farmacológicas semelhantes às do ópio (morfina) (BRANTL et al., 1979). Este peptídeo bioativo exibe uma forte atividade opiácea (KUREK et al., 1992) e demonstrou *in vitro* estimular a proliferação de linfócitos T humanos (GILL et al., 2000) e a ativação das propriedades citomodulatórias (MEISEL et al., 1999).

Foi demonstrado que *in vitro* o peptídeo bioativo BCM-7 da β -caseína é produzido pela sucessiva digestão gastrointestinal por ação de enzimas proteolíticas (elastase pepsina, pancreática e leucina aminopeptidase) sob as variantes genéticas A1 e B da β -caseína, não acontecendo na variante A2 (CIESLINSKA et al., 2007; JINSMAA et al., 1999; HARTWIG 1997). A enzima elastase cliva a ligação peptídica entre os aminoácidos Ile e His, liberando o terminal carboxil de BCM-7 da β -caseína bovina e as enzimas pepsina e leucina aminopeptidase agem liberando o terminal amino deste peptídeo (ELLIOTT et al., 1999; JINSMAA et al., 1999), conforme observado na Figura 1.

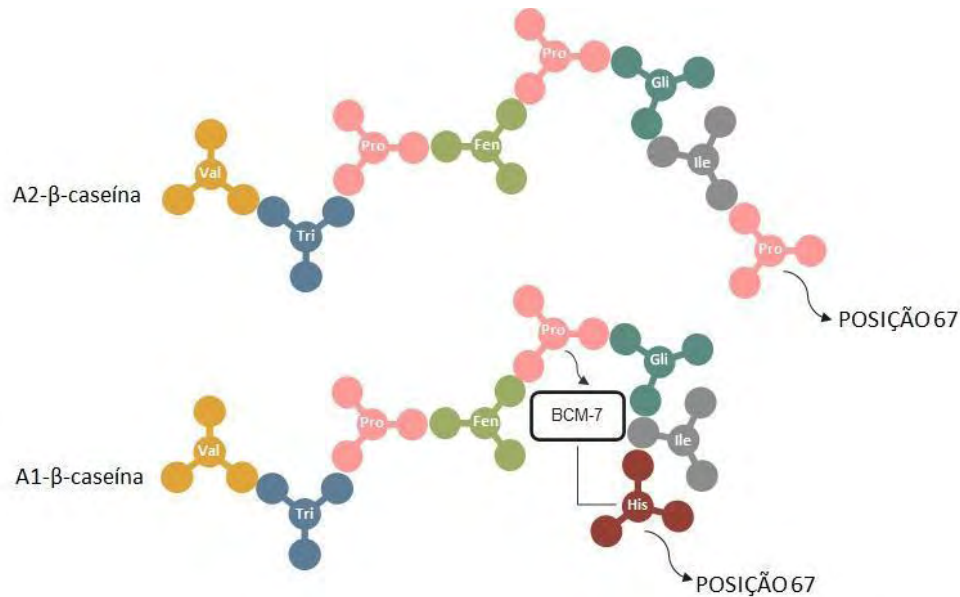


Figura 1. Esquema ilustrativo demonstrando a diferença no aminoácido 6, no códon 67, no éxon 7 do gene CSN2 para as variantes genéticas A1 e A2 da β -caseína e a sua consequente quebra e liberação da β -casomorfina-7.

Fonte: autoria própria (2023).

A BCM-7 é um agonista do receptor μ -opioide e é considerada potencial causadora de inúmeras doenças não transmissíveis relacionadas a desconfortos gastrointestinais (DANILOSKI et al., 2021; KAY et al., 2021). A BCM-7 da β -caseína é produzida até quatro vezes mais, na variante genética A1 da β -caseína (KAMIŃSKI et al., 2007; JINSMAA e YOSHIKAWA, 1999) e ela pode aumentar o risco de doenças crônicas (CIEŚLIŃSKA et al., 2012, 2007), doença cardíaca isquêmica humana, arteriosclerose, diabetes tipo 1, síndrome da morte súbita do lactente (TAILFORD et al., 2003; SUN et al., 2003, 1999; BIRGISDÓTTIR, 2002; MCLACHLAN, 2001; THORSODDOTTIR et al., 2000; ELLIOTT et al., 1999). Este peptídeo bioativo é absorvido por regiões cerebrais relevantes para a esquizofrenia e o autismo (SUN et al., 1999). Essas regiões também são promotoras ou integrantes de vias dopaminérgicas, serotoninérgicas e gabaérgicas, além de interagir com receptores de serotonina 5-HT₂, podendo afetar todos esses sistemas (SOKOLOV et al., 2005).

Sodhi et al. (2022) afirmam existir uma relação entre o risco de doença e o consumo de uma fração específica de β -caseína com variantes genéticas A1 ou A2. Sugerem que a BCM-7 esteja associada como um fator de risco para à saúde humana, pois pode afetar vários receptores opioides no sistema nervoso, endócrino e imunológico. Também relatam que a BCM-7 é conhecida por ser um oxidante de lipoproteínas dietéticas baixas (LDL) e acreditam que a oxidação de LDL seja importante na formação da placa arterial. Uma ampla gama de estudos desenvolvidos em instituições americanas e europeias de ensino, mostraram redução

nos sintomas autistas e esquizofrênicos com diminuição na ingestão de leite da variante genética A1 da β -caseína. Além disso, os ensaios em animais também apontaram a relação da diabetes tipo 1 à exposição ao leite em geral e à variante genética A1 em particular (CADE et al., 2000).

Analisando a relação dos genótipos de β -caseína (A1A1, A1A2 e A2A2) com a composição e físico-química do leite de vaca pela análise de HPLC (cromatografia líquida), Vitte et al. (2022), encontraram que as vacas portadoras do genótipo A1A1 apresentaram as maiores médias para teor de lactose; do genótipo A1A2 apresentaram as maiores médias para teor de proteína e do genótipo A2A2 apresentaram as maiores médias para teor de gordura e dias em lactação.

Wang et al. (2020) realizando uma caracterização proteômica comparativa do leite bovino para o gene da β -caseína nos três genótipos observaram que o genótipo A2A2 apresentou a maior produção de leite (kg/dia), teor de gordura e contagem de células somáticas em $\text{cél}/\text{mL}^{-1}$ e o genótipo A1A1 apresentou o maior teor de proteínas no leite. Também foi observado a similaridade na quantidade proteína de 29 proteínas entre os genótipos A1A1 e A2A2, de 25 proteínas entre os genótipos A1A1 e A1A2 e de 14 proteínas entre os genótipos A2A2 e A1A2.

Embora as potenciais diferenças nutricionais e biológicas entre o leite proveniente de vacas portadoras dos genótipos A1A1 e A2A2 ainda estejam sendo debatidas (SUMMER et al., 2020), alguns países estão vendo uma tendência de aumento rápido no consumo de leite proveniente de vacas portadoras do genótipos A2A2 (NGUYEN et al., 2015; MENCARINI et al., 2013), levando produtores e associações de criadores a despertarem interesse de variantes alélicas A2 do gene da β -caseína (SEBASTIANI et al., 2022) e aumentarem assim a frequência do alelo A2 em populações de bovinos leiteiros porém, sem a devida atenção aos possíveis efeitos deletérios dessa mudança nas características tecnológicas do leite. Os produtos “A2 *milk*” estão comercialmente disponíveis em vários países (Itália, Reino Unido, Holanda, Austrália, Nova Zelândia, China) (BROOKE-TAYLOR et al., 2017).

O mercado global de leite A2 foi avaliado em \$ 1.129,7 milhões em 2019 e está projetado para chegar a \$ 3.699,2 milhões em 2027, registrando uma taxa de crescimento anual de 15,8% de 2021 a 2027. Em 2021, o segmento de “A2 *milk*” deteve 60% de participação no mercado mundial. Ásia-Pacífico contribuíram com 41% de participação e estimam-se permanecer na posição de liderança no mercado global de leite A2 durante os próximos anos e esse avanço pode ser devido a uma crescente demanda por leite em pó e derivados como iogurte, queijo e manteiga e, além disso está sendo cada vez mais difundido a

promoção de campanhas publicitárias direcionadas para aumentar a conscientização sobre os benefícios à saúde obtidos pelos lácteos com a variante genética A2 da β -caseína entre os consumidores. Na América do Norte o “A2 milk” cresce em uma taxa anual superior a 15% no mercado global de leite A2 e as principais razões são a crescente preocupação com a saúde e conscientização sobre os efeitos das proteínas da variante genética A1 e aos altos padrões de vida e poder aquisitivo dos consumidores (BHAVANA e ROSHAN, 2020).

No Brasil, para comercializar o leite A2 é necessário que a propriedade ou indústria leiteira seja certificada, assegurando, dessa forma a origem da obtenção do leite proveniente apenas de vacas portadoras do genótipo A2A2 para o gene da β -caseína e, por conseguinte que não exista a mistura de leite convencional (com a variante genética A1 da β -caseína). O selo “Vacas A2A2” nas embalagens de leite e derivados indica que o produto é proveniente apenas de vacas com genótipo A2A2. Por isso, contém apenas a variante genética A2 da β -caseína em sua composição, o que o torna, naturalmente, mais fácil de digerir, agregando valor ao produto. A certificação é um passo importante na viabilização da comercialização do leite A2 no Brasil, para ser possível a menção na rotulagem de qualquer lácteo fabricado com leite A2 torna-se necessário comprovar a informação via documentos e garantias de rastreabilidade e origem (INTEGRAL CERTIFICAÇÕES, 2022). A certificação é um passo importante na viabilização da comercialização do leite A2 no Brasil, para ser possível a menção na rotulagem de qualquer lácteo fabricado com leite A2 torna-se necessário comprovar a informação através de documentos e garantias de rastreabilidade e origem (INTEGRAL CERTIFICAÇÕES, 2022).

A identificação de presença do alelo A1 da β -caseína e do alelo A2 da β -caseína e detecção dos genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 em amostras pode ser realizada a partir da extração do material genético de diferentes origens biológicas, principalmente de sangue, mas também de leite, carne, sêmen e folículos pilosos (GRIFFIN et al., 2013; GREEN et al., 2012). Em amostras de sangue e folículos pilosos, a extração de DNA é realizada usando um kit Easy-DNA™ (*Invitrogen, Carlsbad, USA, Cat. n. K1800-01—Protocol #1—Small Blood Samples and Hair Follicles*), conforme recomendado pelo fabricante e descritas por Gigliotti et al. (2020) e em amostras de leite ocorre um pré-processamento conforme as recomendações de Reale et al. (2008) e modificadas por Gigliotti et al. (2020).

Países como a Austrália e Nova Zelândia já comercializam o leite com selo A2 há muitos anos, além deles, Estados Unidos e Reino Unido estão em ascensão quanto à comercialização do leite com essa variante (BARBOSA et al., 2019). A Vinamilk, empresa de lácteos vietnamita, é a primeira a investir na produção do leite A2 no país, importando os

animais da Nova Zelândia com o intuito de trazer benefícios aos consumidores e, também, provar a capacidade da empresa a nível internacional. A revista Forbes Vietnã divulgou uma lista contendo as 40 marcas mais valiosas do país, com a presença da Vinamilk, com valor de U\$2,28 bilhões, no topo pela terceira vez, provando assim o valor e o potencial que o leite A2 apresenta no que diz respeito à valorização de empresas e no agronegócio do país (MILKPOINT, 2018).

Dados do levantamento anual realizado em 2023 por uma das principais plataformas em consultorias do setor leiteiro, apontaram para a região sudeste como a que concentrou em 2022, quatro das cinco maiores propriedades produtoras de leite no Brasil, dentre as quais três são as maiores referências em produção de leite no estado de São Paulo, a Fazenda Colorado (SP) com 92 mil litros/dia, a Grupo Olavo Barbosa (SP) com 77 mil litros/dia e a Agrindus (SP) com 68 mil litros/dia, ocupando a 1^a, 3^a e 5^a posições, respectivamente, na classificação que mapeia a produção das propriedades por volume de leite produzido. Sendo a Colorado e a Agrindus as mais citadas quanto ao pioneirismo na produção e diversificação na comercialização de leite e derivados A2 (PACCHIAROTTI et al., 2020). Na Agrindus, 57% do volume total de leite produzido, correspondente produção de leite A2, o que representa cerca de 13 mil litros/dia.

2.3. PROTEOMA DE LEITE

O termo “proteoma” foi introduzido pela primeira vez na literatura científica em julho de 1995. Há quase 20 anos as tentativas de caracterizar o complemento proteico total passível de ser codificado por um determinado genoma só se tornaram possíveis devido ao acesso privilegiado ao que eram então os conjuntos completos de dados genômicos. A última década testemunhou um aumento em todas as sequências do genoma. A proteômica tornou-se um pilar importante nos campos de diagnóstico de doenças e pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, ao mesmo tempo que desempenha uma função crítica no campo muito maior de análise de saúde e descoberta e detecção de biomarcadores (SMITH, 2015).

O termo proteoma foi citado pela primeira vez por Wasinger et al. (1995) e logo após por Wilkins et al. (1996) que definiram proteômica ou análise de proteoma como sendo a separação, identificação e quantificação de todo o complemento proteico expresso por um genoma, célula, tecido ou organismo em um determinado momento (WILKINS et al., 1996; WASINGER et al., 1995) e a palavra proteômica é o estudo em larga escala dos proteomas. Hoje, duas definições de proteômica são encontradas. A primeira é a definição mais clássica,

restringindo a análise em larga escala de produtos gênicos a estudos envolvendo apenas proteínas. A segunda e mais abrangente definição combina estudos de proteínas com análises que possuem magnitude genética (PANDEY e MANN, 2000). Pando-Robles e Lanz-Mendoza (2009) afirmam que o proteoma é a totalidade das proteínas expressas por um genoma em um determinado momento sob condições fisiológicas específicas. Em um organismo, as células contêm o mesmo genoma; no entanto, eles expressam diferentes proteínas em resposta a um microambiente específico.

O objetivo geral da proteômica é de obter uma visão mais global e integrada da biologia estudando todas as proteínas de uma célula em vez de cada uma individualmente (GRAVES et al., 2002), sendo os principais: a identificação de proteínas e suas implicações nas modificações pós-traducionais (PTMs) e a quantificação das diferenças demonstradas nos níveis de expressão proteica sob diferentes condições externas, envolvendo abordagens de biologia molecular, bioquímica e bioinformática (GRAVES et al., 2002).

As modificações pós-traducionais são comumente percebidas nas proteínas com estruturas/funções importantes, como proteínas secretoras, proteínas de membrana e histonas. Essas modificações afetam uma ampla gama de comportamentos e características de proteínas, incluindo função e montagem de enzimas (RYŠLAVÁ et al., 2013), vida útil da proteína, interações proteína-proteína (MARSHALL, 1993), interações célula-célula e célula-matriz, participação no tráfego intracelular de moléculas, ativação de receptores, solubilidade de proteínas (GOULABCHAND et al., 2014; CARAGEA et al., 2007), dobramento de proteínas (DEL MONTE et al., 2014) e localização de proteínas (AUDAGNOTTO et al., 2017). Portanto, essas modificações estão envolvidas em vários processos biológicos, como transdução de sinal, regulação da expressão gênica, ativação gênica, reparo do DNA e controle do ciclo celular (WEI et al., 2017; WANG et al., 2015). A expressão proteica e as modificações pós-traducionais ocorrem em várias organelas celulares, incluindo o núcleo, citoplasma, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi (BLOM et al., 2004).

A proteômica do leite envolve a análise da expressão, estrutura e modificações das proteínas do leite, incluindo variantes genéticas, alterações (que ocorrem naturalmente e por meio de processamento e armazenamento) nos níveis de fosforilação, glicosilação e outras modificações pós-traducionais e a determinação de sítios PTM em proteínas do leite (MANSO et al., 2005).

Uma tarefa importante da proteômica é a investigação das principais proteínas, incluindo as caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β e κ -caseína) e as proteínas séricas (β -lg, α -la, BSA). As proteínas do leite são caracterizadas por uma grande heterogeneidade e pela presença de

várias isoformas diferentes em ruminantes. Além disso, o leite contém um alto número de proteínas de baixa abundância, como lactoferrina, imunoglobulinas, glicoproteínas, hormônios e enzimas (FOX e KELLY, 2003).

O leite contém vários tipos de componentes que fornecem muitas atividades biológicas, a maioria das funções enzimáticas celulares, reguladores, receptores e componentes estruturais são compostos de proteínas. A caracterização das proteínas expressas por uma célula pode fornecer informações importantes sobre a função, organização e capacidade de resposta inerente a uma célula. Muitas proteínas estão envolvidas nos mecanismos de proteção dos indivíduos ao estresse exógeno, toxinas e patógenos; na composição de intermediários metabólicos envolvidos no crescimento, desenvolvimento e adaptação; na modulação da regulação metabólica para o desempenho físico e intelectual. Além disso, ao definir a variação entre diferentes células e entre células expostas a diferentes estímulos, pode-se compreender a adaptação celular aos sinais ambientais; os mecanismos de diferenciação celular e desenvolvimento do organismo; os aspectos celulares de processos patológicos; as respostas celulares ao envelhecimento; a diferença entre os indivíduos dentro de uma espécie, ou seja, a base molecular das individualidades fisiológicas, suscetibilidade a doenças e respostas à terapias e exposições ambientais (CASADO et al., 2009).

A maioria das propriedades citadas é realizada pelas proteínas do leite ou por peptídeos das proteínas do leite pelo mecanismo de interação proteína-proteína. Por esta razão, é importante avaliar e caracterizar o proteoma do leite integral, bem como as funções das proteínas e sua rede de interação. Abordagens realizadas pelas ômicas estão fornecendo informações detalhadas do proteoma do leite e suas frações, já que a maioria das funções bioativas do leite não são realizadas pelas proteínas do leite em toda a sua conformação, mas por peptídeos pertencentes à clivagem processos de sua estrutura primária (CASADO et al., 2009). Além do que as abordagens proteômicas têm sido uma alternativa para a detecção de adulteração do leite por diluição com base na determinação do teor de proteína (SILVA e ROCHA, 2020), devido às fraudes e adulterações do leite visando ganhos econômicos, bem como mascarar as condições inadequadas de processamento, armazenamento e transporte (DAS et al., 2016; HANDFORD et al., 2016).

Ferramentas proteômicas são capazes de detectar, identificar e quantificar proteínas e componentes proteicos de membranas; de diferenciar as sete principais proteínas e suas variantes genéticas; de entender o mecanismo de secreção do leite além da sensibilidade e especificidade da técnica para a percepção de alterações da proteína do leite durante a

lactação e durante o processamento e armazenamento de leite (EL-SALAM, 2014; CUNSOLO et al., 2011; O'DONNELL et al., 2004).

Análise proteômica para o estudo do perfil de expressão proteica geralmente é estruturada em etapas que consistem em coleta, pré-tratamento e preparação das amostras; seguida pela extração e separação, identificação e quantificação e a verificação das proteínas (LIU et al., 2014; GRAVES et al., 2002) e por fim a análise de dados que incluem pesquisa em banco de dados com análise de interações proteína-proteína (PPIs) e análise estatística (IBM, 2019; SIB, 2019; DELWICHE et al., 2012).

Na tentativa de otimizar as técnicas de caracterização do leite de vacas da raça Holandesa, Vincent et al. (2016) observaram que método A, em que utilizaram a uréia, produziu o maior número de acessos de proteínas únicas; que o método B, em que utilizaram ácido tricloroacético e acetona, não foi tão eficiente quanto os métodos A e C e; que o método C em que utilizou solução de metanol e clorofórmio obtiveram a maior concentração de proteína, taxas de recuperação, bem como como os melhores padrões SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). Concluindo que para uma abordagem centrada em proteômica, o método A oferece vantagens em baixo custo, simplicidade, cobertura proteica e rendimento e seria o método preferido para esse tipo de estudo.

Li et al. (2012) realizaram a identificação das caseínas bovina por espectrometria de massa e afirmam que as mesmas foram separadas com sucesso por SDS-PAGE e géis isolados sendo possível a separação e visualização das frações α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína e β -caseína.

Holland et al. (2006) constataram a possibilidade de identificação dos *spots* das proteínas nos géis pela caracterização proteômica de múltiplas isoformas das caseínas bovina, a localização e a intensidade de abundância das proteínas. Concluindo assim a enorme complexidade da análise proteômica como uma tarefa extremamente desafiadora.

Bisutti et al. (2022), ao identificarem e quantificarem o conteúdo de caseínas e proteínas séricas do leite dos três genótipos para o gene da β -caseína, observaram que o genótipo A2A2 apresentou maior concentração de α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, κ -caseína, α -la e, β -lg; os genótipos A1A1 e A1A2 apresentaram as maiores concentrações para a variável β -caseína; o genótipo A1A1 apresentou a maior concentração para a variável lactoferrina.

Diante da complexidade que envolvem as proteínas, a proteômica tem servido como uma abordagem de pesquisa atraente para estudar a expressão da proteína do leite em vacas leiteiras, ou seja, o perfil das caseínas e das proteínas séricas do leite, suas propriedades e interações (BISSONNETTE et al., 2012; HINZ et al., 2012; REINHARDT et al., 2006). Os

estudos proteômicos contribuem também para encontrar as principais diferenças entre as mesmas proteínas do leite em diferentes espécies (HINZ et al., 2012) além de relacionar as composições e o padrão dietéticos de mudanças na composição do leite, o que sugere que esses fatores influenciam a síntese e secreção de leite na glândula mamária (LI et al., 2015; YANG et al., 2013; DANIELS et al., 2006).

Portanto, tecnologias “ômicas” recentemente desenvolvidas permitem estudar de forma abrangente e sistemática a lactação nos níveis de DNA, RNA, proteínas e metabólitos e identificar os fatores ou processos mais importantes que podem influenciar a lactação. A genômica não apenas mapeia os genes, mas também realiza análises de sequência para fornecer informações sobre a heterogeneidade do gene codificador (DANIELS et al., 2002). A transcriptômica pode perfilar simultaneamente vários a mais de milhares de níveis e mudanças de expressão de mRNA (DANIELS et al., 2002). As ferramentas proteômicas são usadas para determinar as mudanças nos padrões de expressão de proteínas, abundância e modificações pós-traducionais (WANG et al., 2006). Além disso, a tecnologia metabolômica tem sido usada para analisar grandes grupos de metabólitos em amostras biológicas que podem refletir as propriedades físico-químicas do corpo (NICHOLSON et al., 2008).

Para facilitar a compreensão de como esses fatores atingem o funcionamento da glândula mamária e modificam as características quantitativas e qualitativas do leite, desenvolveu-se os estudos das ciências ômicas como uma ferramenta que analisa as interações e funções dos diferentes sistemas biológicos que dão funcionalidade a um organismo por meio da avaliação abrangente ou global de um conjunto de moléculas. As principais ômicas são a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica (HASIN et al., 2017; MICHEEL, 2012).

O objetivo de todos os estudos de proteômica é entender a função das proteínas e suas ações combinadas no controle dos sistemas moleculares dos organismos vivos. A compreensão dos proteomas dos alimentos e da produção de alimentos depende principalmente da capacidade de escolher, combinar e otimizar a grande coleção de ferramentas e métodos dentro da proteômica e de integrar esses métodos para obter uma compreensão suficientemente profunda do funcionamento e funcionalidade das proteínas individuais para a produção, qualidade e segurança dos alimentos (BENDIXEN, 2013). E ainda obter mais informações sobre os processos biológicos, vias de sinalização, valores nutricionais e novos ingredientes alimentares funcionais que são novos ou cuja importância no leite ainda é desconhecida (D’ALESSANDRO et al., 2010; CASADO et al. 2009).

A proteômica é uma ferramenta poderosa para identificar proteínas relevantes no leite. A identificação de proteínas associadas aos vários aspectos da produção de leite pode fornecer novas informações relevantes à biologia da lactação. A maioria dos estudos proteômicos realizados até agora em células epiteliais mamárias, organelas, membranas e nos processos de secreção são focados na lactação para o entendimento da função mamária e da secreção de leite e no acompanhamento do aparecimento de tumores e carcinomas no tecido mamários (WU et al., 2000; JACOBS et al., 2004). A proteômica também tem sido amplamente utilizada para determinar os componentes do leite, perfis proteicos e características do leite, nutrientes e estágios de lactação na síntese do leite e respostas proteômicas mamárias à mastite em vacas leiteiras (YANG et al., 2014; SMOLENSKI et al., 2007).

Na produção leiteira, as principais aplicações da proteômica estão relacionadas ao perfil e às características dos componentes do leite, a proteômica na lactação com uso de diferentes nutracêuticos e em diferentes fases da lactação e a identificação e quantificação de biomarcadores como indicadores de processos inflamatórios para o diagnóstico de mastite (LI et al., 2017).

CAPÍTULO 3. ESTUDO DOS DESDOBRAMENTOS POLIMÓRFICOS DOS ALELOS A1 E A2 PARA O GENE DA β -CASEÍNA SOBRE A PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE LEITE DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA

Study of the polymorphic deployments of the A1 and A2 alleles for the β -casein gene on the production and composition of milk of Holstein cows

RESUMO

O objetivo do presente foi estudar os desdobramentos polimórficos dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína sobre metabólitos (energéticos, enzimáticos e nitrogenados), composição do leite, contagem de células somáticas, média de produção de leite diária observada durante 30 dias e dias em lactação de vacas da raça Holandesa submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais. Foram utilizadas 18 vacas da raça Holandesa dos três genótipos (6 A1A1; 6 A1A2; 6 A2A2) para o gene da β -caseína, com 215 dias de lactação (DEL), peso corporal de 400 ± 50 kg, escore de condição corporal médio de $3,25 \pm 0,25$ e produção média de leite de 36,5 kg de leite/vaca/dia. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado em que os genótipos foram analisados como variáveis independentes e metabólitos, composição e contagem de células somáticas do leite e a produção e dias em lactação foram analisados como variáveis dependentes. Todas as análises foram realizadas no programa computacional *Statistical Analysis System*[®] versão 9.4. As determinações dos metabólitos (energético, enzimáticos e nitrogenados) no leite, sangue e urina foram realizadas por meio das concentrações de glicose, gama glutamil transferase, aspartato amino transferase, uréia no plasma, nitrogênio ureico no plasma, uréia no leite, nitrogênio ureico no leite, nitrogênio urinário e nitrogênio ureico na urina. Também foram realizadas análises de composição (teor de gordura, teor de proteína, teor de lactose, teor de sólidos totais, teor de sólidos não gordurosos), contagem de células somáticas, média de produção de leite diária (litros/vaca/dia) e dias em lactação (dias). Nas condições que o experimento foi desenvolvido, conclui-se que para metabólitos não foram encontradas diferenças entre os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2, com exceção para a glicose, que foi maior para o genótipo A2A2. Para a composição e CCS do leite, não foram observadas diferenças entre os três genótipos, assim como para as características de produção e duração da lactação.

Palavras-chaves: Genótipos. Leite. Metabolismo. Qualidade

ABSTRACT

The objective of this study was to study the polymorphic unfolding of the A1 and A2 alleles for the β -casein gene on metabolites (energy, enzymatic and nitrogenous), milk composition, somatic cell count, average daily milk production observed during 30 days and days in lactation of Holstein cows submitted to the same nutritional and environmental conditions. Eighteen Holstein cows of the three genotypes (6 A1A1; 6 A1A2; 6 A2A2) were used for the β -casein gene, with 215 days of lactation (DEL), body weight of 400 ± 50 kg, mean body condition score of 3.25 ± 0.25 and average milk production of 36.5 kg of milk/cow/day. The adopted experimental design was completely randomized in which genotypes were analyzed as independent variables and metabolites, composition and somatic cell count of milk and production and days in lactation were analyzed as dependent variables. All analyzes were carried out using the Statistical Analysis System® version 9.4 computer program. Determination of metabolites (energy, enzymatic and nitrogenous) in milk, blood and urine were carried out by means of concentrations of glucose, gamma glutamyl transferase, aspartate amino transferase, urea in the plasma, plasma urea nitrogen, milk urea, milk urea nitrogen, urinary nitrogen and urine urea nitrogen. Composition analyzes (fat content, protein content, lactose content, total solids content, non-fat solids content), somatic cell count, average daily milk production (liters/cow/day) and days in lactation (days). Under the conditions under which the experiment was developed, it was concluded that no differences were found for metabolites between the A1A1, A1A2 and A2A2 genotypes, with the exception of glucose, which was greater for the A2A2 genotype. For milk composition and SCC, no differences were observed between the three genotypes, as well as for production characteristics and duration of lactation.

Keywords: Genotypes. Milk. Metabolism. Quality

3.1. INTRODUÇÃO

As principais proteínas do leite são caseínas e proteínas séricas (> 95%), enquanto o restante (\leq 5%) é constituído por peptonas e peptídeos de baixo peso molecular ou proteínas de membrana dos glóbulos de gordura do leite. Caseínas, são tidas como a fração insolúvel do leite, correspondendo a aproximadamente 80% da fração proteica sendo composta por α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína e κ -caseína enquanto, as proteínas séricas são tidas como a fração solúvel, sendo constituídas por cerca de 20% do teor de proteína do leite e são compostas principalmente de β -lactoglobulina (β -lg), α -lactoalbumina (α -la), albumina sérica bovina, imunoglobulinas e lactotransferrina (MASTER et al., 2021; LIVNEY, 2010).

As caseínas constituem um grupo heterogêneo com alterações polimórficas em quatro genes CSN1S1, CSN1S2, CSN2 e CSN3 que codificam α_{S1} -, α_{S2} -, β - e κ -, respectivamente (ELFERINK et al., 2022; KAMINSKI et al., 2007). O grupo mais abundante é a α_{S1} -caseína com cerca de 38%, seguido pela β -caseína com 36%, κ -caseína com 13% e α_{S2} -caseína com 10% e fragmentos de caseína com 2% (TONG et al., 2016).

A β -caseína contém 209 resíduos de aminoácidos além do peptídeo sinal com 15 resíduos de aminoácidos, tornando a pré-forma com 224 aminoácidos de comprimento (FARRELL et al., 2004) e podem ser divididas em doze variantes por seus polimorfismos genéticos; A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2 e I (FIROUZAMANDI et al., 2018). No entanto, apenas sete destes (A1, A2, A3, B, C, I e E) foram detectados em raças bovinas europeias, entre as quais A1 e A2 β -caseínas são as variantes prevalentes (SEBASTIANI, et al., 2020; FARRELL et al., 2004). Cada tipo de caseína possui diferentes variantes genéticas, que determinam a estrutura e a função da própria proteína, além do tamanho das micelas de caseína, o que resulta em diferenças nas propriedades físico-químicas e funcionais do leite (GLANTZ et al., 2010; FARRELL et al., 2004).

A variante A2 ocorreu originalmente em gado europeu (*Bos taurus*) antigo e puro-sangue asiático (*Bos indicus*), enquanto a variante A1 é o resultado de uma mutação via seleção natural (BROOKE-TAYLOR et al., 2017; CAROLI et al., 2016), no códon 67, do éxon 7, do gene da β -caseína, no qual a trinca CCT (citosina-citosina-timina) que na variante A2, codifica o aminoácido prolina, sofreu alteração para a trinca CAT (citosina-adenina-timina) que na variante A1, codifica o aminoácido histidina (KAY et al., 2021; JAISWAL et al., 2013). A variante A1 do gene da β -caseína foi relatada apenas no leite bovino, não sendo detectadas até o presente momento no leite de qualquer outra espécie (LIAO et al., 2017; NGUYEN et al., 2017; CAROLI et al., 2016; PAUCIULLO et al., 2014). O leite bovino

comercialmente disponível geralmente contém uma mistura de variantes A1 e A2 da β -caseína. No entanto, o leite bovino contendo apenas a variante A2 da β -caseína já está disponível em vários países (BROOKE-TAYLOR et al., 2017).

Os efeitos relacionados a modificações funcionais da proteína, principalmente trocas ou deleções de aminoácidos, afetam as propriedades biológicas da proteína codificada. Além disso, essa variação polimórfica da proteica do leite tem sido usada para caracterização de raça (CERIOTTI et al., 2004; MOAZAMI-GOUDARZI et al., 2001), investigações de biodiversidade genética (LIEN et al., 1999; MAHÉ et al., 1999) e estudos de evolução em recursos genéticos e biotecnologia (IBEAGHA-AWEMU et al., 2007; JANN et al., 2004).

Os genes da proteína láctea são conhecidos por serem altamente polimórficos em ruminantes e o efeito dessa variabilidade foi observado nas propriedades nutricionais e tecnológicas do leite (CAROLI et al., 2009). Entre os ruminantes, os genes da proteína do leite foram intensamente investigados em bovinos e caprinos, e uma notável variação genética foi identificada e caracterizada, e apresenta importância para a criação animal em decorrência dos efeitos das variantes da proteína do leite, na composição do leite e nas propriedades de produção do queijo (MARTIN et al., 2002; Di STASIO et al., 2000; GROSCLAUDE, 1988).

A associação do polimorfismo da β -caseína com a produção (HECK et al., 2009; ÇARDAK, 2005; NG-KWAI-HANG et al., 1986 e 1983), composição do leite (IKONEN et al., 1999; WINKELMAN et al., 1997; ALEANDRI et al., 1990) e fertilidade (DEMETER et al., 2010; RUOTTINEN et al., 2004; LIN et al. 1987) em vacas leiteiras foi alvo de inúmeras pesquisas, no entanto trabalhos relacionando a produção e composição do leite de vacas com os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 para o gene da β -caseína em sistemas de criação do Brasil ainda são escassos.

Vitte et al. (2022), ao estudarem a relação entre os três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína sobre as características bioquímicas do leite em um rebanho com 96 vacas mestiças Simental \times Holandesa não encontraram diferenças na composição físico-química do leite para as variáveis proteína (%), gordura (%) e lactose (%) e não encontraram diferenças nas características sensoriais para as variáveis aparência, cheiro e sabor do leite. Ainda Vitte et al. (2022) sugerem uma influência das variantes da β -caseína (vacas com genótipos A1A1, A1A2 e A2A2) na composição de aminoácidos e na cor do leite, sendo que o leite proveniente de vacas portadoras do genótipo A1A1 apresentaram maior teor de ácidos graxos monoinsaturados e menor teor de ácidos graxos saturados no conteúdo de ácidos graxos do leite; já o leite proveniente de vacas portadoras do genótipo A1A2 apresentou maiores teores de aminoácidos essenciais (histidina ($<0,001$), lisina ($<0,01$),

isoleucina (<0,05), metionina (<0,001), valina (<0,01)) e de aminoácidos não essenciais (aspártico (0,001), prolina (<0,001), serina (<0,05), tirosina (<0,01)) no conteúdo de proteínas do leite e maior teor de ácidos graxos saturados. O leite proveniente de vacas portadoras do genótipo A1A2 teve a maior leveza na avaliação colorimétrica, em que foi encontrado correlação entre o aumento dos valores do índice de vermelhidão (a^*) (<0,001) e índice de amarelecimento (b^*) (<0,01). O leite proveniente de vacas portadoras do genótipo A2A2 foi maior em ácidos graxos poliinsaturados, ômega-3 (0,001) e ômega-6 (<0,001) e menor teor de ácidos graxos saturados.

Bisutti et al. (2022), avaliaram o efeito dos três genótipos para o gene da β -caseína sobre as concentrações das caseínas e das proteínas séricas e concluíram que o genótipo A2A2 está associado a maior digestibilidade e melhor fisiologia intestinal assim, a indústria de laticínios deve favorecer esse genótipo no leite destinado ao consumo *in natura*. No entanto, é desaconselhável o uso de leite contendo os alelos A2 para a produção de queijos, pois estão associados a uma piora das características tecnológicas e consequentemente, ao menor rendimento industrial.

Resultados semelhantes foram encontrados por Albarella et al. (2020), que constataram que o leite proveniente de vacas portadoras do genótipo A2A2 apresentou maior teor de proteína e sólidos totais quando comparado ao A1A1. Ng-Kwai-Hang et al. (1983), ao verificarem a variação das concentrações de proteínas do leite associadas ao polimorfismo genético para o gene da β -caseína, encontraram diferenças marcantes na composição detalhada das proteínas do leite devido a fatores ambientais, fisiológicos e de saúde, *status* da vaca, além de associações com polimorfismos da proteína do leite, relatando que mudanças na distribuição dos componentes proteicos influenciam as propriedades do leite, com apresentação de dados que podem ser úteis para a indústria de laticínios para determinar quais fatores podem ser controlados na fazenda para obter leite dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente.

Entretanto, Nguyen et al. (2019) não observaram diferenças significativas entre o leite proveniente de vacas portadoras de diferentes genótipos da β -caseína (A1A1, A1A2, A2A2) para os parâmetros teor de gordura, proteína, lactose ou matéria seca total.

Além de parâmetros de produção e composição do leite, exames sanguíneos podem fornecer informações importantes para diagnóstico e prognóstico (JONES et al., 2007) da sanidade, monitoramento de índices zootécnicos e status nutricional do rebanho (DURMAN et al., 2011). Os parâmetros bioquímicos são um conjunto de exames que permitem estabelecer conexões com problemas relacionados à sanidade dos animais (GONZÁLES et

al., 2003). Dentre estes exames bioquímicos que podem ser realizados cita-se a aspartato amino transferase (AST), gama glutamil transferase (GGT), ureia, creatinina, glicose e cálcio (GRANDE et al., 2008).

A glicose é uma substância sintetizada no fígado a partir de moléculas precursoras na via da gliconeogênese. É um combustível para a oxidação respiratória, vital para o metabolismo cerebral e a lactação (GONZÁLEZ, 2000). A ureia é um produto sintetizado no fígado a partir do nitrogênio, sua determinação plasmática é um dos componentes de avaliação da atividade metabólica proteica do animal (WITTEWER, 2000), na maioria das espécies é um indicador de funcionamento renal, pois é excretada principalmente pela urina (GONZÁLEZ et al., 2002). Os níveis de ureia têm relação direta com o nível de proteína na alimentação. Rebanhos que utilizam dietas ricas em teor de proteína bruta encontram seus valores altos no sangue, por outro lado, uma baixa ingestão parece afetar pouco seus índices (GONZÁLEZ et al., 2002).

O monitoramento de nitrogênio ureico no sangue e nitrogênio ureico no leite é uma técnica que pode ser usada para medir estado nutricional energético e proteico em vacas lactantes a partir de amostras biológicas. Esses indicadores devem ser usados associados a outras medidas, como peso corporal e escore de condição corporal, e obtidos durante momentos delicados do ciclo de produção como as disponibilidades de alimentação, mudanças dietéticas, sazonalidade climática e estágio produtivo. Por outro lado, indicadores metabólicos de nitrogênio ureico no sangue e nitrogênio ureico no leite, são usados para avaliar mudanças de curto prazo ou em tempo real da condição nutricional do rebanho, (HAMMOND et al., 1998) auxiliando nas tomadas de decisões para a melhoria dos índices produtivos e reprodutivos, apresentando como vantagem a praticidade, economia e utilidade prática clínica (JONES et al., 2007).

Sendo assim, o objetivo do presente foi estudar os desdobramentos polimórficos dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína sobre metabólitos (energético, enzimáticos e nitrogenados), composição do leite (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos não gordurosos), contagem de células somáticas (CCS em \log céls./mL⁻¹), média de produção de leite diária (PL) observada durante 30 dias (litros/vaca/dia) e dias em lactação (DEL) de vacas da raça Holandesa submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais.

3.1. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais aplicados neste estudo obedeceram aos princípios éticos na experimentação animal bem como as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (CEUA/FZEA/USP) e protocolada sob o CEUA nº 9431111019.

3.2.1. Seleção dos animais e descrição dos tratamentos

O experimento foi realizado no período de junho a julho de 2021 e conduzido na Fazenda Santa Rita, pertencente a Agropecuária Agrindus S.A., localizada no município de Descalvado, São Paulo, Brasil (21° 54'14 " de latitude sul e 47° 37'10 " de longitude oeste, altitude 679 m). Foram utilizadas 18 vacas da raça Holandesa, sendo 6 vacas de cada genótipo (6 A1A1; 6 A1A2; 6 A2A2), com aproximadamente 215 dias de lactação (DEL), peso corporal de 700 ± 100 kg, escore de condição corporal médio de 3,25 ± 0,25 e produção média de leite de 36,5 kg de leite/vaca/dia submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais.

3.2.2. Característica bromatológica da dieta

De acordo com o manejo produtivo da propriedade, as vacas estavam alojadas, por genótipo, em diferentes sistemas de confinamento do tipo *free stall*. O fornecimento da alimentação ocorreu duas vezes ao dia, às 06h00 e às 14h00, diretamente na pista de trato em comedouros coletivos. O acesso à dieta e à água foi *ad libitum* e o volumoso e o concentrado eram misturados mecanicamente no vagão forrageiro e fornecidos na forma de dieta completa.

A dieta fornecida às vacas estava de acordo com requerimentos nutricionais para vacas leiteiras em lactação (NRC, 2021), indicando assim que as exigências nutricionais para vacas em lactação estavam sendo atendidas. Valores acima do recomendado são aceitáveis devido a categoria animal estudada ser de vacas leiteiras de alta produção (± 36,5 litros/vaca/dia), em avançado estágio de lactação (± 215 dias) e com consumo voluntário de matéria seca limitado.

A composição bromatológica da dieta de fase de lactação fornecida para as vacas leiteiras da raça Holandesa portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2, A2A2) para o gene da β -caseína que participaram do experimento, está apresentada na tabela 9.

Tabela 9. Composição bromatológica das dietas oferecidas para as vacas leiteiras da raça Holandesa em lactação, portadora dos três genótipos para o gene da β -caseína, em g/kg de Matéria Seca (MS).

| Composição | Ingredientes, g/kg de MS | | | | | | | | |
|------------------|--------------------------|---------|-------------|---------------|-------------------|----------------|-------------------|-------------------------|-------------|
| | Feno | Silagem | Palha Trigo | Polpa Cítrica | Caroço de Algodão | Farelo de Soja | DDGS ¹ | DDG 40%P B ² | Milho úmido |
| MS ³ | 92,45 | 96,67 | 89,77 | 90,04 | 91,43 | 90,70 | 88,90 | 89,54 | 89,67 |
| MM ⁴ | 7,38 | 6,07 | 5,10 | 7,05 | 5,04 | 4,92 | 6,45 | 4,58 | 1,34 |
| PB ⁵ | 11,72 | 16,79 | 2,74 | 7,67 | 22,66 | 39,88 | 54,31 | 35,24 | 9,52 |
| EE ⁶ | 1,47 | 5,13 | 1,31 | 2,21 | 13,13 | 23,45 | 2,12 | 7,82 | 5,98 |
| FDN ⁷ | 78,86 | 34,54 | 86,64 | 23,13 | 61,16 | 45,40 | 15,09 | 42,77 | 13,12 |
| FDA ⁸ | 42,97 | 26,37 | 58,75 | 17,71 | 47,55 | 28,51 | 11,80 | 21,21 | 5,16 |
| Lignina | 7,25 | 9,96 | 11,14 | 5,34 | 18,93 | 11,01 | 1,43 | 7,44 | 1,76 |
| Amido | - | 24,95 | - | 6,7 | - | 6,04 | 5,8 | - | 69,9 |

¹Grão seco de destilaria com solúveis; ²Grão seco de destilaria com 40% de proteína bruta; ³Determinação da matéria seca das amostras por secagem definitiva em estufa a aproximadamente 105°C; ⁴Determinação de matéria mineral das amostras; ⁵Determinação proteína bruta das amostras, ⁶Determinação do extrato etéreo das amostras, ⁷Determinação de fibra em detergente neutro, ⁸Determinação de fibra em detergente ácido. Valores expressos na matéria seca (isentos de umidade).

3.2.3. Condição ambiental e climática da região

De acordo com as informações do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), estação meteorológica da cidade de São Carlos (SP), o clima do município de Descalvado, seguindo classificação climática de *Koepen* classificando-o em Cwa, clima subtropical de inverno seco (com temperaturas inferiores a 18°C) e verão quente (com temperaturas superiores a 22°C). O índice de temperatura do ar e umidade relativa referente ao mês anterior e ao mês de execução do período experimental, podem ser observados nas figuras 2 e 3.

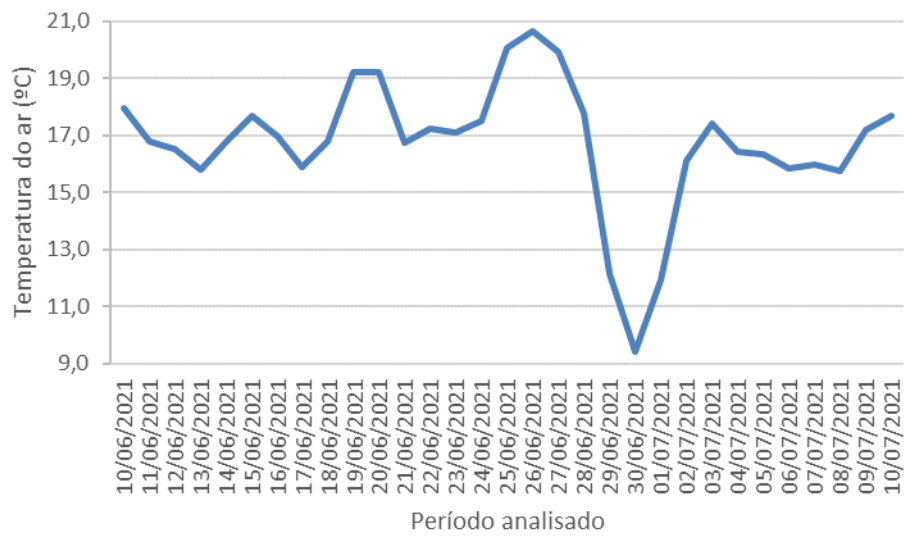


Figura 2. Temperatura do ar na cidade de São Carlos (SP) de 10/06/2021 a 10/07/2021.

Fonte: INMET, (2022).

Para o período analisado de 10/06/2021 a 10/07/2021, as temperaturas do ar mínima e máxima registrada foram de 9,4°C, sendo observada no dia 30/06/2021 e de 20,7°C, sendo observada no dia 26/06/2021 respectivamente, com temperatura média periódica de 16,7 °C para as coordenadas geográficas estabelecidas.

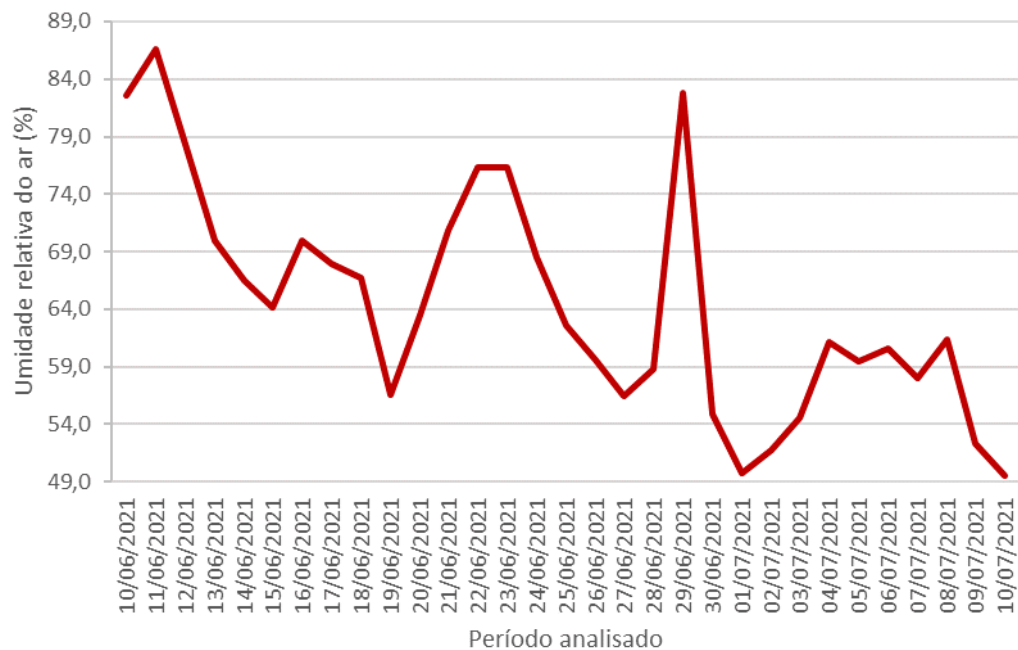


Figura 3. Umidade relativa do ar na cidade de São Carlos (SP) de 10/06/2021 a 10/07/2021.

Fonte: INMET, (2022).

Para o período analisado de 10/06/2021 a 10/07/2021, as umidades relativas do ar mínima e máxima registrada foram de 49,6%, sendo observada no dia 10/07/2021 e de 86,6%, sendo observada no dia 11/06/2021 respectivamente, com umidade relativa do ar média periódica de 64,5 % para as coordenadas geográficas estabelecidas.

3.2.4. Coleta e Análises bioquímicas dos metabólitos energético, enzimáticos e nitrogenados

As coletas de sangue das vacas portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína foram realizadas por punção da artéria ou veia coccígea, decorridos 4 horas após o fornecimento da alimentação da manhã, para dosagem dos parâmetros sanguíneos. As amostras foram coletadas em tubos vacuolizados (Vacutainer®) de 10 mL, acondicionados em caixa térmica contendo gelo seco e, transportadas até o laboratório (COOKE et al., 2007).

As coletas de leite dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína aconteceram durante a ordenha, em que as amostras de leite foram armazenadas em tubos tipo falcon estéreis previamente identificados, acondicionados em caixa térmica contendo gelo seco e, transportadas até o laboratório.

Já para a análise das amostras de urina dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) foram coletadas em coletores universais estéreis previamente identificados, aproximadamente 200 mL de urina mediante micção espontânea ou provocada, por estímulos com massagens na região perivulvar das vacas, acondicionados em caixa térmica contendo gelo seco e, transportadas até o laboratório (ORTOLANI, 2003).

Para estimação do metabólito energético, foi analisada a concentração de glicose sanguínea (mg/dL). Para a análise dos metabólitos enzimáticos, foi analisada a concentração das enzimas gama glutamil transferase (GGT) (U/L) e aspartato amino transferase (AST) (U/L). Para a determinação dos metabólitos nitrogenados, foram analisadas as concentrações de uréia no plasma (UP) (mg/dL), de nitrogênio ureico no plasma (NUP) (mg/dL), de uréia no leite (UL) (mg/dL), de nitrogênio ureico no leite (NUL) (mg/dL), nitrogênio urinário (NU) (mg/dL) e de nitrogênio ureico na urina (NUU) (mg/dL), realizadas por meio de kits comerciais, (Bioclin®) que utilizam o método enzimático colorimétrico de ponto final ou cinético (MARTINS, 2019). A leitura foi realizada em aparelho automático para bioquímica sanguínea (Sistema de Bioquímica Automático SBA-200).

Todas as análises metabólicas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal (LAFA/ZAB) do Departamento de Ciências Básicas na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP) *campus* USP Fernando Costa em Pirassununga / SP / Brasil.

3.2.5. Análise de composição e CCS do leite

Os dados de composição do leite (% gordura, % proteína, % lactose, % sólidos totais, % sólidos não gordurosos) e contagem de células somáticas (CCS em $\log \text{cél.}/\text{mL}^{-1}$) das 18 vacas da raça Holandesa portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína foram extraídos do laudo dos resultados das análises realizadas mensalmente na propriedade pela Clínica do Leite, Piracicaba/ SP/ Brasil, utilizando o aparelho de infravermelho (composição) e citometria de fluxo (CCS).

3.2.6. Análise de produção de leite e dias em lactação

As informações referentes à produção de leite (litros/vaca/dia) individual das vacas em lactação portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína analisadas no presente estudo foram provenientes do controle leiteiro realizado pela propriedade. Foram utilizados os dados de média de produção de leite diária observada durante 30 dias, correspondente ao mês de execução do período experimental.

As informações de média de produção de leite, que correspondeu a média de produção de leite diária durante 30 dias e dias em lactação (DEL), das 18 vacas da raça Holandesa portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína foram extraídas do DeLaval DelPro™, plataforma que realiza mensalmente o relatório de controle leiteiro em todas as vacas em lactação do rebanho.

3.2.7. Análise estatística

Para avaliar os desdobramentos polimórficos dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína de vacas da raça Holandesa utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com três tratamentos de composição genética (genótipo A1A1, A2A2 ou A1A2 para o gene da β -caseína) e seis repetições, em um total de 18 unidades experimentais. As unidades experimentais foram distribuídas nos lotes de vacas em lactação, previamente

formados na propriedade de acordo com o genótipo dos animais. Nos três lotes de cada genótipo, as vacas foram submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais.

A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk* e a homogeneidade entre as variâncias foram verificadas pelo teste de Levene, adotando-se o nível de significância de 5%. Para o teste de médias foi usado o teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5%. Os dados foram analisados por ANOVA com o auxílio do procedimento MIXED do programa computacional *Statistical Analysis System*® versão 9.4 (SAS, 2018).

O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

onde Y_{ij} = é o valor observado; μ = média geral; T_i = efeito fixo de genótipo i (composição genética); ε_{ij} = erro aleatório associado a cada observação.

3.2. RESULTADOS

3.3.1. Análises bioquímicas dos metabólitos energético, enzimáticos e nitrogenados

Os resultados das análises e as estatísticas descritivas para as concentrações de glicose sanguínea (GLIC) (mg/dL), gama glutamil transferase (GGT) (U/L), aspartato amino transferase (AST) (U/L), uréia no plasma (UP) (mg/dL), nitrogênio ureico no plasma (NUP) (mg/dL), uréia no leite (UL) (mg/dL), nitrogênio ureico no leite (NUL) (mg/dL), nitrogênio urinário (NU) (mg/dL) e nitrogênio ureico na urina (NUU) (mg/dL) estão apresentadas na tabela 10.

Tabela 10. Número de observações (N), média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MIN) e valores máximos (MAX) para concentração dos metabólitos energéticos, enzimáticos e nitrogenados expressos quantitativamente (mg/dL) e (U/L).

| Variável | N | MED | DP | CV | MIN | MAX |
|-------------------|----|-------|------|-------|-------|-------|
| GLIC ¹ | 18 | 60,59 | 6,52 | 10,76 | 51,07 | 71,54 |
| GGT ² | 18 | 43,62 | 8,38 | 19,21 | 28,52 | 58,64 |
| AST ³ | 18 | 54,61 | 6,61 | 12,11 | 39,96 | 62,79 |

| | | | | | | |
|------------------|----|----------|--------|-------|--------|----------|
| UP ⁴ | 18 | 37,48 | 6,61 | 17,62 | 20,10 | 46,66 |
| NUP ⁵ | 18 | 17,51 | 3,09 | 17,62 | 9,39 | 21,80 |
| UL ⁶ | 18 | 38,98 | 8,59 | 22,04 | 18,67 | 51,78 |
| NUL ⁷ | 18 | 18,22 | 4,02 | 22,05 | 8,71 | 24,20 |
| NU ⁸ | 18 | 1.001,63 | 301,80 | 30,13 | 455,3 | 1.588,83 |
| NUU ⁹ | 18 | 467,98 | 141,15 | 30,16 | 211,57 | 742,44 |

¹Glicose (mg/dL): concentração de glicose no sangue em mg/dL; ²GGT (U/L): concentração da enzima gama glutamil transferase no sangue em U/L; ³AST (U/L): concentração da enzima aspartato aminotransferase no sangue em U/L; ⁴Ureia plasmática (mg/dL): concentração de ureia no plasma sanguíneo em mg/dL; ⁵NUP (mg/dL): concentração de nitrogênio ureico no plasma sanguíneo em mg/dL; ⁶Ureia no leite (mg/dL): concentração de ureia no leite em mg/dL; ⁷NUL (mg/dL): concentração de nitrogênio ureico no leite em mg/dL; ⁸Nitrogênio urinário (mg/dL): concentração de nitrogênio urinário em mg/dL; ⁹NUU (mg/dL): concentração de nitrogênio ureico na urina em mg/dL.

As análises de variâncias para as concentrações de glicose (mg/dL), gama glutamil transferase (GGT) (U/L), aspartato amino transferase (AST) (U/L), uréia no plasma (UP) (mg/dL), nitrogênio ureico no plasma (NUP) (mg/dL), uréia no leite (UL) (mg/dL), nitrogênio ureico no leite (NUL) (mg/dL), nitrogênio urinário (NU) (mg/dL) e nitrogênio ureico na urina (NUU) (mg/dL) estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 11. Resultados das análises de variâncias para concentração de glicose (mg/dL), gama glutamil transferase (GGT) (U/L), aspartato amino transferase (AST) (U/L), uréia no plasma (UP) (mg/dL), nitrogênio ureico no plasma (NUP) (mg/dL), uréia no leite (UL) (mg/dL), nitrogênio ureico no leite (NUL) (mg/dL), nitrogênio urinário (NU) (mg/dL) e nitrogênio ureico na urina (NUU) (mg/dL).

| Variável | A1A1 ¹ | A1A2 ² | A2A2 ³ | EPM ⁶ | P_valor ⁴ |
|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------------|----------------------|
| | MED ⁵ | MED ⁵ | MED ⁵ | | |
| GLIC ⁷ | 58,28b | 55,72b | 67,78 ^a | 1,53 | 0,0002 |
| GGT ⁸ | 44,21 | 41,61 | 45,28 | 1,97 | 0,7596 |
| AST ⁹ | 52,33 | 53,85 | 57,66 | 1,55 | 0,3780 |
| UP ¹⁰ | 36,54 | 40,96 | 34,94 | 1,55 | 0,2771 |
| NUP ¹¹ | 17,08 | 19,14 | 16,33 | 0,72 | 0,2777 |
| UL ¹² | 34,91 | 44,84 | 37,20 | 2,02 | 0,1058 |
| NUL ¹³ | 16,31 | 20,96 | 17,39 | 0,94 | 0,1059 |
| NU ¹⁴ | 915,13 | 1024,42 | 1065,34 | 71,13 | 0,6984 |
| NUU ¹⁵ | 427,43 | 478,70 | 497,83 | 33,26 | 0,6973 |

¹Corresponde ao leite provenientes de vacas da raça Holandesa portadoras do genótipo A1A1 para o gene da β -caseína; ²Corresponde ao leite provenientes de vacas da raça Holandesa portadoras do genótipo A1A2 para o gene da β -caseína; ³Corresponde ao leite provenientes de vacas da raça Holandesa portadoras do genótipo A2A2 para o gene da β -caseína; ⁴p_valor: probabilidade para genótipo pelo Teste de Fisher, utilizando-se $\alpha=5\%$ e

considerando diferença estatística significativa com $P < 0,05$; ⁵Média observada para as diferentes variáveis; ⁶Erro padrão da média observado para as diferentes variáveis; ⁷Glicose (mg/dL): concentração de glicose no sangue em mg/dL; ⁸GGT (U/L): concentração da enzima gama glutamil transferase no sangue em U/L; ⁹AST (U/L): concentração da enzima aspartato aminotransferase no sangue em U/L; ¹⁰Ureia plasmática (mg/dL): concentração de ureia no plasma sanguíneo em mg/dL; ¹¹NUP (mg/dL): concentração de nitrogênio ureico no plasma sanguíneo em mg/dL; ¹²Ureia no leite (mg/dL): concentração de ureia no leite em mg/dL; ¹³NUL (mg/dL): concentração de nitrogênio ureico no leite em mg/dL; ¹⁴NU (mg/dL): concentração de nitrogênio urinário em mg/dL; ¹⁵NUU (mg/dL): concentração de nitrogênio ureico na urina em mg/dL. Médias seguidas por letras diferentes, diferem significativamente entre si, de acordo com o Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

A partir das análises dos efeitos dos genótipos sobre metabólitos sanguíneos observou-se que para a variável concentração de glicose no sangue em mg/dL, houve efeito entre os três genótipos ($p_valor = 0,0002$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A2A2 apresentaram as maiores médias ($67,68a \pm 1,31$), seguida pelos genótipos A1A1 ($58,28b \pm 2,31$) e A1A2 ($55,72b \pm 1,28$) que apresentaram as menores médias, diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%; para a variável concentração da enzima gama glutamil transferase (GGT) no sangue em U/L, observou-se que não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos ($p_valor = 0,7596$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A2A2 apresentaram as maiores médias ($45,28 \pm 4,78$), seguida pelo genótipo A1A1 ($44,21 \pm 3,23$) e pelo genótipo A1A2 com a menor média ($41,61 \pm 2,24$), não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%; para a variável concentração da enzima aspartato aminotransferase (AST) no sangue em U/L, observou-se que não houve efeito estatisticamente significativo entre os três diferentes genótipos ($p_valor = 0,378$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A2A2 apresentaram as maiores médias ($57,66 \pm 1,71$), seguida pelo genótipo A1A2 ($53,85 \pm 3,34$) e pelo genótipo A1A1 com a menor média ($52,33 \pm 2,77$), não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%; para a variável concentração de ureia plasmática em mg/dL, observou-se que não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos ($p_valor = 0,2771$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A1A2 apresentaram as maiores médias ($40,96 \pm 0,99$), seguida pelo genótipo A1A1 ($36,54 \pm 3,71$) e pelo genótipo A2A2 com a menor média ($34,94 \pm 2,47$), não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%; para a variável concentração de nitrogênio ureico no plasma sanguíneo (NUP) em mg/dL, observou-se que não houve efeito estatisticamente significativo entre os três diferentes genótipos ($p_valor = 0,2777$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A1A2 apresentaram as maiores médias ($19,14 \pm 0,46$), seguida pelo genótipo A1A1 ($17,08 \pm 1,73$) e pelo genótipo A2A2 com a menor média ($16,33 \pm 1,15$), não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%.

A partir das análises dos efeitos dos genótipos sobre metabólitos nitrogenados no leite observou-se que para a variável concentração de ureia no leite em mg/dL, não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos ($p_{\text{valor}} = 0,1058$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A1A2 apresentaram as maiores médias ($44,84 \pm 1,74$), seguida pelos genótipo A2A2 ($37,20 \pm 3,20$) e A1A1 ($34,91 \pm 4,21$) que apresentaram as menores médias, não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%; para a variável concentração de nitrogênio ureico no leite (NUL) em mg/ dL, observou-se que não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos ($p_{\text{valor}} = 0,1059$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A1A2 apresentaram as maiores médias ($20,96 \pm 0,81$), seguida pelos genótipo A2A2 ($17,39 \pm 1,50$) e A1A1 ($16,31 \pm 1,97$) que apresentaram as menores médias, não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%.

A partir das análises dos efeitos dos genótipos sobre metabólitos nitrogenados na urina observou-se que para a variável concentração de nitrogênio urinário em mg/dL, não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos ($p_{\text{valor}} = 0,6984$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A2A2 apresentaram as maiores médias ($1.065,34 \pm 130,43$), seguida pelo genótipo A1A2 ($1.024,42 \pm 132,98$) e pelo genótipo A1A1 com a menor média ($915,13 \pm 120,44$), não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%; para variável concentração de nitrogênio ureico na urina (NUU) em mg/dL, não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos ($p_{\text{valor}} = 0,6973$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A2A2 apresentaram as maiores médias ($497,83 \pm 60,65$), seguida pelo genótipo A1A2 ($478,70 \pm 62,14$) e pelo genótipo A1A1 com a menor média ($427,43 \pm 56,43$), não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%.

3.3.2. Análise composição e CCS do leite

As estatísticas descritivas para as concentrações de teor de gordura (%), teor proteína (%), teor de lactose (%), teor de sólidos totais (%), teor de sólidos não gordurosos (%) e contagem de células somáticas ($\log \text{cél}/\text{mL}^{-1}$) estão apresentadas na tabela 12.

Tabela 12. Número de observações (N), média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MIN) e valores máximos (MAX) para composição e CCS do leite expressos qualitativamente (%) e quantitativamente ($\log \text{cél}/\text{mL}^{-1}$).

| Variável | N | MED | DP | CV | MIN | MAX |
|-------------------|----|-------|------|-------|-------|-------|
| GORD ¹ | 18 | 3,68 | 0,84 | 22,88 | 2,50 | 6,07 |
| PROT ² | 18 | 3,11 | 0,27 | 8,64 | 2,75 | 3,58 |
| LACT ³ | 18 | 4,72 | 0,19 | 4,13 | 4,42 | 5,04 |
| ST ⁴ | 18 | 12,44 | 0,99 | 7,93 | 11,24 | 15,03 |
| SNG ⁵ | 18 | 8,76 | 0,31 | 3,50 | 8,33 | 9,38 |
| CCS ⁶ | 18 | 1,63 | 0,32 | 19,86 | 1,04 | 2,43 |

¹Teor de gordura em porcentagem (%); ²Teor de proteína em porcentagem (%); ³Teor de lactose em porcentagem (%); ⁴Teor de sólidos em porcentagem (%); ⁵Teor de sólidos não gordurosos em porcentagem (%); ⁶Contagem de células somáticas do leite (log céls/mL⁻¹).

As análises de variâncias para as concentrações de teor de gordura (%), teor proteína (%), teor de lactose (%), teor de sólidos totais (%), teor de sólidos não gordurosos (%) e contagem de células somáticas (log céls/mL⁻¹) estão apresentadas na tabela 13.

Tabela 13. Resultados das análises de variâncias para as concentrações de teor de gordura (%), teor proteína (%), teor de lactose (%), teor de sólidos totais (%), teor de sólidos não gordurosos (%) e contagem de células somáticas (log céls/mL⁻¹céls / mL).

| Variável | A1A1 ¹ | | A1A2 ² | | A2A2 ³ | | P_valor ⁴ |
|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|----------------------|
| | MED ⁵ | EPM ⁶ | MED ⁵ | EPM ⁶ | MED ⁵ | EPM ⁶ | |
| GORD ⁷ | 3,64 | 0,36 | 4,04 | 0,42 | 3,37 | 0,23 | 0,4085 |
| PROT ⁸ | 3,05 | 0,12 | 3,26 | 0,09 | 3,01 | 0,10 | 0,2251 |
| LACT ⁹ | 4,60 | 0,08 | 4,77 | 0,09 | 4,79 | 0,06 | 0,1864 |
| ST ¹⁰ | 12,23 | 0,40 | 13,02 | 0,45 | 12,08 | 0,29 | 0,671 |
| SNG ¹¹ | 8,60 | 0,09 | 8,98 | 0,13 | 8,70 | 0,11 | 0,0749 |
| CCS ¹² | 1,64 | 0,08 | 1,60 | 0,19 | 1,64 | 0,12 | 0,9647 |

¹Corresponde ao leite provenientes de vacas da raça Holandesa portadoras do genótipo A1A1 para o gene da β -caseína; ²Corresponde ao leite provenientes de vacas da raça Holandesa portadoras do genótipo A1A2 para o gene da β -caseína; ³Corresponde ao leite provenientes de vacas da raça Holandesa portadoras do genótipo A2A2 para o gene da β -caseína; ⁴p_valor: probabilidade para genótipo pelo Teste de Fisher, utilizando-se $\alpha=5\%$ e considerando diferença estatística significativa com $P<0,05$; ⁵Média observada para as diferentes variáveis; ⁶Erro padrão da média observado para as diferentes variáveis; ⁷Teor de gordura em porcentagem (%); ⁸Teor de proteína em porcentagem (%); ⁹Teor de lactose em porcentagem (%); ¹⁰Teor de sólidos em porcentagem (%); ¹¹Teor de sólidos não gordurosos em porcentagem (%); ¹²Contagem de células somáticas do leite (log céls/mL⁻¹).

A partir das análises dos efeitos dos genótipos sobre a composição e CCS do leite observou-se que para a variável teor de gordura (%), não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos (p_valor = 0,4085) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A1A2 apresentaram as maiores médias ($4,04 \pm 0,42$), seguida pelos

genótipos A1A1 ($3,64 \pm 0,36$) e pelo genótipo A2A2 ($3,37 \pm 0,23$) que apresentou a menor média, não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%; para variável teor de proteína (%) observou-se que não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos ($p_valor = 0,2251$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A1A2 apresentaram as maiores médias ($3,26 \pm 0,09$), seguida pelo genótipo A1A1 ($3,05 \pm 0,12$) e pelo genótipo A2A2 com a menor média ($3,01 \pm 0,10$), não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%; para variável teor de lactose (%) observou-se que não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos ($p_valor = 0,1864$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A2A2 apresentaram as maiores médias ($4,79 \pm 0,06$), seguida pelo genótipo A1A2 ($4,77 \pm 0,09$) e pelo A1A1 com a menor média ($4,60 \pm 0,08$), não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%; para variável teor de sólidos totais (%) observou-se que não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos ($p_valor = 0,2155$) para o gene da β -caseína, em que as vacas com o genótipo A1A2 apresentaram as maiores médias ($13,02 \pm 0,45$), seguida pelo genótipo A1A1 ($12,23 \pm 0,40$) e pelo genótipo A2A2 com a menor média ($12,08 \pm 0,29$), não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%; para variável teor sólidos não gordurosos (SNG) (%) observou-se que não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos ($p_valor = 0,0749$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A1A2 apresentaram as maiores médias ($8,98 \pm 0,13$), seguida pelo genótipo A2A2 ($8,70 \pm 0,11$) e pelo genótipo A1A1 com a menor média ($8,60 \pm 0,09$), não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%; para variável contagem de células somáticas em \log céls/ mL^{-1} observou-se que não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos ($p_valor = 0,9647$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com os genótipos A1A1 e A2A2 apresentaram as maiores médias ($1,64 \pm 0,08$) e ($1,64 \pm 0,12$), respectivamente, seguida pelo genótipo A1A2 com a menor média ($1,60 \pm 0,19$), não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%.

3.3.3. Análise de produção de leite e dias em lactação

As estatísticas descritivas para a média de produção de leite diária observada durante 30 dias (litros/vaca/dia) e dias em lactação estão apresentadas na tabela 14.

Tabela 14. Número de observações (N), média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MIN) e valores máximos (MAX) para média de produção de leite diária observada nos últimos 30 dias e dias em lactação.

| Variável | N | MED | DP | CV | MIN | MAX |
|------------------|----|--------|-------|-------|-------|-------|
| PL ¹ | 18 | 36,53 | 9,62 | 26,33 | 13,51 | 54,47 |
| DEL ² | 18 | 216,61 | 96,37 | 44,49 | 110 | 394 |

¹Média de produção de leite diária observada nos últimos 30 dias (litros/vaca/dia); ²Dias em lactação.

As análises de variâncias para média de produção de leite observada durante 30 dias e dias em lactação estão apresentadas na tabela 15.

Tabela 15. Resultados das análises de variâncias para média de produção de leite observada durante 30 dias e dias em lactação.

| Variável | A1A1 ¹ | | A1A2 ² | | A2A2 ³ | | P_valor ⁴ |
|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|----------------------|
| | MED ⁵ | EPM ⁶ | MED ⁵ | EPM ⁶ | MED ⁵ | EPM ⁶ | |
| PL ⁷ | 38,07 | 6,22 | 37,34 | 2,45 | 34,19 | 2,46 | 0,7810 |
| DEL ⁸ | 226,33 | 47,70 | 227,00 | 35,78 | 196,50 | 39,82 | 0,8395 |

¹Corresponde ao leite provenientes de vacas da raça Holandesa portadoras do genótipo A1A1 para o gene da β -caseína; ²Corresponde ao leite provenientes de vacas da raça Holandesa portadoras do genótipo A1A2 para o gene da β -caseína; ³Corresponde ao leite provenientes de vacas da raça Holandesa portadoras do genótipo A2A2 para o gene da β -caseína; ⁴p_valor: probabilidade para genótipo pelo Teste de Fisher, utilizando-se $\alpha=5\%$ e considerando diferença estatística significativa com $P<0,05$; ⁵Média observada para as diferentes variáveis; ⁶Erro padrão da média observado para as diferentes variáveis; ⁷Média de produção de leite observada durante 30 dias (litros/vaca/dia); ⁸Dias em lactação. Médias seguidas por letras diferentes, diferem significativamente entre si, de acordo com o Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

A partir das análises dos efeitos dos genótipos sobre produção de leite observada durante 30 dias e dias em lactação e observou-se que para a variável produção de leite (litros/vaca/dia), não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos ($p_valor = 0,7810$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A1A1 apresentaram as maiores médias ($38,07 \pm 6,22$), seguida pelo genótipo A1A2 ($37,34 \pm 2,45$) e pelo genótipo A2A2 ($34,19 \pm 2,46$) que apresentou a menor média, não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%; para variável dias em lactação (DEL), observou-se que não houve efeito estatisticamente significativo entre os três genótipos ($p_valor = 0,8395$) para o gene da β -caseína em que, as vacas com o genótipo A1A2 apresentaram as maiores médias ($227,00 \pm 35,78$), seguida pelo genótipo A1A1 ($226,33 \pm 47,70$) e pelo genótipo A2A2 ($196,50 \pm 39,82$) que apresentou a menor média, não diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%;

3.3. DISCUSSÃO

Para a variável glicose (mg/dL) foi observada diferença estatisticamente significativa ($p_{\text{valor}} = 0,0002$) entre os três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína, em que a concentração de glicose apresentou valor médio foi de 60,59 (litros/vaca/dia) sendo as vacas portadoras do genótipo A2A2 para o gene da β -caseína com valor de $67,78a \pm 1,32$ seguida do A1A1 com valor de $58,28b \pm 2,13$ e A1A2 com valor de $55,72b \pm 1,28$, diferindo-se estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%.

Sendo que, Kaneko et al. (2008) afirmam que os níveis desejáveis de glicose no sangue de vacas estão entre 45 a 75 mg/dL, demonstrando assim que apesar dessa variação nesse metabólito energético sanguíneo, o parâmetro plasmático está dentro do intervalo de referência, sugerindo manutenção dos mecanismos homeostáticos. De acordo com González (2000) e Cardoso et al. (2011), o nível de glicose plasmática é o indicador menos expressivo do perfil para avaliação do status energético do animal, devido à insensibilidade da glicemia, às mudanças nutricionais e à sua sensibilidade ao estresse. Entretanto, pode ser útil em condições de déficit energético severo e em animais que não estão em gestação e lactação.

Já para as demais variáveis não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p_{\text{valor}} > 0,05$) entre os três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína. As variáveis proteicas de gama glutamil transferase (GGT) (U/L) e aspartato amino transferase (AST) (U/L) apresentaram valores médios de 43,62 ($p_{\text{valor}} = 0,7596$) e de 54,61 U/L ($p_{\text{valor}} = 0,3780$), respectivamente. As variáveis nitrogenadas uréia plasmática no sangue (mg/dL), nitrogênio ureico no plasma (mg/dL), ureia no leite (mg/dL), nitrogênio ureico no leite (mg/dL), nitrogênio urinário (mg/dL) e nitrogênio ureico na urina (mg/dL), apresentaram valores médios de 37,48 mg/dL ($p_{\text{valor}} = 0,2771$), de 17,51 mg/dL ($p_{\text{valor}} = 0,2777$), de 38,98 mg/dL ($p_{\text{valor}} = 0,1058$), de 18,22 mg/dL ($p_{\text{valor}} = 10,59$), de 1.001,63 ($p_{\text{valor}} = 0,6984$) e de 467,98 mg/dL ($p_{\text{valor}} = 0,6973$), respectivamente.

Em bovinos os níveis sanguíneos desejáveis de GGT estão entre 6,1 U/L a 17,4 U/L; de AST estão entre 78 a 132 U/L; de uréia plasmática no sangue estão entre 23 a 58 mg/dL; de nitrogênio ureico no plasma é de 15 mg/dL; de ureia no leite estão entre 17 a 30 mg/dL; de nitrogênio ureico no leite estão entre 8 a 25 mg/dL (KANeko et al., 2008; ROSELER et al., 1993; De BRABANDER et al.; 1999). Para vacas da raça Holandesa, usa-se a equação para estimar a concentração de nitrogênio urinário (mg/dL) = $17,64 \times PC$ (kg) \times MUN (mg/dL) (KAUFFMAN et al., 2001) e pela equação de predição para estimar a concentração de nitrogênio uréico na urina (mg/dL) = nitrogênio urinário (mg/dL) / 2,14 (GUTMANN et al., 1974). Com exceção das concentrações de GGT (mg/dL) e de nitrogênio ureico no plasma

(mg/dL), todas os demais metabólitos observados estão dentro do intervalo de referência esperado, sugerindo adequada atividade metabólica.

González et al. (2006) afirmam que a elevação na concentração da GGT em vacas leiteiras pode ser um indicativo de problemas hepáticos, como a lipidose hepática, fasciola hepática e por indução de aumento de produção de glicocorticoides. Para a elevada concentração de nitrogênio ureico no plasma, Wittwer (2000) explica que cerca de 70% da proteína é transformada em amônia no rúmen e uma parte é absorvida para a circulação geral e através da via sanguínea, chega ao fígado, servindo de matéria para a formação de ureia, tendo os níveis de ureia relação direta com o nível de proteína na alimentação. González et al. (2002) ressaltaram que rebanhos que utilizam dietas ricas em teor de proteína bruta encontram seus valores altos no sangue. Por outro lado, uma baixa ingestão parece pouco afetar em seus índices.

Em geral, os fatores que afetam a composição do leite incluem a estação do ano (PACHECO-PAPPENHEIM et al., 2021), alimentação (ANDREEN et al., 2021), estágio da lactação, intervalo de ordenha, estado de saúde da vaca (CAVALLIN et al., 2021; PIRES et al., 2022) e fatores genéticos (HECK et al., 2009; LAMBERTZ et al., 2014). Os efeitos da temperatura e umidade ambientais no desempenho, fertilidade e bem-estar relacionados ao leite tem sido amplamente estudado em bovinos leiteiro (KADZERE et al., 2002; NASR et al., 2017) assim como os efeitos das mudanças sazonais na composição do leite (ELGERSMA et al., 2004; YANG et al., 2013).

Para o período analisado, as temperaturas do ar mínima e máxima registrada foram de 9,4°C e 20,7°C, respectivamente, com temperatura média periódica de 16,7 °C para as coordenadas geográficas estabelecidas sendo assim, infere-se que durante o período analisado, as vacas portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína estavam em conforto térmico, não apresentando limitação no consumo e/ou na produção de leite e elevação na temperatura corporal e frequência respiratória dos animais pois segundo Yousef (1986) e Kadzere et al. (2002), a zona de termoneutralidade em vacas leiteiras se encontra na faixa entre 5 e 25°C.

Para o período analisado, as umidades relativas do ar mínima e máxima registrada foram de 49,6% e 86,6%, respectivamente, com umidade relativa do ar média periódica de 64,5 % para as coordenadas geográficas sendo assim, infere-se que durante o período analisado, as portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína estavam em conforto térmico, pois usando a equação do índice de temperatura e umidade

(ITU) sugerido por Thom (1959), obteve-se ITU de 61,21 indicando assim que os animais não estavam em situação de estresse térmico (BERMAN, 2005; LCI 1970).

Para as variáveis composição e CCS do leite, não foi observado diferenças estatisticamente significativas ($p_{\text{valor}} > 0,05$) entre os três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína. As variáveis de teor de gordura, teor de proteína, teor de lactose, teor de sólidos totais, teor de sólidos não gordurosos e contagem de células somáticas (\log céls/mL⁻¹) apresentaram valores médios de 3,68% ($p_{\text{valor}} = 0,4085$), de 3,11% ($p_{\text{valor}} = 0,2251$), de 4,72 % ($p_{\text{valor}} = 0,1864$), de 12,44% ($p_{\text{valor}} = 0,6710$), de 8,76% ($p_{\text{valor}} = 0,0749$) e de 1,63 (\log céls/mL) ($p_{\text{valor}} = 0,9647$), respectivamente.

De acordo com a instrução normativa nº 76 de 2018, o leite cru refrigerado deve conter teor mínimo de gordura de 3,0g/100g; teor mínimo de proteína total de 2,9g/100g; teor mínimo de lactose anidra de 4,3g/100g; teor mínimo de sólidos totais de 11,4g/100g; teor mínimo de sólidos não gordurosos de 8,4g/100g; e contagem de células somáticas de no máximo 500 mil céls./mL (BRASIL, 2018), sendo assim, o leite das vacas com os três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína estão dentro do intervalo de referência, atendendo o recomendado pela legislação brasileira vigente.

Resultados semelhantes foram encontrados por Miluchová et al. (2023), que ao estudarem o efeito dos genótipos do gene β -caseína na composição de leite em um rebanho com 1.478 vacas da raça Holandesa observaram que a média do teor de gordura foi de 3,76% e do teor de proteína foi de 3,31%. Sendo observado média de produção de leite de 32,52 kg/vaca, de teor de gordura de 3,87% e de teor de proteína de 3,27% para o genótipo A1A1; média de produção de leite (kg/vaca) de 31,58 kg/vaca, de teor de gordura de 3,77% e de teor de proteína de 3,31% para o genótipo A1A2 e, média de produção de leite de 31,73 kg/vaca, de teor de gordura de 3,76% e de teor de proteína de 3,32 % para o genótipo A2A2. Albarella et al. (2020), avaliando o efeito do polimorfismo do gene da β -caseína sobre as características de qualidade do leite de 53 vacas da raça Holandesa portadoras dos três genótipos (8 A1A1, 25 A1A2 e 20 A2A2) para o gene da β -caseína, observaram que a média do teor de gordura de 3,71%, de proteína de 3,37%, de lactose de 4,68%, de sólidos totais de 12,48% e de sólidos não gordurosos de 8,83%. Sendo observado para teor de gordura de 3,66% no genótipo A1A1, de 3,81% no genótipo A1A2 e de 3,67% no genótipo A2A2; para teor de proteína de 3,21% no genótipo A1A1, de 3,43% no genótipo A1A2 e de 3,49% no genótipo A2A2; para teor de lactose de 4,69% no genótipo A1A1, de 4,68% no genótipo A1A2 e de 4,69% no genótipo A2A2, para teor de sólidos totais de 12,01% no genótipo A1A1, de 12,72% no genótipo A1A2 e de 12,73% no genótipo A2A2; para teor de sólidos não gordurosos de

8,64% no genótipo A1A1, de 8,90% no genótipo A1A2 e de 8,97% no genótipo A1A1. Reforçando assim, que mesmo encontrando teores de constituintes acima do observado no presente estudo, nota-se que os genótipos para o gene da β -caseína não alteraram a composição físico-química do leite.

Já Marino (2021), analisando o banco de dados de rebanho comercial contendo 1.816 informações de vacas da raça Holandesa portadora dos três genótipos (391 A1A1, 863 A1A2 e 562 A2A2) para o gene da β -caseína, observou uma média do teor de gordura de 3,64%, média do teor de proteína de 3,06%, média do teor de lactose de 4,66%, média do teor de sólidos totais de 12,35%, média do teor de sólidos não gordurosos de 8,70% e média de contagem de células somáticas de 1,91 log céls/ mL. Sendo observado para teor de gordura de 3,55% no genótipo A1A1, de 3,47% no genótipo A1A2 e de 3,50% no genótipo A2A2 (p_valor = 0,1522); para teor de proteína de 3,06% no genótipo A1A1, de 3,07% no genótipo A1A2 e de 3,08% no genótipo A2A2 (p_valor = 0,2905); para teor de lactose de 4,57% no genótipo A1A1, de 4,55% no genótipo A1A2 e de 4,56% no genótipo A2A2 (p_valor = 0,1396); para teor de sólidos totais de 12,17% no genótipo A1A1 a, de 12,09% no genótipo A1A2 e de 12,13% no genótipo A2A2 (p_valor = 0,1539); para teor de sólidos não gordurosos de 8,61% no genótipo A1A1, de 8,61% no genótipo A1A2 e de 8,63% no genótipo A1A1 (p_valor = 0,4804); para contagem de células somáticas (CCS) em log de céls/mL⁻¹ de 2,26% no genótipo A1A1, de 2,19% no genótipo A1A2 e de 2,23% no genótipo A2A2 (p_valor = 0,1449). Salientando que mesmo analisando um número amostral grande, os genótipos para o gene da β -caseína não é o responsável por alterações na qualidade do leite de vacas da raça Holandesa em lactação em ambientes tropicais.

Ivankovic et al. (2020), evidenciaram que mesmo em um rebanho com a maiorias das vacas em lactação sendo portadora do genótipo A2A2 para o gene da β -caseína e com os teores dos constituintes acima dos encontrados no presente estudo, o polimorfismo dos alelos A1e A2 não modificam a composição do leite, pois obtiveram indicadores de teor de gordura de 4,21 % para 14 vacas portadoras do genótipo A1A1 para o gene da β -caseína, de 4,03% para 82 vacas portadoras do genótipo A1A2 e de 4,12% para 84 vacas portadoras do genótipo A2A2. Para o teor de proteína foram observados valores de 3,47% para 14 vacas portadoras do genótipo A1A1, valores de 3,37% para 82 vacas portadoras do genótipo A1A2 e valores de 3,37% para 84 vacas portadoras do genótipo A2A2.

Para as variáveis, produção de leite (litros/vaca/ dia) e dias em lactação (DEL) não foram observadas diferenças estatísticas significativas (p_valor > 0,05) entre os três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína. As variáveis de produção de leite

(litros/vaca/dia) e dias em lactação (DEL) apresentaram valores médios de 36,53 litros/vaca/dia ($p_valor = 0,7810$) e de 216,61 DEL ($p_valor = 0,8395$), respectivamente, com valores acima dos observados em estudos anteriores.

Resultados semelhantes foram encontrados por Miluchová et al. (2023), que ao estudarem o efeito dos genótipos do gene β -caseína na produção de leite em um rebanho com 1.478 vacas da raça Holandesa observaram que a média de produção de leite foi de 31,71 kg; semelhantes também foram vistos por Kumar et al. (2022), que observaram média de produção de leite de 12,32 kg/dia, sendo de 11,87 kg/dia para as vacas portadoras do genótipo A1A1, de 10,81 kg/dia para as vacas portadoras do genótipo A1A2 e de 11,07 kg/dia para as vacas portadoras do genótipo A2A2. Ainda no presente estudo, foi observado também, para a variável dias em lactação média de 333,21 dias, sendo de 315 dias para as vacas portadoras do genótipo A1A1, de 340 dias para as vacas portadoras do genótipo A1A2 e de 344 dias para as vacas portadoras do genótipo A2A2; semelhantes aos de Ivankovic et al. (2020), que obtiveram média de produção de leite para vacas de 3^a lactação de 30,64 kg/dia. Com indicadores de produção de leite para 14 vacas portadoras do genótipo A1A1 de 30,13 Kg/dia, para 82 vacas portadoras do genótipo A1A2 de 30,41 Kg/dia e, para 84 vacas portadoras do genótipo A2A2 de 31,38 Kg/dia; e semelhantes ao encontrados por Kumar et al. (2020), que observaram média de produção de leite de 11,05 kg/dia, sendo de 10,16 kg/dia para vacas portadoras do genótipo A1A1, de 11,38 kg/dia para vacas portadoras do genótipo A1A2 e de 11,23 kg/dia para vacas portadoras do genótipo A2A2. Foi observado também para dias em lactação média de 318,65 dias, sendo de 313,68 dias para vacas portadoras do genótipo A1A1, de 336,04 para vacas portadoras do genótipo A1A2 e de 326,62 para vacas portadoras do genótipo A2A2. Demonstrando que mesmo em sistemas de criação tecnificados com rebanhos de média e baixa produção de leite e em fase final de lactação, os genótipos para o gene da β -caseína não influenciaram a produção e a duração da lactação.

3.4. CONCLUSÃO

Nas condições que o experimento foi desenvolvido, conclui-se que para os metabólitos (energético, enzimáticos e nitrogenados) não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 para o gene da β -caseína, apenas o genótipo A2A2 foi associado com as maiores médias de concentração de glicose (mg/dL). Para composição e contagem de células somáticas do leite, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os três genótipos, assim como para as características de

produção e duração da lactação. Porém, numericamente, o genótipo A1A2 apresentou maiores valores para os teores de gordura, proteína, sólidos totais e sólidos não gordurosos e menores valores para CCS (\log céls. / mL^{-1}), concentração dos metabólitos enzimáticos e nitrogenados, produção de leite e dias em lactação, mostrando uma possível superioridade do genótipo heterozigoto (A1A2) em relação a ambos homozigotos (A1A1 e A2A2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARELLA, S.; SEVAGGI, M.; D'ANZA, E.; COSENZA, G.; CAIRA, S.; SCALONI, A.; FONTANA, A.; PERETTI, V.; CIOTOLA, F. Influence of the Casein Composite Genotype on Milk Quality and Coagulation Properties in the Endangered Agerolese Cattle Breed. **Animals**, v. 10, p. 1 – 13, 2020.
- ALEANDRI, R.; BUTTAZZONI, L.G.; SCHNEIDER, J.C.; CAROLI, A.; DAVOLI, R. The Effects of Milk Protein Polymorphisms on Milk Components and Cheese-Producing Ability. **Journal of Dairy Science**, 73, 241–255, 1990.
- ANDREEN, D. M.; HAAN, M. M.; DECHOW, C. D.; HARVATINE, K. J. Determination of relationships between rumination and milk fat concentration and fatty acid profile using data from commercial rumination sensing systems. **Journal of Dairy Science**, v. 104, 8901 – 8917, 2021.
- BERMAN, A. Estimates of heat stress relief needs for Holstein dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 1377 – 1384, 2005.
- BISUTTI, V.; PEGOLO, S.; GIANNUZZI, D.; MOTA, L. F. M.; VANZIN, A. TOSCANO, A.; TREVISI, E.; MARSAN, P. A.; BRASCA, M.; CECCHINATO, A. The β -casein (*CSN2*) A2 allelic variant alters milk protein profile and slightly worsens coagulation properties in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 105, p. 3794 – 3809, 2022.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 76, *Diário Oficial da União*, de 26 de novembro de 2018.
- BROOKE-TAYLOR, S. et al. Systematic Review of the Gastrointestinal Effects of A1 Compared with A2 β -Casein. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 8, n. 5, p. 739–748, set. 2017.
- ÇARDAK, A. D. Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition of milk from Holstein-Friesian and Simmentaler cows. **South African Journal of Animal Sciences**, v. 35, n. 1, p. 41–47, 2005.
- CARDOSO, D. et al. Perfil bioquímico de bovinos de raças localmente adaptadas em sistema intensivo de criação. 2011. In: 21º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFG, 2011, Goiânia. *Anais...Goiânia*, 2011.
- CAROLI, A. M.; SAVINO, S.; BULGARI, O.; MONTI, E. Detecting β -Casein Variation in Bovine Milk. **Molecules**, v. 141, p. 2 – 7, 2016.
- CAVALLINI, D.; MAMMI, L.M.E.; BUONAIUTO, G.; PALMONARI, A.; VALLE, E.; FORMIGONI, A. Immune-metabolic-inflammatory markers in Holstein cows exposed to a nutritional and environmental stressing challenge. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 105, p. 42 – 55, 2021.
- CERIOTTI, G.; CHESSA, S.; BOLLA, P.; BUDELLI, E.; BIANCHI, L.; DURANTI, E.; CAROLI, A. Single nucleotide polymorphisms in the ovine casein genes detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.8, p. 2606 - 2613, 2004.

COOKE, R. F.; DEL RÍO, N. S.; CARAVIELLO, D. Z.; BERTICS, S. J.; RAMOS, M. H.; GRUMMER, R. R. Supplemental Choline for Prevention and Alleviation of Fatty Liver in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2413 – 2418, 2007.

DE BRABANDER, D. L.; DE BOEVER, J. L., VANACKER, J. M., BOUCQUE, C. H. V., BOTTERMAN, S. M. Evaluation of physical structure in dairy cattle nutrition. *In: Recent advances in animal nutrition*, p. 111 – 145, 1999.

DEMETER, R. M.; MARKIEWICZ, K.; VAN ARENDONK, J. A. M.; BOVENHUIS, H. Relationships between milk protein composition, milk protein variants, and cow fertility traits in Dutch Holstein-Friesian cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5495 – 5502, 2010.

DI STASIO, L.; MARIANI, P. The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production. **Zootecnic Nutrition Animal**, v. 26, p. 69 – 90, 2000.

DURMAN, T. Perfil nutricional em bezerros holandeses confinados. In: 38º CONGRESSO BRASILEIRO EM MEDICINA VETERINÁRIA, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis, v. 1, p. 1 – 2, 2011.

ELFERINK, A. J. W.; ENTIRIWAA, D.; BULGARELLI, P.; SMITS, N. G. E.; PETERS, J. Development of a Microsphere-Based Immunoassay Authenticating A2 Milk and Species Purity in the Milk Production Chain. **Molecules**, v. 27, n. 3199, p. 1 – 11, 2022.

ELGERSMA, A.; ELLEN, G.; VAN DER HORST, H.; BOER, H.; DEKKER, P.R.; TAMMINGA, S. Quick changes in milk fat composition from cows after transition from fresh grass to a silage diet. **Anim. Feed. Sci. Technol**, v. 117, p. 13 – 27, 2004.

FARRELL, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1641 – 1674, 2004.

FIROUZAMANDI, M.; GHOLAMI, M.; TOLOUI, M.; ESHGHI, D. Genetic Variation of β -Casein Gene Using AS-PCR and ARMS-PCR Techniques in Bovine Populations. **Russian Journal Genetics**, v. 54, p. 1352 – 1357, 2018.

GLANTZ, M.; DEVOLD, T. G.; VEGARUD, G. E.; MANSSON, H. L.; STALHAM-MAR, H.; PAULSSON, M. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. **Journal of Dairy Science**, v. 93; p. 1444 – 1451, 2010.

GONZÁLEZ, C.; DÍAZ, I.; LEÓN, M.; VECCHIONACCE, H.; BLANCO, A.; LY, J., 2002. Growth performance and carcass traits in pigs fed sweet potato (*Ipomoea batatas* [Lam.] L) root meal. **Livestock Research for Rural Development**, v. 14, 2002.

GONZÁLEZ, F. H. D. Variações sanguíneas de ureia, creatinina, albumina e fósforo em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. **Veterinária**, v. 20, p. 59-62, 2000.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. F. S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, p. 73-89, 2003.

GONZÁLEZ, J.; FARÍA-MÁRMOL, J.; RODRÍGUEZ, C. A.; OUARTI, M.; ALVIR, M. R.; CENTENO, C. Protein value for ruminants of a sample of whole cottonseed. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 75 – 81, 2006.

GRANDE P. A., SANTOS, G. T. O uso do perfil metabólico na nutrição de vacas leiteiras. In: *Núcleo Pluridisciplinar de Pesquisa e Estudo da cadeia Produtiva do Leite*, 2008.

GROSCLAUDE, F. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines, **Productions Animales**, v. 1, p. 5 – 17, 1988.

GUTMANN, I.; BERGMEYER, H. U. Reagents for enzymatic analysis. In: *Methoden der enzymatischen analyse*. 3. Ed, v. 2, p. 1839 – 1842, 1974.

HAMMOND, A. C. Use of BUN and MUN as guides for protein and energy supplementation in cattle. **Revista Corpoica**, v. 2, p. 44 – 48, 1998.

HECK, J. M. L.; SCHENNINK, A.; VAN VALENBERG, H. J. F.; BOVENHUIS, H.; VISKER, M. H. P. W.; VAN ARENDONK, J. A. M.; VAN HOOIJDONK, A. C. M. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1192 – 1202, 2009.

HECK, J. M. L.; VAN VALENBERG, H. J. F.; DIJKSTRA, J.; VAN HOOIJDONK, A. C. M. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4745 – 4755, 2009.

IBEAGHA-AWEMU, E. M.; PRINZENBERG, E. M.; JANN, O. C.; LÜHKEN, G.; IBEAGHA, A. E.; ZHAO, X.; ERHARDT, G. Molecular characterization of bovine CSN1S2*B and extensive distribution of zebu specific milk protein alleles in European cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3522 – 3529, 2007.

IKONEN, T.; OJALA, M.; RUOTTINEN, O. Associations between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1026 – 1033, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Dados históricos anuais. Disponível em: <<https://portal.inmet.gov.br/dadoshistoricos>>. Acessado em: 02 de setembro de 2020.

IVANKOVIĆ, A.; PEĆINA, M.; RAMLJAK, J.; PAŠIĆ, V. Genetic polymorphism and effect on milk production of CSN2 gene in conventional and local cattle breeds in Croatia. **Mljekarstvo**, v. 71, p. 3 – 12, 2021.

JANN, O. C.; IBEAGHA-AWEMU, E. M.; OZBEYAZ, C.; ZARAGOZA, P.; WILLIAMS, J. L.; AJMONE-MARSAN, P.; LENSTRA, J. A.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; ERHARDT, G. Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus. **Genetics Selection Evolution**, v. 36, p. 243 – 257, 2004.

JONES, M. L.; ALLISON, R. W. Evaluation of the ruminant complete blood cell count. The Veterinary Clinics of North America. **Food Animal Practice**, v. 23, p. 377 – 402, 2007.

KADZERE, C.T., MURPHY, M.R., SILANIKOVE, N., MALTZ, E. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**, p. 59 – 91, 2002.

KADZERE, C.T.; MURPHY, M.R.; SILANIKOVE, N.; MALTZ, E. Heat stress in lactating dairy cows: A review. **Livestock Production Science**, v. 77, p. 59 – 91, 2002.

KAMIŃSKI, S.; CIEŚLIŃSKA, A.; KOSTYRA, E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, n. 3, p. 189–198, 2007.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *In: Clinical biochemistry of domestic animals*. 6. Ed, 2008.

KAUFFMAN, A. J., PIERRE, N. S. T. The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2284 – 2294, 2001.

KUMAR, A.; KUMAR, S.; SINGH, R. V.; CHAUHAN, A.; KUMAR, A.; SONWANE, ILAYAKUMAR, K.; SINGH, R. Investigation of genetic polymorphism at β -casein A1/A2 loci and association analysis with production & reproduction traits in Vrindavani crossbred cows. **Animal Biotechnology**, v. 33, p. 1562 – 1570, 2022.

KUMAR, A.; SINGH, R. V.; CHAUHAN, A.; ILAYAKUMAR, K.; KUMAR, S.; KUMAR, A.; SONWANE, A.; KUMAR, S.; PANIGRAHI, M.; BHUSHAN, B. Genetic association analysis reveals significant effect of β -casein A1/A2 loci on production and reproduction traits in Frieswal crossbred cows. **Biological Rhythm Research**, v. 51, p. 1259 – 1272, 2020.

LAMBERTZ, C.; SANKER, C.; GAULY, M. Climatic effects on milk production traits and somatic cell score in lactating Holstein-Friesian cows in different housing systems. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 319 – 329, 2014.

LCI. Patterns of transit losses. **Livestock Conservation**, 1970.

LIAO, T. W. Clustering of time series data—A survey. **Pattern Recognition**, v. 38, p. 1857 – 1874, 2005.

LIEN, S.; KANTANEN, J.; OLSAKER, I.; HOLM, L. E.; EYTHORSOTTIR, E.; SANDBERG, K.; DALSGARD, B.; ADALSTEINSSON, S. Comparison of milk protein allele frequencies in Nordic cattle breeds. **Animal Genetics**, v. 30, p. 85 – 91, 1999.

LIN, C. Y.; MCALLISTER, A. J.; NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; BATRA, T. R.; LEE, A. J.; ROY, G. L.; VESELY, J. A.; WAUTHY, J. M.; WINTER, K. A. Association of milk protein types with growth and reproductive performance of dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 29 – 39, 1987.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 15, p. 73 – 83, 2010.

MAHÉ, M. F.; MIRANDA, G.; QUERAL, R.; BADO, A.; ZAFIDRAJAONA, P. S.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of milk proteins in African *Bos taurus* and *Bos indicus* populations. Characterization of variants aS1-Cn H and k-Cn **Genetics Selection Evolution**, v. 31, p. 239 – 253, 1999.

MARINO, E. D. **Influência do polimorfismo do gene CSN-2 na produção e características do leite de vacas Holandesas**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA / USP), p. 47, 2021.

MARTINS, C. M. M. R.; FONSECA, D. C. M.; ALVEZ, B. G.; ARCARI, M. A. FERREIRA, G. C.; WELTER, K. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; RENNÓ, F. P.; SNANTOS, M. V. Effect of dietary crude protein degradability and corn processing on lactation performance and milk protein composition and stability. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 4165 – 4178, 2019.

MASTER, B. P. Z.; MACEDO, R. C. O. Effects of dietary supplementation in sport and exercise: a review of evidence on milk proteins and amino acids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 7, p. 1225 – 1239, 2021.

MILUCHOVÁ, M.; GÁBOR, M.; CANDRÁK, J. The Effect of the Genotypes of the CSN2 Gene on Test-Day Milk Yields in the Slovak Holstein Cow. **Agriculture**, v. 13, p. 1 – 17, 2023.

MOAZAMI-GOUDARZI, K.; BELEMSAGA, D. M. A.; CERIOTTI, G.; LALOE, D.; FAGBOHOUN, F.; KOUAGOU, N. T.; SIDIBE, I.; CODJIA, V.; CRIMELLA, C.; GROSCLAUDE, F.; TOURE, S. M. Characterisation de la race bovine Somba a l'aide de marqueurs molecolaires. **Revue D'élevage et de Médecine Vétérinaire Des Pays Tropicaux**, v. 54, p. 129 –138, 2021.

NASR, M. A.; EL-TARABANY, M. S. Impact of three THI levels on somatic cell count, milk yield and composition of multiparous Holstein cows in a subtropical region. **Journal of Thermal Biology**, v. 64, p. 73 – 77, 2017.

NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 22 – 26, 1986.

NG-KWAI-HANG, K. F.; KROEKER, E. M. Rapid Separation and Quantification of Major Caseins and Whey Proteins of Bovine Milk by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 3052 – 3056, 1983.

NGUYEN, H. T. H.; ONGA, L. B. C.; HOQUE, A. B.; KENTISHA, S. E.; WILLIAMSON, N.; ANG, C. S.; GRASA, L. S. A proteomic characterization shows differences in the milk fat globule membrane of buffalo and bovine milk. **Food Bioscience**, v. 19, p. 7 – 16, 2017.

NGUYEN, Q. V.; MALAU-ADULI, B. S.; CAVALIEIRI, J.; NICHOLS, P. D.; MALAU-ADULI, A. E. O. Fatty Acid Content of Dairy-Derived Foods for Human Consumption. **Nutrients**, v. 11, p. 1 – 23, 2019.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 8. rev. ed. Washington, DC.: **The National Academies of Sciences**, p.365, 2021.

ORTOLANI, E.L. Diagnóstico e tratamento de alterações ácido-básicas em ruminantes. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA., 2003, Porto Alegre. *Anais.* Porto Alegre, v.1, p.17 – 28. 2003.

PACHECO-PAPPENHEIM, S.; YENER, S.; HECK, J. M. L.; DIJKSTRA, J.; VAN VALENBERG, H. J. F. Seasonal variation in fatty acid and triacylglycerol composition of bovine milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 104, p. 8479 – 8492, 2021.

PATRICE MARTIN, P.; SZYMANOWSKA, M.; ZWIERZCHOWSKI, L.; LEROUX, C. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 433 – 459, 2002.

PAUCIULLO, A.; GIAMBRA, I. J.; IANNUZZI, L.; ERHARDT, G. The β -casein in camels: Molecular characterization of the CSN2 gene, promoter analysis and genetic variability. **Gene**, v. 547, p. 159 – 168, 2014.

PIRES, J.; LARSEN, T.; LEROUX, C. Milk metabolites and fatty acids as noninvasive biomarkers of metabolic status and energy balance in early-lactation cows. **Journal of Dairy Science**, 105, p. 201 – 220, 2022.

ROSELER, D. K.; FERGUSON, J. D.; SNIFFEN, C.J; HERREMA, J. Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk no protein nitrogen in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 525 – 534, 1993.

RUOTTINEN, O.; IKONEN, T.; OJALA, M. Associations between milk protein genotypes and fertility traits in Finnish Ayrshire heifers and first lactation cows. **Livestock Production Science**, v. 85, p. 27 – 34, 2004.

SEBASTIANI, C.; ARCANGELI, C.; CIULLO, M.; TORRICELLI, M.; CINTI, G.; FISICHELLA, S.; BIAGETTI, M. Frequencies Evaluation of β -Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central Italy. **Animals**, v. 10, p. 1 – 7, 2020.

TONG, P. S.; BERNER, L. A. Dairy Processing and Products. *In: Reference Module in Food Scienc*, 2016.

VITTE, K.; KERZIENE, S.; KLEMENTAVIČIŪTĖ, J.; VITTE, M.; MIŠEIKIENĖ, R.; KUDLINSKIENĖ, I.; ČEPAITĖ, J.; DILBIENE, V.; STANKEVIČIUS, R. Relationship of β -casein genotypes (A1A1, A1A2 and A2A2) to the physicochemical composition and sensory characteristics of cows' milk. **Journal of Applied Animal Research**, v. 50, p. 161- 166, 2022.

WINKELMAN, A. M.; WICKHAM, B. W. Associations between milk protein genetic variants and production traits in New Zealand dairy cattle. Milk protein polymorphism. *In: International Dairy Federation*, p. 38–46, 1997.

WITTWER, F., Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. *In: Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais*, 2000.

YANG, L.; YANG, Q.; YI, M.; PANG, Z.; XIONG, B. Effects of seasonal change and parity on raw milk composition and related indices in Chinese Holstein cows in northern China. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 6863 – 6869, 2013.

YOUSEF M. K. Basic Principles. *In: Stress physiology in livestock*, v. 1. p. 357 – 358, 1986.

CAPÍTULO 4. ESTUDO DAS FRAÇÕES PROTEICAS DO LEITE PROVENIENTE DE VACAS HOLANDESAS COM DIFERENTES GENÓTIPOS PARA O GENE DA β -CASEÍNA

Study of milk protein fractions from Holstein cows with different genotypes for the β -casein gene

RESUMO

Objetivou-se estudar o polimorfismo dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína sobre as frações de caseína e proteínas séricas, e correlacioná-las com as características fenotípicas observadas em vacas da raça Holandesa submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais. Foram utilizadas 18 vacas dos três genótipos (6 A1A1; 6 A1A2; 6 A2A2), onde as coletas de leite ocorreram durante a ordenha e submetidos a análise de proteômica por eletroforese bi-dimensional e a cromatografia líquida de alta performance acoplada ao espectrômetro de massas. Para o estudo das características fenotípicas, foram determinados metabólitos (energético, enzimáticos e nitrogenados) no leite, sangue e urina das mesmas vacas, que foram realizados por meio das concentrações de glicose, gama glutamil transferase, aspartato amino transferase, uréia e nitrogênio ureico no plasma, uréia e nitrogênio ureico no leite, nitrogênio urinário e nitrogênio ureico na urina. Também foram levantados dados de composição (teor de gordura, teor proteína, teor de lactose, teor de sólidos totais, teor de sólidos não gordurosos), contagem de células somáticas, média de produção de leite durante 30 dias e dias em lactação. As intensidades dos volumes de expressão normalizados obtidas para cada spot foram utilizadas como variáveis dependentes nas análises proteômicas. Neste caso, utilizou-se um modelo linear misto considerando os genótipos como efeito fixo e os efeitos aleatórios amostras dentro de cada tratamento e o resíduo. Para avaliação das proteínas diferencialmente abundantes significativas com as características fenotípicas avaliadas, foram utilizadas análises de correlações momento-produto de Person, por meio do procedimento CORR. Todas as análises foram realizadas no programa computacional *Statistical Analysis System*[®] versão 9.4. O presente estudo identificou frações de α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína, κ -caseína, α -la e β -lg, sendo as mesmas diferencialmente abundantes nos três genótipos. Nas frações de caseína, para α_{S1} -caseína houve maior abundância nos homocigotos, para α_{S2} -caseína foi maior no genótipo A2A2, para β -caseína a maior abundância ocorreu no genótipo heterocigoto, porém para κ -caseína a abundância oscilou entre os três genótipos, e para as frações de proteínas séricas, a α -la foi maior no genótipo A2A2 e β -lg variou entre os três genótipos. Ao relacionar as informações contidas no genoma das vacas com as informações do proteoma das amostras leite, observou-se associação moderada e forte entre as concentrações de glicose sanguínea, ureia e nitrogênio ureico no leite com abundância das frações α_{S1} -, β - e κ -caseína. Também foi observado uma associação moderada entre os teores de lactose e dias em lactação com a abundância da proteína sérica α -la. Concluí-se com esses resultados, que o polimorfismo no gene CSN2, possivelmente pode estar envolvido em variações qualitativas e quantitativas do perfil proteico do leite de vacas da raça Holandesa submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais.

Palavras-chaves: Abundância. Genoma. Proteoma. *Spots*.

ABSTRACT

The objective was to study the polymorphism of the A1 and A2 alleles for the β -casein gene on the fractions of casein and serum proteins, and to correlate them with the phenotypic characteristics observed in Holstein cows submitted to the same conditions nutritional and environmental. Eighteen cows of the three genotypes (6 A1A1; 6 A1A2; 6 A2A2) were used, where milk was collected during milking and submitted to proteomic analysis by two-dimensional electrophoresis and high-performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer. For the study of the phenotypic characteristics, metabolites (energy, enzymatic and nitrogenous) were determined in the milk, blood and urine of the same cows, which were carried out through the concentrations of glucose, gamma glutamyl transferase, aspartate amino transferase, urea and urea nitrogen in the plasma, urea and urea nitrogen in milk, urinary nitrogen and urea nitrogen in urine. Composition data (fat content, protein content, lactose content, total solids content, non-fat solids content), somatic cell count, average milk production during 30 days and days in lactation were also collected. The intensities of the normalized expression volumes obtained for each spot were used as dependent variables in the proteomic analyses. In this case, a mixed linear model was used considering the genotypes as a fixed effect and the random effects samples within each treatment and the residue. To evaluate the differentially abundant proteins significant with the phenotypic characteristics evaluated, Person's moment-product correlation analyzes were used, through the CORR procedure. All analyzes were performed using the Statistical Analysis System® version 9.4 computer program. The present study identified fractions of α_{S1} -casein, α_{S2} -casein, β -casein, κ -casein, α -la and β -lg, which were differentially abundant in the three genotypes. In the casein fractions, for α_{S1} -casein there was greater abundance in homozygotes, for α_{S2} -casein it was greater in the A2A2 genotype, for β -casein the greater abundance occurred in the heterozygous genotype, but for κ -casein the abundance oscillated between the three genotypes, and for serum protein fractions, α -la was higher in the A2A2 genotype and β -lg varied among the three genotypes. By relating the information contained in the genome of the cows with the information from the proteome of the milk samples, a moderate and strong association was observed between the concentrations of blood glucose, urea and urea nitrogen in milk with the abundance of the fractions α_{S1} -, β - and κ -casein. A moderate association was also observed between lactose contents and days in lactation with serum α -la protein abundance. It was concluded with these results that the polymorphism in the CSN2 gene may possibly be involved in qualitative and quantitative variations in the protein profile of milk from Holstein cows submitted to the same nutritional and environmental conditions.

Keywords: Abundance. Genome. Proteome. Spots.

4.1. INTRODUÇÃO

As proteínas do leite mais estudadas são α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína e κ -caseína que são codificadas pelos genes CSN1S1, CSN1S2, CSN2 e CSN3, respectivamente (CIOTOLA et al., 2009). Dentre as frações de caseína a α_{S1} -caseína é a mais abundante, cerca de 38% da fração de caseína do leite bovino, é codificada pelo gene CSN1S1, a α_{S2} -caseína, que constitui até 10% da fração de caseína do leite bovino, é codificada pelo gene CSN1S2, a β -caseína, que constitui até 36% da caseína do leite bovino, é codificada pelo gene CSN2 e a κ -caseína que constitui até 13% da caseína do leite bovino, é codificada pelo gene CSN3 (ELFERINK et al., 2022; KAMIŃSKI et al., 2007).

A fração α_{S1} -caseína contém 199 resíduos de aminoácidos além do peptídeo sinal é com 15 resíduos de aminoácidos, tornando a pré-forma com 214 aminoácidos de comprimento (FARRELL et al., 2004), possui peso molecular de 24,529 Da, ponto isoelétrico de 4,98 e 8 variantes genéticas. A fração α_{S2} -caseína contém 207 resíduos de aminoácidos além do peptídeo sinal com 15 resíduos de aminoácidos, tornando a pré-forma com 222 aminoácidos de comprimento (FARRELL et al., 2004), possui peso molecular de 26,019 Da, ponto isoelétrico de 8,55 e 4 variantes genéticas. A fração β -caseína contém 209 resíduos de aminoácidos além do peptídeo sinal com 15 resíduos de aminoácidos, tornando a pré-forma com 224 aminoácidos de comprimento (FARRELL et al., 2004), possui peso molecular de 25,107 Da, ponto isoelétrico de 5,26 e 13 variantes genéticas. A fração κ -caseína contém 169 resíduos de aminoácidos além do peptídeo sinal com 21 resíduos de aminoácidos, tornando a pré-forma com 190 aminoácidos de comprimento (FARRELL et al., 2004), codificada pelo gene CSN3, possuindo peso molecular de 21,269 Da, ponto isoelétrico de 6,29 e 11 variantes genéticas (NCBI, 2022).

A proteína sérica α -lactoalbumina (α -la) contém 123 resíduos de aminoácidos além do peptídeo sinal com 19 resíduos de aminoácidos, tornando a pré-forma com 142 aminoácidos de comprimento (FARRELL et al., 2004), codificada pelo gene α -LA, possuindo peso molecular de 14,156 Da, ponto isoelétrico de 4,80 e 3 variantes genéticas. A proteína sérica β -lactoglobulina (β -lg) contém 162 resíduos de aminoácidos além do peptídeo sinal com 16 resíduos de aminoácidos, tornando a pré-forma com 178 aminoácidos de comprimento (FARRELL et al., 2004), codificada pelo gene LGB, possuindo peso molecular de 19,883 Da, ponto isoelétrico de 4,93 e 10 variantes genéticas. A proteína sérica albumina sérica bovina que é formada por 607 aminoácidos e codificada pelo gene ALBU_BOVIN, possuindo peso molecular de 69,293 Da e ponto isoelétrico de 5,82. A proteína sérica lactotransferrina é

formada por 708 aminoácidos e codificada pelo gene LTF, possuindo 78,056 Da e ponto isoelétrico de 8,69 (NCBI, 2022).

A diferença entre a variante A1 e A2 da β -caseína é o resultado de um polimorfismo de nucleotídeo único no códon 67 do gene; sendo a histidina na A1 e a prolina em A2 (KAMIŃSKI et al., 2007; TRUSWELL, 2005). Enquanto a variante A2 apresenta uma ligação peptídica entre prolina e isoleucina (Pro-Ile), a variante A1 apresenta a ligação peptídica entre histidina e isoleucina (His-Ile). Essa diferença estrutural vem sendo foco de recentes pesquisas (ASLEDOTTIR et al., 2018; NGUYEN et al., 2018; BROOKE-TAYLOR et al., 2017), pois esta diferença conformacional na estrutura secundária da proteína expressa, pode exercer influência sobre as propriedades físico-químicas e microestruturais do leite (NGUYEN et al., 2018; McLACHLAN, 2001; ELLIOTT et al., 1999) e, também, porque as proteases intestinais atuam mais fortemente na ligação His-Ile, resultando no aparecimento da β -casomorfina-7 (BCM-7) (ASLEDOTTIR et al., 2018; DE NONI; CATTANEO, 2010; JINSMAA et al., 1999). A proporção κ -caseína no leite e suas variantes, A ou B, são importantes devido à sua influência no tempo de coagulação, no tempo de endurecimento da coalhada e na firmeza da coalhada (JÖUDU et al., 2008; SCHAAR et al., 1984).

Ng-Kwai-Hang et al. (1984), que ao verificarem a variação das concentrações de proteínas do leite associadas ao polimorfismo genético para o gene da β -caseína, identificaram efeito dos genótipos nas concentrações (mg/mL) das caseínas e proteínas séricas em que, as vacas portadoras do genótipo A1A1 apresentaram concentração de 16,083 para a fração α_{s1} -caseína; concentração de 8,595 para a fração β -caseína; concentração de 2,409 para a fração κ -caseína; concentração de 1,432 para a proteína sérica α -Ia; concentração de 4,499 para a proteína sérica β -Ig; concentração de 0,464 para a proteína sérica albumina sérica bovina e concentração de 0,484 para as imunoglobulinas. As vacas portadoras do genótipo A1A2 apresentaram concentração de 16,214 para a variante α_{s1} -caseína; concentração de 8,324 para a variante β -caseína; concentração de 2,440 para a variante κ -caseína; concentração de 1,450 para a variante α -Ia; concentração de 4,484 para a variante β -Ig; concentração de 0,450 para a albumina sérica bovina e concentração de 0,461 para imunoglobulinas. As vacas portadoras do genótipo A2A2 apresentaram concentração de 16,375 para a variante α_{s1} -caseína; concentração de 8,025 para a variante β -caseína; concentração de 2,440 para a variante κ -caseína; concentração de 1,463 para a variante α -Ia; concentração de 4,503 para a variante β -Ig; concentração de 0,452 para a albumina sérica bovina e concentração de 0,471 para imunoglobulinas.

Vários fatores influenciam o perfil proteico do leite bovino, como estação do ano, paridade, estágio de lactação e estado fisiológico das vacas e seu regime alimentar (BOBE et al., 1999), embora os fatores genéticos desempenhem o papel mais importante (NG- KWAI-HANG et al., 1987; HECK et al., 2009). Como é sabido, o leite obtido de diferentes raças é caracterizado por apresentar diferenças no conteúdo das principais frações proteicas (POULSEN et al., 2016). Dentro da mesma raça, diferentes vacas podem produzir leite com diferentes variantes genéticas das principais frações proteicas, e em diferentes raças as frequências dessas variantes genéticas não são as mesmas (CAROLI et al., 2009). Além disso, a concentração de uma determinada fração proteica no leite e suas variantes genéticas não são independentes entre si, pois diferentes variantes genéticas podem ter diferentes níveis de penetrância, causando diferentes concentrações dessa fração proteica no leite (HECK et al., 2009). De fato, o polimorfismo nos genes que codificam as principais frações proteicas do leite é responsável por mudanças qualitativas e quantitativas no perfil proteico do leite (AMALFITANO et al., 2020).

Sendo assim, objetivou-se estudar o polimorfismo dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína sobre as frações de caseína e proteínas séricas, por meio de eletroforese bi-dimensional (2-DE) e por cromatografia líquida de alta performance acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC/MS) e correlacioná-las com as características fenotípicas observadas em vacas da raça Holandesa submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais aplicados neste estudo obedeceram aos princípios éticos na experimentação animal bem como as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (CEUA/FZEA) e protocolada sob o CEUA nº 9431111019.

4.2.1. Seleção dos animais e descrição dos tratamentos

O experimento foi realizado no período de junho a julho de 2021 e conduzido na Fazenda Santa Rita, pertencente a Agropecuária Agrindus S.A., localizada no município de Descalvado, São Paulo, Brasil (21° 54'14 " de latitude sul e 47° 37'10 " de longitude oeste,

altitude 679 m). Foram utilizadas dezoito vacas da raça Holandesa, sendo seis vacas de cada genótipo (6 A1A1, 6 A1A2 e 6 A2A2), com aproximadamente 215 dias de lactação (DEL), peso corporal de 700 ± 100 kg, escore de condição corporal médio de $3,25 \pm 0,25$ e produção média de leite de 39 kg de leite/vaca/dia, submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais.

4.2.2. Coleta e Processamento das Amostras de leite para proteômica

Foram utilizadas amostras de leite proveniente de vacas da raça Holandesa (*Hosltein-Friesian*) portadora dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína, coletadas em duplicata com auxílio de copo coletor acoplado ao sistema de ordenha mecânica (DeLaval®) e armazenadas em tubos plásticos estéreis previamente identificados, acondicionados em caixa térmica contendo gelo seco e, transportadas até ao Laboratório de Estudos Avançados em Ciência da Carne (LEACC/ZMV), do Departamento de Medicina Veterinária na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP) *campus* USP Fernando Costa em Pirassununga/SP/Brasil para a realização da análise proteômica.

A proteômica das amostras de leite proveniente de vacas portadoras dos três genótipos (6 A1A1, 6 A1A2 e 6 A2A2) foi realizada em duplicata, totalizando 36 amostras (tabela 16) e ocorreu em duas etapas, a primeira etapa consistiu na separação e quantificação das frações proteicas dos leites que foi realizada por eletroforese bidimensional (2-DE), ou seja, um método de isolamento por ponto isoelétrico e por peso molecular; já na segunda etapa ocorreu a identificação das frações das proteínas dos leites por cromatografia líquida de alta performance acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC/MS), seguindo a metodologia proposta por Vincent et al. (2016), com modificações.

Tabela 16. Esquema demonstrativo das corridas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) das amostras de leite de vacas portadoras dos três genótipos para o gene da β -caseína.

| Corridas ¹ | Gel 1 ² | Gel 2 ³ |
|-----------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | A1A1 (1)' | A1A2 (1)' |
| 2 | A1A2 (2)' | A2A2 (1)' |
| 3 | A2A2 (2)' | A1A1 (2)' |
| 4 | A1A1 (3)' | A1A2 (3)' |
| 5 | A1A2 (4)' | A2A2 (3)' |

| | | |
|----|------------|------------|
| 6 | A2A2 (4)' | A1A1 (4)' |
| 7 | A1A1 (5)' | A1A2 (5)' |
| 8 | A1A2 (6)' | A2A2 (5)' |
| 9 | A2A2 (6)' | A1A1 (6)' |
| 10 | A1A1 (1)'' | A1A2 (1)'' |
| 11 | A1A2 (2)'' | A2A2 (1)'' |
| 12 | A2A2 (2)'' | A1A1 (2)'' |
| 13 | A1A1 (3)'' | A1A2 (3)'' |
| 14 | A1A2 (4)'' | A2A2 (3)'' |
| 15 | A2A2 (4)'' | A1A1 (4)'' |
| 16 | A1A1 (5)'' | A1A2 (5)'' |
| 17 | A1A2 (6)'' | A2A2 (5)'' |
| 18 | A2A2 (6)'' | A1A1 (6)'' |

¹Número de corridas realizadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%); ²Amostras de leite de vacas portadoras dos três genótipos para o gene da β -caseína analisadas no gel de poliacrilamida aplicadas no módulo interno dianteiro; ³Amostras de leite de vacas portadoras dos três genótipos para o gene da β -caseína analisadas no gel de poliacrilamida aplicadas no módulo interno traseiro

4.2.2.1. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO LEITE

Para preparo das amostras seguiu-se a metodologia proposta por Vincent et al. (2016) em que, fez-se a pesagem, em balança analítica de precisão (0,1 a 0,01 g), de aproximadamente 9 mL de amostra de leite cru em tubos plásticos previamente identificados. Em seguida realizou-se o processo de centrifugação em centrífuga convencional e refrigerada, das 6 amostras em duplicada dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) totalizando 36 amostras, em temperatura de 4°C, durante 30 minutos e rotação de 2.600 rpm. Transcorrido o tempo determinado, retirou-se as amostras da centrífuga e com o auxílio de uma alça descartável do tipo *loop*, realizou-se a etapa de desnate individual das amostras através da retirada manual da camada sobrenadante de gordura, originando assim o leite desnatado. Para homogeneização da fase sérica do leite, contendo as proteínas solúveis não caseínicas e o *pellet*, contendo as diferentes subunidades de caseína, utilizou-se agitador de tubos de bancada do tipo vórtex.

Para a determinação precisa da concentração de proteína total na amostra preparada para técnica de eletroforese bi-dimensional (2-DE) foi utilizado o *kit PlusOne 2-D Quant (GE Healthcare)*.

4.2.2.2. ELETROFORESE BI-DIMENSIONAL (2-DE)

Para a primeira dimensão, correspondente a focalização isoeétrica (IEF) foram utilizadas as tiras de IPG (*immobilized pH gradient*) de 13 cm (centímetros) de comprimento com faixa de pH de 4 – 7 (GE Healthcare). As tiras de gel foram reidratadas por aproximadamente 14 horas com uma alíquota de 500 µg de proteína extraída do leite, solubilizada no volume final de 250 µl de solução de reidratação *DeStreak* (GE Healthcare®), acrescida de 0,5% de tampão IPG pH 4 – 7 (GE Healthcare®), 1% de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich®) e 1% de solução de Dithiothreitol 2M (GE Healthcare®). A reidratação das tiras foi passiva e a temperatura ambiente dentro do *Strip Holder* (GE Healthcare®).

Após a reidratação, as tiras de gel foram transferidas do *Strip Holder* para dentro dos canais do equipamento *Ettan™ IPGphor™* previamente preenchido com *DryStrip Cover Fluid*. A focalização isoeétrica foi realizada no aparelho *Ettan™ IPGphor™* (GE Healthcare®) a temperatura de 20°C por aproximadamente 5:30 horas. O programa constituiu de corrente de 50 µA/tira e diferentes voltagens. O perfil utilizado de voltagem foi: 500 V (volts) por 500 Vh (volts por hora), gradiente 1.000 V por 800 Vh, gradiente 8.000 V por 11.300 Vh e a fase final de 8.000 V por 5.400 Vh. O produto total de tempo x voltagem foi de 18.003 Vh. Transcorrido o tempo determinado, com o auxílio de uma pinça cirúrgica, transferiu-se cuidadosamente as tiras do equipamento *Ettan™ IPGphor™* para tubos de ensaio com tampa, os quais foram armazenados no *freezer* convencional até a realização das demais análises.

As tiras focalizadas foram equilibradas por 15 min (minutos) sob leve agitação em tampão de equilíbrio I (6 M Urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol, 1% DTT) e, subsequentemente, 15 min em tampão de equilíbrio II, o qual era o mesmo tampão do equilíbrio I, porém o DTT foi substituído por 5% Iodoacetamida.

Após o equilíbrio, as tiras de IPG e o marcador de peso molecular *Kaleidoscope* (Bio-Rad®), aplicado em pequenos retângulos de papel de filtro para *blotting*, foram sobrepostos ao gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%). Ambos foram fixados sobre o gel com uma solução selante de agarose (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS, 0,5% agarose e 0,002% azul de bromofenol).

O tampão de corrida utilizado foi de Laemmli (1970) 1x concentrado (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS). As proteínas foram separadas na segunda dimensão utilizando a cuba eletroforética SE 600 Ruby (Amersham Biosciences) a 15 mA/gel, 100V por 30 min. e

posteriormente, 50 mA/gel, 600V por aproximadamente 3 horas ou até o corante sair do gel. A corrida foi mantida a 10°C com um banho maria termostático circulador (MultiTemp3, GE Healthcare®).

4.2.2.3. VISUALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Ao final da corrida, os géis foram corados com o procedimento de coloração por *Coomassie Blue*, o qual consiste primeiramente em uma etapa de fixação das proteínas no gel utilizando uma solução de 40% metanol e 10% ácido acético por 30 min sob agitação. Posteriormente a etapa de coloração com solução corante contendo 0,1% de azul de Coomassie G-250, 40% metanol e 10% ácido acético por 1 hora sob agitação. Finalmente a etapa de descoloração em que o gel foi colocado em uma solução descorante contendo 40% metanol e 10% ácido acético sob agitação por 1 hora.

Para visualização dos *spots*, o excesso do corante foi retirado por meio de sucessivas lavagens com água destilada. Os géis foram escaneado no *Image Scanner III* (GE Healthcare®) e as imagens armazenadas em formato mel para posterior análise.

4.2.2.4. ANÁLISE DAS IMAGENS

A detecção dos *spots* e quantificação foram realizadas no software *ImageMaster™ 2D Platinum* versão 7.0 (GE Healthcare®). Seis amostras de leite de vacas portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína foram analisadas em duplicata totalizando 36 géis dos quais foram configurados para a detecção dos parâmetros de *smooth* = 4, *saliência* = 200 e *área mínima* = 31 expressos em número de *pixels*. A quantidade de proteína de cada *spot* foi expressa como volume, isto é, a soma da intensidade de *pixel* dentro do limite do *spot*.

Para avaliar as diferenças na quantidade de cada *spot* foi utilizado o volume relativo (% volume), o qual é um valor normalizado que permanece relativamente independente de variações.

Após a detecção dos *spots* foram realizadas automaticamente análises de comparação (análise de “*Match*”), isto é, avaliar se o *spot* presente em um gel é correspondente em outro gel. Primeiramente, foram sobrepostas e comparadas imagens pertencentes à mesma amostra, e subsequentemente, as imagens de amostras diferentes. Logo em seguida, toda a análise de comparação foi conferida manualmente.

4.2.2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As intensidades dos volumes de expressão normalizados (IVEN) obtidas para cada *spot* foram utilizadas como variáveis dependentes nas análises proteômicas. Neste caso, utilizou-se um modelo linear misto considerando os genótipos (A1A1, A1A2 ou A2A2) como efeito fixo e os efeitos aleatórios amostras dentro de cada tratamento e o resíduo. Em caso de resultado significativo, o Teste de Tukey-Kramer foi utilizado como procedimento de comparação múltipla. Adicionalmente, foi realizada análise de componentes principais, considerando todas as intensidades dos volumes de expressão normalizados (IVEN) associado aos diferentes peptídeos presentes nas amostras, visando identificar o padrão de abundância associado a cada genótipo avaliado. Todas as análises acima descritas foram realizadas com auxílio do procedimento PROC MIXED e do PROC PRINQUAL do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), versão 9.4.

4.2.2.6. DIGESTÃO DOS SPOTS “IN GEL”

Os *spots* diferencialmente abundantes nas análises estatísticas foram recortados do gel, picotados em fragmentos pequenos e colocados dentro de microtubos de 1,5 mL livre de DNase, RNase, pirogênios, minerais e metais pesados da Axygen® previamente identificados, armazenamento em caixas de polipropileno e mantidas sob temperatura de refrigeração e, transporte até o Laboratório Multiusuário de Proteômica, Metabolômica e Lipidômica do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/ USP) *Campus* USP Piracicaba, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

A digestão em gel foi realizada de acordo com Shevchenko et al. (2006), com algumas modificações (CELEDON et al., 2007). Os *spots* foram descoloridos por meio de sucessivas lavagens de 10 minutos/cada em solução de 50% (v/v) acetonitrila em 25mM de bicarbonato de amônio pH 8,0 (Ambic), até completa remoção do Coomassie. Os *spots* foram completamente desidratados em 100% (v/v) ACN e reidratados com 20mM DTT. Depois de 40 min a 60°C, o sobrenadante foi descartado e substituído por 55 mM IAA. Os tubos foram então mantidos no escuro, por 30 min. Os fragmentos dos *spots* de gel foram novamente desidratados com 100% de ACN e submetidos à secagem, em capela para completa remoção do solvente.

A digestão em gel foi realizada pela adição de 15uL da solução de tripsina da Promega (10ng/uL) em 25mM Ambic. Os tubos foram mantidos por 16h a 37°C. Em seguida, a reação de digestão foi bloqueada pela adição de 40uL de 5% v/v ácido fórmico (AF) em 50% v/v ACN. Os peptídios resultantes da digestão foram eluídos dos fragmentos de gel com auxílio da adição de 40uL de 1% v/v ácido fórmico (AF) em 60% v/v methanol, seguido da adição de 40uL de 1% v/v (FA) in 50% v/v ACN e uma lavagem final com 100% ACN. Todos os sobrenadantes das etapas de eluição, foram combinados em um único tubo eppendorf, transferidos para *vials* de vidro e submetidos a secagem com auxílio do *SpeedVac*. Os peptídios foram ressuspensos em 10uL de H₂O grau MS contendo 1% v/v TFA, dessalinizados com auxílio de *reversed-phase* Zip-Tip C18, secos em *Speed Vac* e ressuspensos em 10uL de H₂O grau MS contendo 1% v/v AF para análise de HPLC-MS.

4.2.2.7. ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

As análises de espectrometria de massas foram realizadas com o auxílio do sistema cromatográfico *nanoElute nanoflow*, da Bruker Daltonics, Bremen, Germany, acoplado online, a um espectrômetro de massas *hybrid trapped ion mobility spectrometry-quadrupole time-of-flight mass spectrometer-timsTof Pro*, da Bruker Daltonics. Uma alíquota (1µL) de amostra, equivalente a 200ng de peptídeos digeridos, foi injetada em uma coluna Aurora 2 C18 trap column (1.6µm, 250mm x 75µm), da *ionOpticks*, Austrália. Um gradiente típico RP (Solvente A: 0.1% AF, 99.9% H₂O MilliQ; Solvente B: 0.1% AF, 99.9% CH₃CN) foi estabelecido em um sistema de nanofluxo de cromatografia líquida e separado a uma taxa de fluxo de 250nL.min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida a 50°C. A corrida cromatográfica foi de 60 min (2% a 13% do Solvente B durante 30 min; elevada a 20% aos 45 min; elevada a 30% aos 50 min; elevada a 85% aos 55 min e finalmente 85% por 5 min para lavagem da coluna).

A coluna foi acoplada, online, a um TIMS-TOF-Pro com uma fonte de íons *CaptiveSpray*, ambos da Bruker Daltonics GmbH. A temperatura da linha de transferência capilar de íons foi ajustada para 180°C. O acúmulo de íons, por 123ms e a separação por mobilidade foram obtidos com uma rampa de potencial de entrada de -160V a -20V dentro dos 123s.

Durante a aquisição, para habilitar o método PASEF, i.e., o acúmulo paralelamente à fragmentação dos íons, as informações de precursor de m/z e mobilidade foram primeiro

derivadas de um experimento de *full scan* TIMS-MS, com uma faixa de m/z de 100-1700. Precusores monocarregados foram excluídos por sua posição no plano m/z -ion de mobilidade, e os precusores que atingiram o valor alvo de 20.000 a.u. foram dinamicamente excluídos por 0,4 min.

O modo operacional do TIMS-ToF, MS e PASEF foram controlados e sincronizados com o auxílio do *software OtofControl* 5.1 de controle instrumental da Bruker Daltonics (MACRON et al., 2020).

4.2.2.8. PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO E BUSCA EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS (MAXQUANT)

O processamento dos dados, a identificação de proteínas e as análises de quantificação relativa foram realizadas utilizando-se as condições de “*default*” do *Software MaxQuant* (versão 1.6.17.0).

Os parâmetros de processamento incluíram: carbamidometilação da cisteína como modificação fixa de aminoácidos. Já a oxidação da metionina e acetilação da região N-terminal, foram consideradas como variações variáveis. A tripsina foi utilizada como enzima proteolítica, com o máximo de 3 possíveis erros de clivagem. Uma máxima taxa de falso positivos (FDR) de 1% foi utilizada para identificação de peptídeos e proteínas, considerando-se como critério, ao menos um peptídeo único para identificação de proteínas. Todas as proteínas foram identificadas com um grau de confiança $\geq 95\%$, utilizando-se o algoritmo do *MaxQuant Software* e busca dentro da base de dados de proteínas de *Bos taurus* disponível no UniProtKB/Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>).

4.2.3. Características fenotípicas

Os dados de composição do leite (% gordura, % proteína, % lactose, % sólidos totais, % sólidos não gordurosos) e contagem de células somáticas (CCS em \log céls./ mL^{-1}) das 18 vacas da raça Holandesa portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína foram extraídos do laudo dos resultados das análises realizadas mensalmente na propriedade pela Clínica do Leite, Piracicaba/SP/Brasil, utilizando o aparelho de infravermelho (composição) e citometria de fluxo (CCS).

As informações de produção, que correspondeu a média de produção de leite diária durante 30 dias e dias em lactação (DEL), das 18 vacas da raça Holandesa portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína foram extraídas do DeLaval

DelPro™, plataforma que realiza mensalmente o relatório de controle leiteiro em todas as vacas em lactação do rebanho.

4.2.4. Análise estatística

Para avaliação das proteínas diferencialmente abundantes (DAP) significativas com as características fenotípicas avaliadas, foram utilizadas análises de correlações momento-produto de Pearson, por meio do procedimento CORR do programa *Statistical Analysis System*®, versão 9.4 (SAS, 2018). Na correlação linear de Pearson, o coeficiente de correlação de Pearson, normalmente representado por ρ assume apenas valores entre -1 e 1 em que, para $\rho = 1$ significa uma correlação perfeita e positiva entre as duas variáveis, ou seja, são diretamente proporcionais; para $\rho = -1$ significa uma correlação perfeita e negativa entre as duas variáveis, ou seja, são inversamente proporcionais; $\rho = 0$ significa que as duas variáveis não dependem linearmente. Para o presente estudo, o coeficiente de correlação de Pearson (ρ) foi interpretado como para $0,00 < \rho < 0,19$ a correlação entre as variáveis foi considerada como bem fraca, para $0,20 < \rho < 0,39$ a correlação entre as variáveis foi considerada como fraca, para a $0,40 < \rho < 0,69$ a correlação entre as variáveis foi considerada como moderada, para $0,70 < \rho < 0,89$ a correlação entre as variáveis foi considerada como forte e para $0,90 < \rho < 1,00$ a correlação entre as variáveis foi considerada como muito forte (SHIMAKURA et al., 2006).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Proteômica

4.3.1.1. ELETROFORESE BI-DIMENSIONAL

Os géis 2-DE das amostras de leite dos três genótipos (6 A1A1, 6 A1A2 e 6 A2A2) para o gene da β -caseína foram gerados em duplicata, conforme observado na tabela 16. Foram preparados e analisados 36 géis. Em média, 1.507 *spots* foram detectados com coloração de azul de coomassie nos géis.

Todos os *spots* detectados foram usados nas análises de comparação, entretanto somente *spots* incomuns presentes em no mínimo 30 géis e em no máximo 36 géis por grupo foram considerados nas análises estatísticas.

Da combinação de todos os *spots* presentes nos géis foram obtidos um total de 40 *matches* que ao serem analisados observou-se que geraram 10 *spots* com diferença estatisticamente significativa entre si ao nível de significância de 5% ($p_{\text{valor}} = 0,05$) ou 10% ($p_{\text{valor}} = 0,1$). Os resultados da estatística descritiva das caseínas (α_{S1-} , α_{S2-} , β - e κ -caseína) e proteínas séricas do leite (α -la e β -lg) diferencialmente abundantes estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17. Número de observações (N), média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MIN) e valores máximos (MAX) para os *spots* diferentes estatisticamente.

| <i>SPOTS</i> | N | MED | DP | CV | MIN | MAX |
|--------------|----|-------|------|--------|------|-------|
| 1 | 36 | 14,21 | 4,93 | 34,67 | 6,76 | 26,86 |
| 2 | 36 | 0,56 | 0,24 | 41,79 | 0,14 | 1,03 |
| 3 | 36 | 6,31 | 3,61 | 57,20 | 1,93 | 13,86 |
| 4 | 36 | 0,65 | 0,25 | 39,20 | 0,18 | 1,08 |
| 5 | 30 | 1,31 | 1,56 | 119,32 | 0,06 | 5,86 |
| 6 | 30 | 0,68 | 0,30 | 43,41 | 0,21 | 1,41 |
| 7 | 36 | 0,55 | 0,24 | 44,20 | 0,12 | 1,14 |
| 8 | 36 | 0,52 | 0,24 | 45,83 | 0,09 | 1,13 |
| 9 | 36 | 4,14 | 1,85 | 44,69 | 1,16 | 7,41 |
| 10 | 36 | 1,06 | 0,63 | 59,93 | 0,13 | 2,88 |

Avaliação dos *spots* em relação aos genótipos

As análises de variância das intensidades do volume dos *spots* nas amostras de leite dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína revelaram 10 *spots* com intensidades de volume diferenciada significativamente ao nível de significância de $\alpha = 5\%$ (*) ou $\alpha = 10\%$ (***), sendo seis *spots* diferencialmente abundantes a 5% e quatro *spots* diferencialmente abundantes a 10%.

Tais resultados são relevantes, uma vez que demonstram uma diferença da expressão de algumas proteínas do leite de vacas portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína e que algumas proteínas se expressam de maneira independente para cada genótipo ou pela interação dos mesmos.

As figuras 4, 5 e 6 apresentam géis de eletroforese bi-dimensional do perfil proteico do leite de vacas da raça Holandesa portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína realizado com 500 μ g de proteína, indicando os *spots* que tiveram intensidade de volume diferenciada significativamente entre os três genótipos. As proteínas foram separadas em um faixa de peso molecular (Mr) de 250 a 10 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 4,0 a 7,0 para cada genótipo do gene da β -caseína, da conforme observado nas figuras 4, 5 e 6.

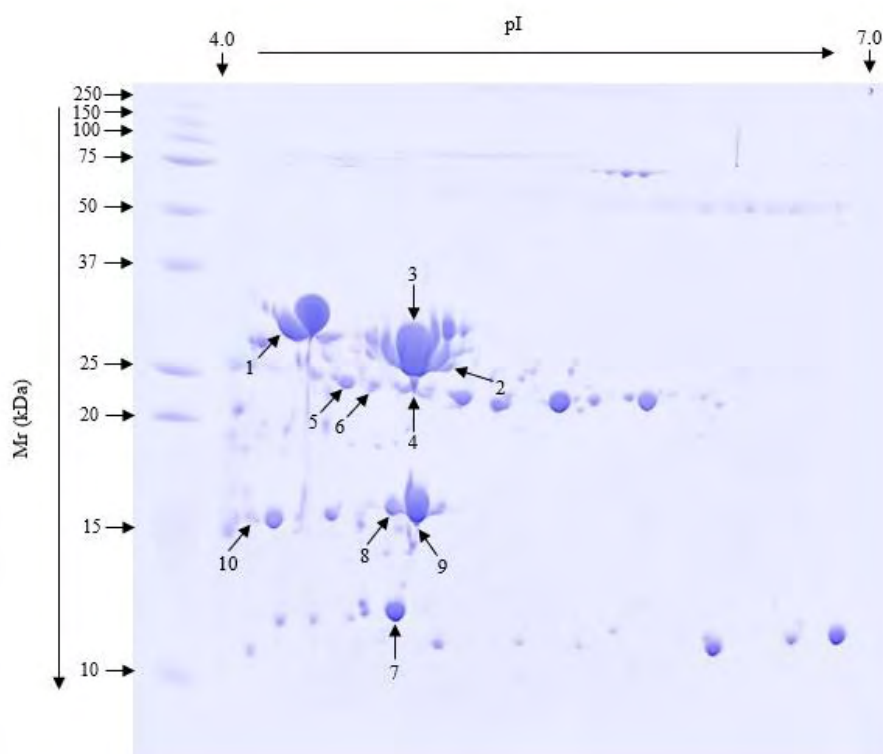


Figura 4. Gel referência de eletroforese bi-dimensional de amostra leite de vaca portadoras do genótipo A1A1 para a o gene da β -caseína.

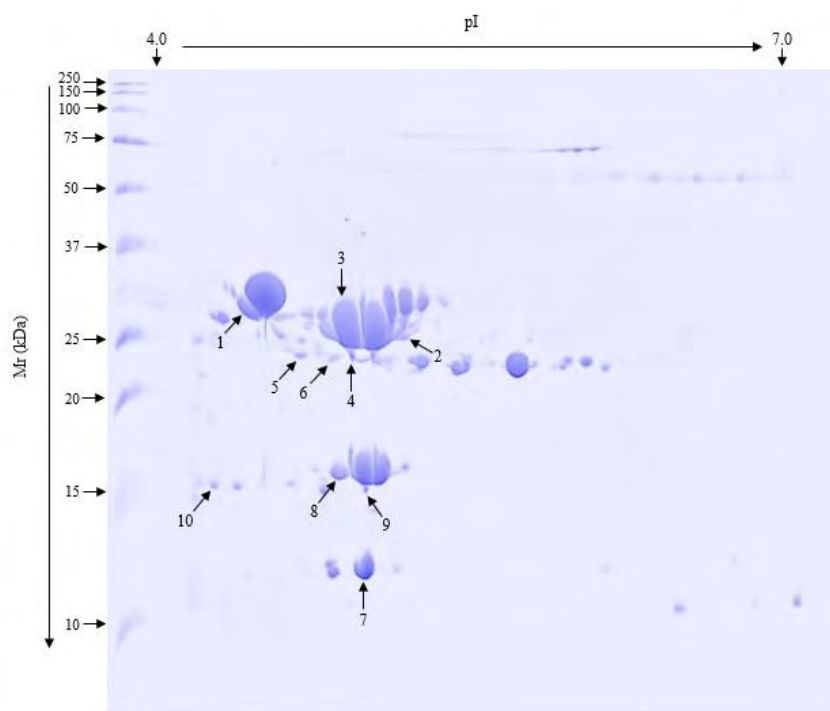


Figura 5. Gel referência de eletroforese bi-dimensional de amostra leite de vaca portadoras do genótipo A1A2 para a o gene da β -caseína.

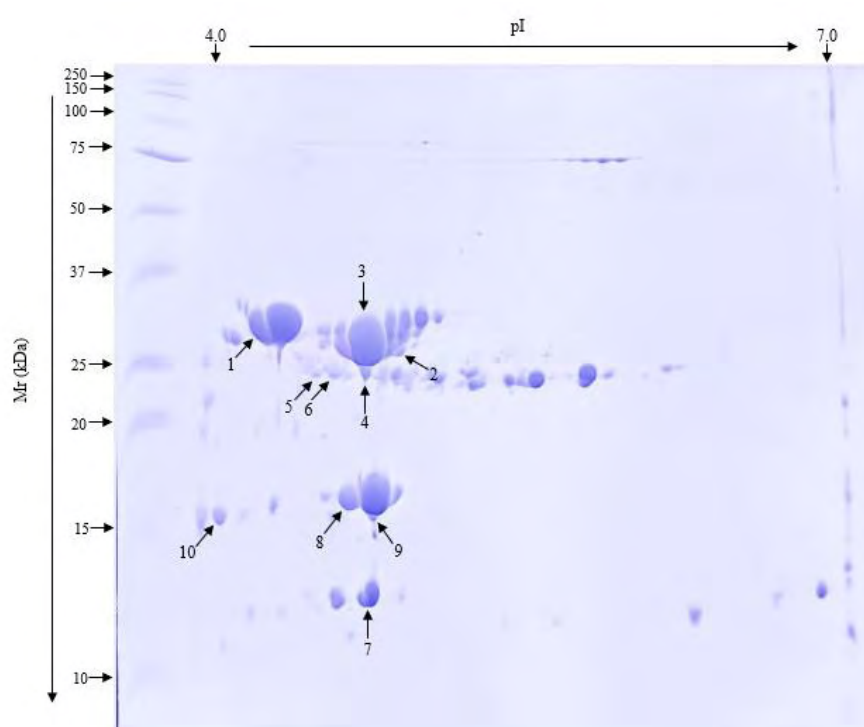


Figura 6. Gel referência de eletroforese bi-dimensional de amostra leite de vaca portadoras do genótipo A2A2 para a o gene da β -caseína.

A 2-DE foi realizada usando tiras de IPG com 13 cm de comprimento e com faixa de pH de 4 – 7 na primeira dimensão e SDS-PAGE (15%) na segunda dimensão. A quantidade de proteína aplicada foi de 250 µg e o gel foi corado usando procedimento de *Coomassie colloidal*. A calibração de pI (ponto isoelétrico) e Mr (peso molecular) realizou-se por meio do software *Image Master 2D platinum*.

Para o SNP presente no gene CSN2 identificado por BTA6.88331153, é composto de 9 exons e 8 introns (GenBank: M55158.1), sendo que o polimorfismo se concentra principalmente no cromossomo 6, códon 67, no éxon 7, na posição 88331153 sob número de identificação no banco de dados de SNP rs43703011 (NILSEN et al., 2009), nas amostras de leite provenientes de vacas portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β-caseína observou-se que o *spot_1* apresentou as maiores intensidades de volume para os genótipos A1A1 (a) e A2A2 (a) e a menor intensidade de volume para o genótipo A1A2 (b), conforme apresentado na figura 7.

O *spot_2* apresentou a maior intensidade de volume para o genótipo A2A2 (a), a menor intensidade de volume para o genótipo A1A1 (b) e intensidade de volume iguais aos genótipos A1A1 e A2A2 para o genótipo A1A2 (ab), conforme apresentado na figura 7.

O *spot_3* apresentou a maior intensidade de volume para o genótipo A1A2 (a) e as menores intensidades de volume para os genótipos A1A1 (b) e A2A2 (b), conforme apresentado na figura 7.

O *spot_4* apresentou as maiores intensidades de volume para os genótipos A1A2 (a) e A2A2 (a) e a menor intensidade de volume para o genótipo A1A1 (b), conforme apresentado na figura 7.

O *spot_5* apresentou a maior intensidade de volume para o genótipo A1A1 (a) e as menores intensidade de volume para os genótipos A1A2 (b) e A2A2 (b), conforme apresentado na figura 7.

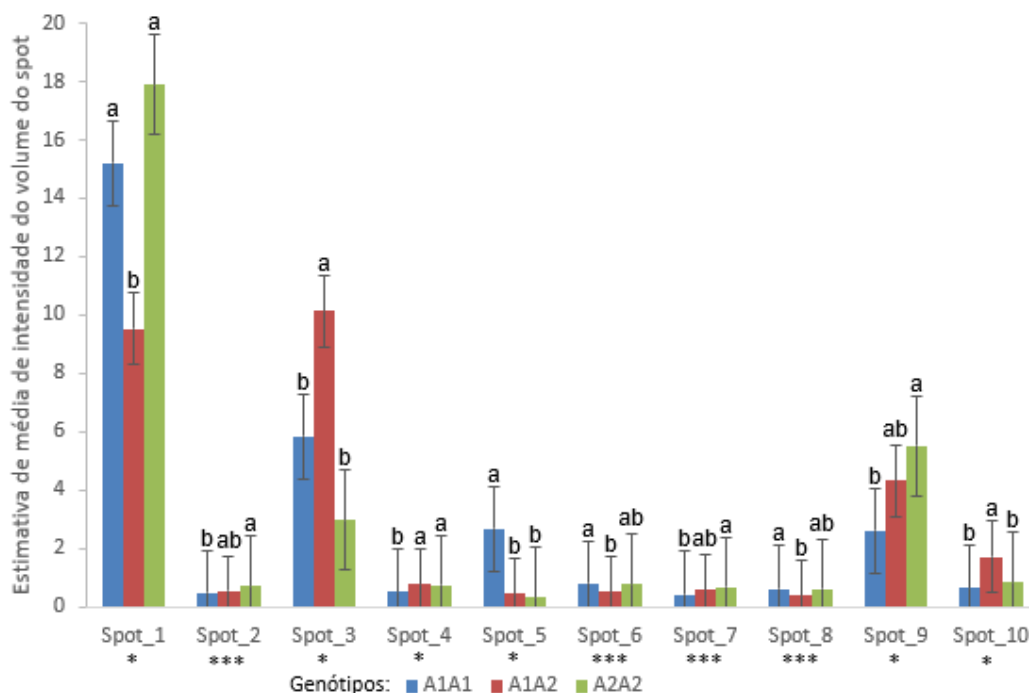
O *spot_6* apresentou a maior intensidade de volume para o genótipo A1A1 (a), a menor intensidade de volume para o genótipo A1A2 (b) e intensidade de volume iguais aos genótipos A1A1 e A1A2 para o genótipo A2A2 (ab), conforme apresentado na figura 7.

O *spot_7* apresentou a maior intensidade de volume para o genótipo A2A2 (a), a menor intensidade de volume para o genótipo A1A1 (b) e intensidade de volume iguais aos genótipos A1A1 e A2A2 para o genótipo A1A2 (ab), conforme apresentado na figura 7.

O *spot_8* apresentou a maior intensidade de volume para o genótipo A1A1 (a), a menor intensidade de volume para o genótipo A1A2 (b) e intensidade de volume iguais os genótipos A1A1 e A1A2 para o genótipo A2A2 (ab), conforme apresentado na figura 7.

O *spot_9* apresentou a maior intensidade de volume para o genótipo A2A2 (a), a menor intensidade de volume para o genótipo A1A1 (b) e intensidade de volume iguais aos genótipos A1A1 e A2A2 para o genótipo A1A2 (ab), conforme apresentado na figura 7.

O *spot_10* apresentou a maior intensidade de volume para o genótipo A1A2 (a) e as menores intensidades de volume para os genótipos A1A1 (b) e A2A2 (b), conforme apresentado na figura 7.



*: $p_valor < 0,05$; ***: $p_valor < 0,10$. Médias seguidas por letras diferentes, diferem significativamente entre si, de acordo com o Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Figura 7. Estimativas de médias da intensidade do volume de cada *spot* significativo na análise de variância nos três genótipos (A1A1, A1A2, A2A2) para o gene da β -caseína.

4.3.1.2. ANÁLISE DE HPLC/MS

Os *spots* estatisticamente significativos foram recortados do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) e digeridos com tripsina, enzima que rompe as ligações peptídicas do lado carboxila da lisina ou arginina. Os peptídeos resultantes foram eluídos e analisados por HPLC/MS. De acordo com as análises 10 *spots* tiveram sua intensidade de volume diferenciada significativamente nos três genótipos (A1A1, A1A2, A2A2) para o gene da β -caseína.

Foram identificados com sucesso 10 *spots* correspondentes a 6 proteínas distintas. As proteínas identificadas estão listadas na tabela 18 e exibidas no gel referência apresentado nas figuras 5. Para selecionar a vasta quantidade de proteínas identificadas no HPLC/MS foi utilizado como critério de filtro o peso molecular teórico, ponto isoelétrico teórico, número de peptídeos únicos, sequência de cobertura (%) e *score*. Todos os *scores* das proteínas identificadas foram altos indicando alta confiabilidade dos resultados.

Tabela 18. Proteínas diferencialmente abundantes no leite de vacas da raça Holandesa dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína identificadas por HPLC/MS.

| Nº <i>Spot</i> | Nome da proteína | Nº acesso Swiss-Prot | Mr ¹ teórico / experimental | pI ² teórico / experimental | PU ³ | SC (%) ⁴ | Score ⁵ | Tipo |
|----------------|------------------------|----------------------|--|--|-----------------|---------------------|--------------------|------|
| 1 | α_{S1} -caseína | P02662 | 24,5/29,3 | 4,98/4,31 | 9 | 41,1 | 133 | CN |
| 2 | α_{S2} -caseína | P02663 | 26,0/26,2 | 8,55/5,07 | 11 | 41 | 96 | |
| 3 | β -caseína | P02666 | 25,1/27,4 | 5,26/4,88 | 10 | 30,4 | 323 | |
| 4 | κ -caseína | P02668 | 21,2/24,3 | 6,29/4,89 | 10 | 54,4 | 218 | |
| 5 | κ -caseína | P02668 | 21,2/23,8 | 6,29/4,71 | 11 | 65,7 | 289 | |
| 6 | κ -caseína | P02668 | 21,2/23,8 | 6,29/4,59 | 5 | 35,8 | 221 | |
| 7 | α -Ia | P00711 | 16,2/12,0 | 4,92/4,87 | 5 | 33,3 | 96 | PS |
| 8 | β -Ig | P02754 | 19,8/16,0 | 4,93/4,77 | 19 | 96,3 | 323 | |
| 9 | β -Ig | P02754 | 19,8/15,3 | 4,93/4,88 | 10 | 51,2 | 227 | |
| 10 | β -Ig | P02754 | 19,8/14,7 | 4,93/4,08 | 6 | 33,3 | 62 | |

¹Corresponde ao peso molecular teórico e experimental em Da; ²Corresponde ao ponto isoelétrico teórico e experimental; ³Corresponde ao número de fragmentos de aminoácidos exclusivos de determinada proteína; ⁴Corresponde ao número de leituras do sequenciamento; ⁵Corresponde a esperança de determinada proteína; PS proteína sérica; CN caseína.

As proteínas identificadas foram avaliadas quanto a sua funcionalidade no banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot. O maior número de proteínas (seis) encontradas está relacionado às caseínas (α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína e κ -caseína) e quatro proteínas relacionadas às proteínas séricas (α -Ia e β -Ig).

Os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (Mr) dos *spots* no experimento, na maioria dos casos, variaram pouco em relação aos valores teóricos das proteínas determinados com a ferramenta EXPASY. Variações entre os valores teóricos e experimental de pI e Mr pode ser atribuída a desvios de calibração dos parâmetros na 2-DE no programa de análise de imagens e adicionalmente, a modificações pós-traducionais que possam ocorrer, como por exemplo, glicosilação, fosforilação e clivagem proteolítica.

Foi observado que a fração α_{S1} -caseína apresentou no *spot_1*, abundância diferenciada para vacas da raça Holandesa portadora dos genótipos A1A1 (15,21a \pm 1,17) e A2A2 (17,90a

$\pm 1,17$) para o gene da β -caseína com diferença estatística significativa ($p_valor = 0,0005$) ao nível de significância de $0,05 \alpha = 5\%$.

Foi observado que a fração α_{S2} -caseína apresentou no *spot_2*, abundância diferenciada para vacas da raça Holandesa portadora do genótipo A2A2 ($0,71a \pm 0,07$) para o gene da β -caseína com diferença estatística significativa ($p_valor = 0,0533$) ao nível de significância de $0,1 \alpha = 10\%$.

Foi observado que a fração β -caseína apresentou no *spot_3*, abundância diferenciada para vacas da raça Holandesa portadora do genótipo A1A2 ($10,14a \pm 0,86$) para o gene da β -caseína com diferença estatística significativa ($p_valor = 0,0001$) ao nível de significância de $0,05 \alpha = 5\%$.

Foi observado que a fração κ -caseína apresentou no *spot_4* abundância diferenciada para vacas da raça Holandesa portadora dos genótipos A1A2 ($0,75a \pm 0,07$) e A2A2 ($0,71a \pm 0,07$) para o gene da β -caseína com diferença estatística significativa ($p_valor = 0,0421$) ao nível de significância de $0,05 (\alpha = 5\%)$; no *spot_5* abundância diferenciada para vacas da raça do genótipo A1A1 ($2,66a \pm 0,40$) com diferença estatística significativa ($p_valor = 0,0033$) ao nível de significância de $0,05 (\alpha = 5\%)$ e; no *spot_6* abundância diferenciada para vacas da do genótipo A1A1 ($0,80a \pm 0,09$) com diferença estatística significativa ($p_valor = 0,0955$) ao nível de significância de $0,1 \alpha = 10\%$.

Foi observado que a proteína sérica α -Ia apresentou no *spot_7*, abundância diferenciada para vacas da raça Holandesa portadoras do genótipo A2A2 ($0,66a \pm 0,07$) para o gene da β -caseína com diferença estatística significativa ($p_valor = 0,0617$) ao nível de significância de $0,1 (\alpha = 10\%)$. Já a proteína sérica β -Ig apresentou no *spot_8*, abundância diferenciada para vacas da raça Holandesa portadora do genótipo A1A1 ($0,61a \pm 0,08$) para o gene da β -caseína com diferença estatística significativa ($p_valor = 0,0843$) ao nível de significância de $0,01 (\alpha = 10\%)$; no *spot_9* abundância diferenciada para vacas do genótipo A2A2 ($5,51a \pm 0,54$) com diferença estatística significativa ($p_valor = 0,0062$) ao nível de significância de $0,05 (\alpha = 5\%)$ e; no *spot_10* abundância diferenciada para vacas do genótipo A1A2 ($1,71a \pm 0,15$) com diferença estatística significativa ($p_valor = 0,0002$) ao nível de significância de $0,05 \alpha = 5\%$.

Relação dos *spots* estatisticamente significativos com as características fenotípicas

Uma vez que foram encontrados que os genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína que influenciaram na intensidade de volume diferenciada significativamente dos *spots* e que, os genótipos estão associados a algumas características fenotípicas, foram avaliados quais *spots* poderiam explicar melhor as características fenotípicas.

Para tanto, todos os *spots* estatisticamente significativos nas análises de variância foram submetidos às análises de correlações momento-produto de Pearson e avaliados em relação às variáveis dependentes anteriormente descritas como as concentrações dos metabólitos energético (glicose, mg/dL), enzimáticos (GGT, U/L e AST, U/L) e nitrogenados (uréia no plasma (UP), mg/dL, nitrogênio ureico no plasma (NUP), mg/dL, uréia no leite (UL); mg/dL; nitrogênio ureico no leite (NUL), mg/dL, nitrogênio urinário (NU), mg/dL e nitrogênio ureico na urina (NUU), mg/dL); da composição do leite em teor de gordura (%), teor proteína (%), teor de lactose (%), teor de sólidos totais (%), teor de sólidos não gordurosos (%) e contagem de células somáticas (log céls / mL⁻¹); e média de produção de leite (PL) observada durante 30 dias (litros/vaca/dia) e dias em lactação (DEL).

As estatísticas descritivas para a relação dos *spots* estatisticamente significativos com as características fenotípicas de concentrações dos metabólitos energético (glicose, mg/dL), enzimáticos (GGT, U/L e AST, U/L) e nitrogenados (uréia no plasma (UP), mg/dL, nitrogênio ureico no plasma (NUP), mg/dL, uréia no leite (UL); mg/dL; nitrogênio ureico no leite (NUL), mg/dL, nitrogênio urinário (NU), mg/dL e nitrogênio ureico na urina (NUU), mg/dL)) estão apresentadas na tabela 19.

Tabela 19. Número de observações (N), Média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (MIN) e máximo (MAX) para as concentrações metabólicas.

| Variável | N | MED | DP | CV | MIN | MAX |
|-------------------|----|---------|--------|-------|--------|---------|
| GLIC ¹ | 36 | 60,59 | 6,42 | 10,60 | 51,07 | 71,54 |
| GGT ² | 36 | 43,70 | 8,25 | 18,87 | 28,52 | 58,64 |
| AST ³ | 36 | 54,61 | 6,52 | 11,93 | 39,96 | 62,79 |
| UP ⁴ | 36 | 37,48 | 6,51 | 17,37 | 20,10 | 46,66 |
| NUP ⁵ | 36 | 17,51 | 3,04 | 17,36 | 9,39 | 21,80 |
| UL ⁶ | 36 | 38,98 | 8,47 | 21,72 | 18,67 | 51,78 |
| NUL ⁷ | 36 | 18,22 | 3,96 | 21,72 | 8,72 | 24,20 |
| NU ⁸ | 36 | 1001,63 | 297,45 | 29,70 | 455,30 | 1588,83 |
| NUU ⁹ | 36 | 467,98 | 139,12 | 29,73 | 211,57 | 742,44 |

¹Glicose (mg/dL): concentração de glicose no sangue em mg/dL; ²GGT(U/L): concentração da enzima gama glutamil transferase no sangue em U/L; ³AST (U/L): concentração da enzima aspartato aminotransferase no sangue em U/L; ⁴Ureia plasmática (mg/dL): concentração de ureia no plasma sanguíneo em mg/dL; ⁵NUP (mg/dL): concentração de nitrogênio ureico no plasma sanguíneo em mg/dL; ⁶Ureia leite (mg/dL): concentração de ureia no leite em mg/dL; ⁷NUL (mg/dL): concentração de nitrogênio ureico no leite em mg/dL; ⁸Nitrogênio urinário (mg/dL): concentração de nitrogênio urinário em mg/dL; ⁹NUU (mg/dL): concentração de nitrogênio ureico na urina em mg/dL.

As estatísticas descritivas para a relação dos *spots* estatisticamente significativos com as características fenotípicas da composição do leite em teor de gordura (%), teor proteína (%), teor de lactose (%), teor de sólidos totais (%), teor de sólidos não gordurosos (%) e contagem de células somáticas (log céls / mL⁻¹) estão apresentadas na tabela 20.

Tabela 20. Número de observações (N), Média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MIN) e máximo (MAX) para a produção, composição e CCS do leite.

| Variável | N | MED | DP | CV | MIN | MAX |
|-------------------|----|-------|------|-------|-------|-------|
| GORD ¹ | 36 | 3,68 | 0,83 | 22,55 | 2,50 | 6,07 |
| PROT ² | 36 | 3,11 | 0,26 | 8,52 | 2,75 | 3,58 |
| LACT ³ | 36 | 4,72 | 0,19 | 4,07 | 4,42 | 5,04 |
| ST ⁴ | 36 | 12,44 | 0,97 | 7,82 | 11,24 | 15,03 |
| SNG ⁵ | 36 | 8,76 | 0,30 | 3,44 | 8,33 | 9,38 |
| CCS ⁶ | 36 | 1,63 | 0,32 | 19,56 | 1,04 | 2,43 |

¹Teor de gordura em porcentagem (%); ²Teor de proteína em porcentagem (%); ³Teor de lactose em porcentagem (%); ⁴Teor de sólidos em porcentagem (%); ⁵Teor de sólidos não gordurosos em porcentagem (%); ⁶Contagem de células somáticas por mL de leite

As estatísticas descritivas para a relação dos *spots* estatisticamente significativos com as características fenotípicas da média de produção de leite (PL) observada durante 30 dias (litros/vaca/dia) e dias em lactação (DEL) estão apresentadas na tabela 21.

Tabela 21. Número de observações (N), Média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (MIN) e máximo (MAX) para a produção, composição e CCS do leite.

| Variável | N | MED | DP | CV | MIN | MAX |
|------------------|----|--------|-------|-------|--------|--------|
| PL ¹ | 36 | 36,53 | 9,48 | 25,96 | 13,51 | 54,47 |
| DEL ² | 36 | 216,61 | 94,98 | 43,85 | 110,00 | 394,00 |

¹Média de produção de leite observada durante 30 dias, ²Dias em lactação

Na tabela 22 estão apresentados o coeficiente de correlação (ρ) e a respectiva probabilidade (p_valor) de cada coeficiente de correlação obtidos nas análises das amostras

coletada de leite vacas da raça Holandesa portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína respectivamente para as variáveis concentrações dos metabólitos energético (glicose, mg/dL), enzimáticos (GGT, U/L e AST, U/L) e nitrogenados (uréia no plasma (UP), mg/dL, nitrogênio ureico no plasma (NUP), mg/dL, uréia no leite (UL); mg/dL; nitrogênio ureico no leite (NUL), mg/dL, nitrogênio urinário (NU), mg/dL e nitrogênio ureico na urina (NUU), mg/dL)).

Tabela 22. Coeficientes de correlação entre os metabólicos energéticos, enzimáticos e nitrogenados dentro de cada proteínas diferencialmente abundantes observada entre os *spots* estatisticamente significativos.

| Variáveis | FRAÇÕES DE CASEÍNAS | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------------|---------|-------------------------------|------------------|--------------------------------|---------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|---------------|
| | Spot_1 (α_{S1} -caseína) | | Spot_2 (α_{S2} -caseína) | | Spot_3 (β -caseína) | | Spot_4 (κ -caseína) | | Spot_5 (κ -caseína) | | Spot_6 (κ -caseína) | |
| | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor |
| GLIC ¹ | 0,509 | 0,0015 | 0,270 | 0,1119 | -0,659 | <.0001 | 0,123 | 0,474 | -0,224 | 0,2347 | 0,246 | 0,191 |
| GGT ² | 0,017 | 0,9232 | -0,189 | 0,2695 | -0,026 | 0,8818 | 0,047 | 0,7859 | 0,324 | 0,0811 | 0,203 | 0,2826 |
| AST ³ | -0,061 | 0,7253 | 0,018 | 0,9153 | 0,007 | 0,9685 | -0,034 | 0,8437 | 0,100 | 0,5973 | -0,034 | 0,8574 |
| UP ⁴ | -0,128 | 0,4566 | -0,198 | 0,2466 | 0,197 | 0,2491 | -0,176 | 0,3034 | -0,149 | 0,4333 | -0,140 | 0,4593 |
| NUP ⁵ | -0,128 | 0,4579 | -0,198 | 0,2468 | 0,197 | 0,2502 | -0,176 | 0,3034 | -0,148 | 0,4336 | -0,140 | 0,4605 |
| UL ⁶ | -0,039 | 0,8195 | -0,053 | 0,7597 | 0,102 | 0,5545 | 0,158 | 0,3575 | -0,740 | <.0001 | -0,417 | 0,0217 |
| NUL ⁷ | -0,039 | 0,8198 | -0,053 | 0,7599 | 0,102 | 0,5549 | 0,158 | 0,357 | -0,740 | <.0001 | -0,418 | 0,0216 |
| NU ⁸ | 0,138 | 0,423 | -0,111 | 0,5199 | -0,106 | 0,5386 | -0,072 | 0,6784 | -0,277 | 0,1389 | 0,038 | 0,8432 |
| NUU | 0,138 | 0,422 | -0,111 | 0,5209 | -0,106 | 0,5368 | -0,072 | 0,6785 | -0,277 | 0,1387 | 0,038 | 0,8427 |

| Variáveis | PROTEÍNAS SÉRICAS | | | | | | | |
|-------------------|---------------------------|---------|--------------------------|---------|--------------------------|---------------|---------------------------|---------|
| | Spot_7 (α -la) | | Spot_8 (β -lg) | | Spot_9 (β -lg) | | Spot_10 (β -lg) | |
| | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor |
| GLIC ¹ | 0,120 | 0,486 | 0,295 | 0,0805 | 0,375 | 0,0242 | -0,318 | 0,0584 |
| GGT ² | -0,024 | 0,888 | -0,147 | 0,3933 | -0,033 | 0,8484 | -0,165 | 0,3348 |
| AST ³ | -0,140 | 0,4142 | -0,201 | 0,2409 | 0,329 | 0,0498 | 0,132 | 0,4422 |
| UP ⁴ | -0,149 | 0,3843 | -0,084 | 0,6281 | -0,072 | 0,6764 | 0,302 | 0,0733 |
| NUP ⁵ | -0,149 | 0,3845 | -0,083 | 0,6294 | -0,072 | 0,676 | 0,302 | 0,0736 |
| UL ⁶ | -0,020 | 0,9097 | 0,137 | 0,424 | 0,138 | 0,4235 | 0,273 | 0,1072 |
| NUL ⁷ | -0,020 | 0,9094 | 0,138 | 0,4236 | 0,138 | 0,4227 | 0,273 | 0,1074 |
| NU ⁸ | 0,005 | 0,977 | -0,046 | 0,7913 | 0,051 | 0,7687 | -0,179 | 0,296 |
| NUU | 0,005 | 0,9763 | -0,046 | 0,7918 | 0,051 | 0,7671 | -0,178 | 0,2982 |

¹Glicose (mg/dL): concentração de glicose no sangue em mg/dL; ²GGT(U/L): concentração da enzima gama glutamil transferase no sangue em U/L; ³AST (U/L): concentração da enzima aspartato aminotransferase no sangue em U/L; ⁴Ureia plasma (mg/dL): concentração de ureia no plasma sanguíneo em mg/dL; ⁵NUP (mg/dL): concentração de nitrogênio ureico no plasma sanguíneo em mg/dL; ⁶UL (mg/dL): concentração de ureia no leite em mg/dL; ⁷NUL (mg/dL): concentração de nitrogênio ureico no leite em mg/dL; ⁸NU (mg/dL): concentração de nitrogênio urinário em mg/dL; ⁹NUU (mg/dL): concentração de nitrogênio ureico na urina em mg/dL.

A concentração de glicose sanguínea (mg/dL) apresentou uma correlação moderada e positiva ($\rho = 0,509$) com a fração α_{S1} -caseína (*spot_1*) (A1A1a, A1A2b, A2A2a); correlação moderada e negativa ($\rho = -0,659$) com a fração β -caseína (*spot_2*) (A1A1b, A1A2a, A2A2b) e correlação fraca e positiva ($\rho = 0,375$) com a proteína sérica β -lg (*spot_9*) (A1A1b, A1A2ab, A2A2a). A concentração de glicose sanguínea (mg/dL) também apresentou diferença estatística significativa, ($p_{\text{valor}} = 0,0002$) com as maiores médias ($67,68a \pm 1,31$) para o genótipo A2A2.

A concentração de ureia no leite (mg/dL) apresentou correlação forte e negativa ($\rho = -0,740$) com a fração κ -caseína (*spot_5*) (A1A1a, A1A2b, A2A2b) e correlação moderada e negativa ($\rho = -0,417$) com a fração κ -caseína (*spot_6*) (A1A1a, A1A2b, A2A2ab). A concentração de ureia no leite (mg/dL) também apresentou, sem diferença estatística significativa, ($p_{\text{valor}} = 0,1058$) numericamente as maiores médias ($44,84 \pm 1,74$) para o genótipo A1A2.

A concentração de nitrogênio ureico no leite (mg/dL) apresentou correlação forte e negativa ($\rho = -0,740$) com a fração κ -caseína (*spot_5*) (A1A1a, A1A2b, A2A2b) e correlação moderada e negativa ($\rho = -0,418$) com a fração κ -caseína (*spot_6*) (A1A1a, A1A2b, A2A2ab). A concentração de nitrogênio ureico no leite (mg/dL) também apresentou, sem diferença estatística significativa, ($p_{\text{valor}} = 0,1059$) numericamente as maiores médias ($20,96 \pm 0,81$) para o genótipo A1A2.

Para as demais variáveis, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p_{\text{valor}} > 0,05$), ao nível de significância de 5%.

Na tabela 23 estão apresentados o coeficiente de correlação (ρ) e a respectiva probabilidade (p_{valor}) de cada coeficiente de correlação obtidos nas análises das amostras coletada de leite vacas da raça Holandesa portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína respectivamente para as variáveis composição do leite em teor de gordura (%), teor proteína (%), teor de lactose (%), teor de sólidos totais (%), teor de sólidos não gordurosos (%) e contagem de células somáticas (CCS) ($\log \text{ céls. / mL}^{-1}$).

Tabela 23. Coeficientes de correlação entre composição e contagem de células somáticas do leite observada entre os *spots* estatisticamente significativos.

| Variáveis | FRAÇÕES DE CASEÍNAS | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------------|---------|-------------------------------|---------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|
| | Spot_1 (α_{S1} -caseína) | | Spot_2 (α_{S2} -caseína) | | Spot_3 (β -caseína) | | Spot_4 (κ -caseína) | | Spot_5 (κ -caseína) | | Spot_6 (κ -caseína) | |
| | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor |
| GORD ¹ | -0,221 | 0,1944 | 0,013 | 0,9422 | 0,137 | 0,4263 | 0,113 | 0,5132 | -0,232 | 0,2169 | -0,131 | 0,4895 |
| PROT ² | -0,168 | 0,3281 | -0,273 | 0,1074 | 0,136 | 0,4298 | 0,261 | 0,1246 | -0,203 | 0,2831 | -0,137 | 0,4708 |
| LACT ³ | -0,077 | 0,6551 | 0,250 | 0,1412 | 0,156 | 0,3628 | 0,088 | 0,6118 | -0,387 | 0,0349 | -0,284 | 0,1277 |
| ST ⁴ | -0,256 | 0,1314 | -0,024 | 0,8907 | 0,200 | 0,2412 | 0,166 | 0,3346 | -0,312 | 0,0935 | -0,212 | 0,26 |
| SNG ⁵ | -0,216 | 0,2052 | -0,111 | 0,5192 | 0,269 | 0,1121 | 0,224 | 0,19 | -0,381 | 0,0377 | -0,328 | 0,0769 |
| CCS ⁶ | -0,065 | 0,7075 | 0,004 | 0,9826 | -0,136 | 0,4294 | 0,229 | 0,1793 | 0,065 | 0,7322 | 0,395 | 0,0309 |
| Variáveis | PROTEÍNAS SÉRICAS | | | | | | | | | | | |
| | Spot_7 (α -lg) | | Spot_8 (β -lg) | | Spot_9 (β -lg) | | Spot_10 (β -lg) | | | | | |
| | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | | | | |
| GORD ¹ | 0,187 | 0,276 | -0,055 | 0,749 | -0,031 | 0,8598 | 0,323 | 0,0545 | | | | |
| PROT ² | -0,169 | 0,3233 | 0,009 | 0,9587 | -0,070 | 0,6859 | 0,123 | 0,4746 | | | | |
| LACT ³ | 0,536 | 0,0008 | -0,238 | 0,1617 | 0,284 | 0,0931 | 0,122 | 0,4794 | | | | |
| ST ⁴ | 0,202 | 0,2376 | -0,110 | 0,5213 | 0,006 | 0,9739 | 0,335 | 0,0459 | | | | |
| SNG ⁵ | 0,137 | 0,4248 | -0,204 | 0,2329 | 0,102 | 0,5532 | 0,189 | 0,2693 | | | | |
| CCS ⁶ | -0,046 | 0,791 | 0,109 | 0,5273 | -0,087 | 0,6155 | -0,014 | 0,9335 | | | | |

¹Teor de gordura em porcentagem (%); ²Teor de proteína em porcentagem (%); ³Teor de lactose em porcentagem (%); ⁴Teor de sólidos em porcentagem (%); ⁵Teor de sólidos não gordurosos em porcentagem (%); ⁶Contagem de células somáticas por mL de leite.

Para variável composição e CCS do leite ($\log \text{cél}/\text{mL}^{-1}$) observou-se que as alterações nas expressões das proteínas apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) para o teor de lactose (%), teor de sólidos totais (%), teor de sólidos não gordurosos (%) e contagem de células somáticas (CCS) do leite ($\log \text{cél}/\text{mL}^{-1}$).

O teor de lactose (%) apresentou correlação fraca e negativa ($\rho = -0,387$) com a fração κ -caseína (*spot_5*) (A1A1a, A1A2b, A2A2b) e correlação moderada e positiva ($\rho = 0,536$) com a proteína sérica α -la (*spot_7*) (A1A1b, A1A2ab, A2A2a). O teor de lactose (%) também apresentou, sem diferença estatística significativa, ($p_{\text{valor}} = 0,1864$) numericamente as maiores médias ($4,79 \pm 0,06$) para o genótipo A2A2.

O teor de sólidos totais (%) apresentou correlação fraca e positiva ($\rho = 0,3348$) com a proteína sérica β -lg (*spot_10*) (A1A1b, A1A2a, A2A2b). O teor de sólidos totais (%) também apresentou, sem diferença estatística significativa, ($p_{\text{valor}} = 0,671$) numericamente as menores médias ($13,02 \pm 0,45$) para o genótipo A1A2.

O teor de sólidos não gordurosos (%) apresentou correlação fraca e negativa ($\rho = -0,381$) com a fração κ -caseína (*spot_5*) (A1A1a, A1A2b, A2A2b). O teor de sólidos não gordurosos (%) também apresentou, sem diferença estatística significativa, ($p_{\text{valor}} = 0,0749$) numericamente as maiores médias ($8,98 \pm 0,13$) para o genótipo A1A2.

A contagem de células somáticas do leite (CCS) ($\log \text{cél}/\text{mL}^{-1}$) apresentou correlação fraca e positiva ($\rho = 0,395$) com a fração κ -caseína (*spot_6*) (A1A1a, A1A2b, A2A2ab). A CCS ($\log \text{cél}/\text{mL}^{-1}$) também apresentou, sem diferença estatística significativa, ($p_{\text{valor}} = 0,9647$) numericamente as menores médias ($1,60 \pm 0,19$) para o genótipo A1A2.

Para as demais variáveis, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p_{\text{valor}} > 0,05$), ao nível de significância de 5%.

Na tabela 24 estão apresentados o coeficiente de correlação (ρ) e a respectiva probabilidade (p_{valor}) de cada coeficiente de correlação obtidos nas análises das amostras coletada de leite vacas da raça Holandesa portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína respectivamente para as variáveis de média de produção de leite observada durante 30 dias (litros/vaca/dia) e dias em lactação.

Tabela 24. Coeficientes de correlação entre média de produção de leite observada durante 30 dias e dias em lactação observada entre os *spots* estatisticamente significativos.

| FRAÇÕES DE CASEÍNAS | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|--|---------------|--|---------|--------------------------------------|---------|---------------------------------------|---------|---------------------------------------|---------|---------------------------------------|---------|
| Variáveis | <i>Spot_1</i> (α_{S1} -caseína) | | <i>Spot_2</i> (α_{S2} -caseína) | | <i>Spot_3</i> (β -caseína) | | <i>Spot_4</i> (κ -caseína) | | <i>Spot_5</i> (κ -caseína) | | <i>Spot_6</i> (κ -caseína) | |
| | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor |
| PL ¹ | -0,105 | 0,5404 | 0,134 | 0,4347 | 0,215 | 0,207 | -0,002 | 0,9931 | 0,205 | 0,2766 | 0,246 | 0,191 |
| DEL ² | -0,063 | 0,7161 | -0,102 | 0,5522 | 0,041 | 0,8134 | -0,052 | 0,7626 | 0,154 | 0,4164 | -0,013 | 0,9467 |
| PROTEÍNAS SÉRICAS | | | | | | | | | | | | |
| Variáveis | <i>Spot_7</i> (α -la) | | <i>Spot_8</i> (β -lg) | | <i>Spot_9</i> (β -lg) | | <i>Spot_10</i> (β -lg) | | | | | |
| | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | ρ | p_valor | | | | |
| PL ¹ | -0,062 | 0,72 | -0,251 | 0,1402 | -0,152 | 0,3752 | 0,161 | 0,3472 | | | | |
| DEL ² | -0,423 | 0,0102 | -0,045 | 0,7927 | -0,045 | 0,7933 | 0,051 | 0,7661 | | | | |

¹Média de produção de leite observada nos durante 30 dias (litros/vaca/dia); ²Dias em lactação (DEL dias).

Para variável da média de produção de leite observada nos últimos 30 dias (litros/vaca/dia) e dias em lactação observou-se que as alterações nas expressões das proteínas apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) apenas para dias em lactação.

Os dias em lactação (DEL) apresentaram correlação moderada e negativa ($\rho = -0,423$) com a proteína sérica α -la (*spot_7*) (A1A1b, A1A2ab, A2A2a). O DEL também apresentou, sem diferença estatística significativa, ($p_valor = 0,8395$) numericamente as maiores médias ($227,00 \pm 35,78$) para o genótipo A1A2.

4.4. DISCUSSÃO

4.4.1. Avaliação dos *spots* em relação aos genótipos

Diferentemente do presente estudo, Wang et al. (2021), tiveram dificuldade para detectar as frações de caseínas (α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína e κ -caseína) e de proteínas séricas (α -la e β -lg) no leite bovino através da técnica de eletroforese bi-dimensional (2-DE) e Corthals et al. (2000) explicaram que essa dificuldade de detecção acontece devido à grande faixa de concentração de proteínas nas células, o que dificulta a detecção das proteínas de baixa abundância sem alguma forma de enriquecimento antes da separação de proteínas ou peptídeos, sendo ainda mais agravantes em fluidos extracelulares, em que a faixa de concentração de proteínas séricas no soro pode chegar a 1.012. Várias estratégias para a remoção de proteínas altamente abundantes, como a albumina no soro, foram desenvolvidas (CHEN et al., 2005; AHMAD et al., 2009). As frações de caseína sofrem de limitações semelhantes às proteínas séricas devido à alta abundância das frações α_{S1} -caseína e β -caseína, que constituem aproximadamente 60% da proteína (HOLLAND et al., 2005).

Holland et al. (2004), realizando análise de 2-DE do leite bovino, observaram três manchas grandes identificadas como α_{S1} -caseína e β -caseína; presença uma cadeia de pelo menos três pontos como α_{S2} -caseína, que provavelmente diferiam em seu nível de fosforilação; a κ -caseína apresentou um quadro ainda mais complexo com pelo menos 10 formas presentes com valores de pI variando de 5,81 a 4,47. As principais proteínas do soro, β -lg e α -la, também foram observadas. No presente estudo foram observadas duas manchas grandes identificadas como α_{S1} -caseína e β -caseína; presença de uma cadeia de um único ponto como α_{S2} -caseína; a κ -caseína também apresentou um grau de complexidade maior, com pelo menos 3 formas de prototípicos presentes com valores de pI menos variados (4,89 a 4,59) aos citados na literatura. As proteínas séricas também foram observadas sendo um único

ponto como α -la; porém a β -lg também teve um grau de complexidade, com pelo menos 3 foram de prototípicos presentes com valores de pI menos variados (4,88 a 4,08) aos citados na literatura. Sendo assim, percebe-se que para análises por 2-DE em amostras leite integral, sem etapas prévias de acidificação ou neutralização, foi possível detectar a presença de múltiplas formas proteicas com alta e baixa abundância.

Resultado semelhante ao observado no presente estudo, em que os *spot_3*, que teve por proteína abundantemente expressa a β -caseína e o *spot_1* que teve por proteína abundantemente expressa a α_{S1} -caseína, apresentaram discrepâncias na maior intensidade de volume em relação principalmente aos *spot_4*, *spot_5*, *spot_6* que tiveram por proteína abundantemente expressa a κ -caseína, foi encontrado por Amalfitano et al. (2020), que ao considerarem o efeito do gene CSN2, verificaram que a maior proporção da fração κ -caseína quase desapareceu e não foi mais significativa enquanto a proporção da fração α_{S1} -caseína aumentou e tornou-se significativa e isso significa que, no que diz respeito à última fração de caseína, a maioria das diferenças entre os perfis qualitativos de proteína das raças leiteiras são apenas parcialmente explicadas por diferenças nas frequências das principais variantes genéticas e dependem, em vez disso, principalmente nos poligenes das raças.

Bisutti et al. (2022), investigando as variantes alélicas do gene β -caseína encontraram que as vacas portadoras dos genótipos A1A1 e A1A2 apresentaram abundância diferenciada para a fração β -caseína enquanto vacas portadoras do genótipo A2A2 apresentaram abundância diferenciada para as frações α_{S1} -caseína e para as proteínas séricas α -la e β -lg. Alguns resultados verificados no presente estudo, corroboram com os descritos por Bisutti et al. (2022) em que verificaram maiores abundâncias para β -caseína no genótipo heterozigoto, e α_{S1} -caseína e α -la no genótipo A2A2, porém para β -lg os resultados são divergentes. Diante destes resultados, onde para o leite A2A2 foram observadas maiores abundâncias de proteínas séricas do que β -caseína, os autores não recomendam o uso deste leite para produção de queijos.

Corroborando com os dados verificados por Bisutti et al. (2022) e no presente estudo, Graml e Pirchner (2003), explicam que o comportamento do genótipo A1A2 e chamado de efeito de dominância, e conhecido na pecuária e no melhoramento genético e já sendo relatado anteriormente em associação com variantes de β -caseína.

Estudos conduzidos por Heck et al. (2009), demonstraram que a variante A1 da β -caseína foi associada às maiores concentrações relativas das frações α_{S1} -caseína e κ -caseína e às menores concentrações relativas de α_{S2} -caseína e β -caseína em comparação com a variante

A2 e observaram também que os animais heterozigotos A1A2 tinham menos α -la, β -lg e α_{S1} -caseína e maiores concentrações de β -caseína do que o leite dos animais homozigotos. Para o genótipo A1A1 os resultados verificados no presente estudo são semelhantes aos de Heck et al. (2009), porém para os demais genótipos isso não ocorreu, e os autores sugeriram que as vacas com genótipo A2A2 são boas candidatas para produção de leite.

4.4.2. Relação dos *spots* estatisticamente significativos com as características fenotípicas

Para variável concentração dos metabólitos energéticos, enzimáticos e nitrogenados observou-se que as alterações nas expressões das proteínas apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) para a concentração de glicose sanguínea (mg/dL) concentração de ureia no leite (mg/dL) e concentração de nitrogênio uréico no leite (mg/dL).

A correlação moderada e positiva observada entre concentração de glicose sanguínea, mg/dL e a expressão da fração α_{S1} -caseína (*spot_1*) (A1A1a, A1A2b, A2A2a) como indicativo de serem diretamente proporcionais pode ser relacionada ao metabolismo e expressão de proteínas envolvidas na ativação das vias de sinalização em células epiteliais da glândula mamária de bovinos conforme visto por Sun et al. (2022), ao afirmarem que a glicose afeta a síntese de proteína do leite de vacas leiteiras onde o aumento da disponibilidade glicose desencadeou abundância da fração α_{S1} -caseína e esse efeito ocorreu pelo aumento da captação de glicose, conteúdo de ATP e alterações nos mecanismos de fosforilação de proteínas-chaves envolvidas nas vias de sinalização da AMPK e mTOR, que são duas proteínas que exercem papéis antagônicos na regulação do metabolismo energético pois sabe-se que a glândula mamária em lactação pode consumir até 85% da glicose circulante, assim a disponibilidade de glicose para a glândula mamária pode ser um potencial regulador da produção de leite. Os produtos metabólicos da glicose, como ATP e NAPDH, são fatores importantes na síntese do leite de vacas leiteiras (ANNISON et al., 1964). Sendo assim, os genótipos A1A1 e A2A2 apresentaram as maiores concentrações de glicose sanguínea mg/dL e maior abundância da fração α_{S1} -caseína provavelmente devido ao efeito dos genótipos homozigotos.

A correlação moderada e negativa observada entre concentração de glicose sanguínea, mg/dL e a expressão da fração β -caseína (*spot_3*) como indicativo de serem inversamente proporcionais pode ser associada dispersão coloidal das frações de caseína no interior da micela pois de acordo com o observado por Huppertz (2013), a fração α_{S1} -caseína possuir

níveis variados de fosforilação (10-13 resíduos fosfoseril por molécula) e sendo a fração β -caseína mais hidrofóbica das caseínas, sendo fortemente anfifílica (FARRELL et al., 2011; SWAISGOOD, 2003), o que explica sua tendência a formar agregados micelares em solução (LECLERC et al., 1997). Sendo assim, havendo maior abundância da fração α_{S1} -caseína no leite, a fração β -caseína que tem a sua síntese reduzida para manter o equilíbrio no interior e não desestabilizar a micela de caseína.

As correções fortes e negativas observadas entre concentração de ureia no leite, mg/dL (UL) e concentração de nitrogênio ureico no leite, mg/dL (NUL) e a expressão da fração κ -caseína (*spot_5* e *spot_6*) como indicativo de serem inversamente proporcionais que pode ser explicada em termos quantitativos, quanto maiores forem as concentrações de ureia e de nitrogênio ureico do leite, menor é a abundância da fração de κ -caseína no leite pois, assim como a κ -caseína que possui filamentos hidrofílico e altamente hidratados, responsáveis pela estabilidade estérica das micelas de caseína (VARNAM et al., 1995), a ureia e o nitrogênio ureico também podem estar relacionados com a estabilidade da micela de caseína. A ureia por ser convertida em cianeto, que reage com a proteína e, contrariamente ao cálcio livre, aumenta as cargas negativas das micelas e a força de repulsão entre elas, e, conseqüentemente, a estabilidade do leite e, o nitrogênio ureico por inibir a formação de ácidos e atuar sobre os grupos tiol das proteínas, contribuindo para dificultar a coagulação do leite ao etanol e/ou durante o aquecimento térmico (SWEETSUR et al., 1981). Resultados semelhantes ao presente estudo foram obtidos por Amalfitano et al. (2020), ao observarem que as maiores proporções da fração κ -caseína foram compensadas por proporções menores de NUL. Inferindo assim que a estabilidade da micela de caseína também está relacionada com a concentração dos metabólitos nitrogenados no leite.

A correlação moderada e positiva observada entre o teor de lactose (%) e a expressão da proteína sérica α -la como indicativo de serem diretamente proporcionais pode ser explicada devido a α -la ser precursora da biossíntese de lactose no tecido mamário e possui a capacidade de se ligar a certos minerais, como cálcio e zinco, o que pode afetar positivamente sua absorção (LÖNNERDAL, 2003). Resultados semelhantes ao presente estudo foram percebidos por Thompson et al. (2009), ao encontrarem correlação positiva entre as concentrações de lactose e proteína sérica α -la no leite. Com isso pode-se inferir que o teor de lactose sofre variações de acordo com a abundância da proteína sérica α -la.

A correlação moderada e negativa observada entre os dias de lactação e a expressão da proteína sérica α -la, como indicativo de serem inversamente proporcionais pode ser explicado

devido a α -la ser precursora da biossíntese de lactose no tecido mamário e o teor de lactose diminui significativamente com o avanço da lactação (NORO et al., 2006) sendo que a concentração de lactose no leite está diretamente relacionado com a função osmótica e a produção de leite da glândula mamária (PERES, 2001; WATTIAUX; ARMENTANO, 2007). Para esse resultado, Carvalho et al. (2003; 2002) afirmam que a maioria das proteínas do leite são sintetizadas nas células epiteliais da glândula mamária e têm suas concentrações reduzidas quanto maior for a duração da lactação da vaca reforçando assim, a importância do período seco para regeneração dos tecidos epiteliais desgastados da glândula mamária, acumular colostro e assegurar o desenvolvimento do feto, e por último completar as reservas corporais. Então, a duração da lactação afeta a abundância da proteína sérica α -la provavelmente pelo fato de que as células alveolares tem sua eficiência de síntese e secreção reduzida em animais mais longevos.

Não foi encontrado na literatura consultada explicação biológica coerente para as correlações fracas ($\rho = 0,375$, $\rho = 0,335$, $\rho = -0,387$, $\rho = -0,381$ e $\rho = 0,395$) entre a concentração de glicose sanguínea (mg/dL) e teor de ST (%) com expressão da proteína sérica β -lg e entre os teores de lactose (%), SNG (%) e CCS (log céls./mL⁻¹) com a expressão da fração κ -caseína, respectivamente. Shimakura et al. (2006), afirmam que medidas de associação entre duas variáveis não significa necessariamente que ambas têm uma relação de causa e efeito, ou seja, associação não é causalidade.

4.5. CONCLUSÃO

O presente estudo identificou frações de α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína, k-caseína, α -la e β -lg, sendo as mesmas diferencialmente abundantes nos genótipos A1A1, A2A2 e A1A2. Nas frações de caseína, para α_{S1} -caseína houve maior abundância nos homozigotos, para α_{S2} -caseína foi maior no genótipo A2A2, para β -caseína a maior abundância ocorreu no genótipo heterozigoto, porém para k-caseína a abundância oscilou entre os três genótipos, e para as frações de proteínas séricas, a α -la foi maior no genótipo A2A2 e β -lg variou entre os três genótipos. Ao relacionar as informações contidas no genoma das vacas com as informações do proteoma das amostras leite, observou-se associação moderada e forte entre as concentrações de glicose sanguínea (mg/dL), ureia e nitrogênio ureico no leite (mg/dL) com abundância das frações α_{S1} -, β - e κ -caseína. Também foi observado uma associação moderada entre os teores de lactose e dias em lactação com a

abundância da proteína sérica α -la. Concluí-se com esses resultados, que o polimorfismo no gene CSN2, possivelmente pode estar envolvido em variações qualitativas e quantitativas do perfil proteico do leite de vacas da raça Holandesa submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, S.; PIOT, M.; ROUSSEAU, F.; GRONGNET, J. F.; GAUCHERON, F. Physico-chemical changes in casein micelles from buffalo and cow's milk as a function of alkalisation. **Dairy Science and Technology**, v. 89, p. 387 – 403, 2009.

AMALFITANO, N.; STOCCO, G.; MAURMAYR, A.; PEGOLO, S.; CECCHINATO, A.; BITTANTE, G. Quantitative and qualitative detailed milk protein profiles of 6 cattle breeds: Sources of variation and contribution of protein genetic variants. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 11190 – 11280, 2020.

ANNISON, E. F.; LINZELL, J. L. The oxidation and utilization of glucose and acetate by the mammary gland of the goat in relation to their over-all metabolism and to milk formation. **The Journal of Physiology**, v. 175, p. 372 – 385, 1964.

ASLEDOTTIR, T. et al. Release of β -casomorphin-7 from bovine milk of different β -casein variants after ex vivo gastrointestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 81, p. 8–11, 2018.

BISUTTI, V.; PEGOLO, S.; GIANNUZZI, D.; MOTA, L. F. M.; VANZIN, A. TOSCANO, A.; TREVISI, E.; MARSAN, P. A.; BRASCA, M.; CECCHINATO, A. The β -casein (*CSN2*) A2 allelic variant alters milk protein profile and slightly worsens coagulation properties in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 105, p. 3794 – 3809, 2022.

BROOKE-TAYLOR, S. et al. Systematic Review of the Gastrointestinal Effects of A1 Compared with A2 β -Casein. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 8, n. 5, p. 739–748, 2017.

CAROLI, A. M.; CHESSA, S.; ERHARDT, G. J. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 11, p. 5335–5352, 2009.

CARVALHO, G.F., et al. Milk yield, somatic cell count and physicochemical characteristics of raw milk collected from dairy cows in Minas Gerais state. In: Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle da Mastite. *Anais...* Ribeirão Preto, 2002.

CARVALHO, L. A., NOVAES, L. P., GOMES, A. T., MIRANDA, J. E. C., RIBEIRO, A. C. C. L. Sistema de produção de leite (Zona da Mata Atlântica). Juiz de Fora: EMBRAPA – CNPGL, 2003.

CELEDON, P. A. F.; ANDRADE, A.; MEIRELES, K. G. X.; CARVALHO, M. C. C. G.; CALDAS, D. G. G.; MOON, D. H.; CARNEIRO, R. T.; FRANCESCHINI, L. M.; ODA, S.; LABATE, C.A. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. **Proteomics**, v. 7, p. 2258 – 2274, 2007.

CHEN, H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean-conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 574 – 578, 1995.

CIOTOLA, F.; ALBARELLA, S.; LIOTTA, L.; CONTESSA, A.; DI MEO, G.P.; BARBIERI, V.; PERETTI, V. Native cattle breeds of Southern Italy: Karyological profile. **Italian Journal of Animal Science**, v. 8, p. 54 – 56, 2009.

CORTHALS, G. L., WASINGER, V. C., HOCHSTRASSER, D. F., SANCHEZ, J. C. The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1104 – 1115, 2000.

DE NONI, I.; CATTANEO, S. Occurrence of β -casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and in their digests following in vitro simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 560–566, 15 mar. 2010.

ELFERINK, A. J. W.; ENTIRIWAA, D.; BULGARELLI, P.; SMITS, N. G. E.; PETERS, J. Development of a Microsphere-Based Immunoassay Authenticating A2 Milk and Species Purity in the Milk Production Chain. **Molecules**, v. 27, n. 3199, p. 1 – 11, 2022.

ELLIOTT, R. B.; HARRIS, D. P.; HILL, J. P.; BIBBY, N. J.; WASMUTH, H. E. Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: Casein variant consumption. **Diabetologia**, v. 42, n. 3, p. 292–296, 1999.

FARRELL, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1641 – 1674, 2004.

HECK, J. M. L.; SCHENNINK, A.; VAN VALENBERG, H. J. F.; BOVENHUIS, H.; VISKER, M. H. P. W.; VAN ARENDONK, J. A. M.; VAN HOOIJDONK, A. C. M. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, 92, p. 1192 – 1202, 2009.

HOLLAND, J. W.; DEETH, H. C.; ALEWOOD, P. F. Proteomic analysis of k-casein microheterogeneity. **Proteomics**, v. 4, p. 743 – 752, 2004.

HOLLAND, R.; LIU, S. Q.; CROW, V. L.; DELABRE, M. L.; LUBBERS, M.; BENNETT, M.; NORRIS, G. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. **International Journal Dairy**, v. 15, p. 711 – 718, 2005.

JINSMAA, Y., YOSHIKAWA, M. Enzymatic release of neocasomorphin and beta-casomorphin from bovine beta-casein. **Peptides**, v. 20, p. 957 – 962, 1999.

JÖUDU, I.; HENNO, M.; KAART, T.; PÜSSA, T.; KÄRT, O. The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. **International Dairy Journal**, v. 18, 964 – 967, 2018.

KAMIŃSKI, S.; CIEŚLIŃSKA, A.; KOSTYRA, E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, n. 3, p. 189–198, 2007.

LECLERC, E.; CALMETTES, P. Structure of β -casein micelles. *Physica B: Condensed Matter*, v. 241 - 243, p. 1141 - 1143, 1997.

LÖNNERDAL, B. Nutritional and Physiologic Significance of Human Milk Proteins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1537 – 1543, 2003.

MCLACHLAN, C. N. Beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. **Medical Hypotheses**, v. 56, p. 262 – 272, 2001.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. CASA1_BOVIN. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P02662/>>. Acessado em 29 de janeiro de 2023.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. CASA2_BOVIN. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P02663/>>. Acessado em 29 de janeiro de 2023.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. CASB_BOVIN. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P02666/>>. Acessado em 29 de janeiro de 2023.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. CASK_BOVIN. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P02668/>>. Acessado em 29 de janeiro de 2023.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. LACB_BOVIN. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P02754/>>. Acessado em 29 de janeiro de 2023.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. LALBA_BOVIN. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/p00711/>>. Acessado em 29 de janeiro de 2023.

NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Variation in milk protein concentration associated with genetic polymorphism and environmental factors. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 563 – 570, 1987.

NG-KWAI-HANG, K. F.; KROEKER, E. M. Rapid Separation and Quantification of Major Caseins and Whey Proteins of Bovine Milk by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 3052 – 3056, 1984.

NGUYEN, H. T. H. et al. Differences in the yoghurt gel microstructure and physicochemical properties of bovine milk containing A1A1 and A2A2 β -casein phenotypes. **Food Research International**, v. 112, p. 217–224, 2018.

NILSEN, H.; OLSEN, H. G.; HAYES, B.; SEHESTED, E.; SVENDSEN, M.; NOME, T.; MEUWISSEN, T.; LIEN, S. Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 41, p. 1 – 12, 2009.

NORO, G.; GONZÁLEZ, F. H.; CAMPOS, R.; DÜRR, J. W. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.1129- 1135, 2006.

PERES, J. R. O leite como ferramenta de monitoramento nutricional. *In: Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite*, p. 72, 2001.

POULSEN, N. A., JENSEN, H. B.; LARSEN, L. B. Factors influencing degree of glycosylation and phosphorylation of caseins in individual cow milk samples. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 3325 – 3333, 2016.

ROSELER, K. K.; FERGUSON, J. D.; SNIFFEN, C. J.; KERREMA, J. Dietary protein degradability effects of plasma and milk urea nitrogen and milk nonprotein nitrogen in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 525 – 534, 1993.

SCHAAR, J. Effects of k-casein genetic variants and lactation number on the renneting properties of individual milks. **Journal of Dairy Research**, v. 51, p. 397 – 406, 1984.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2856 – 2860, 2006.

SHIMAKURA, S. E. Correlação. In CE003 - Estatística II. Paraná: Dep. de Estatística – UFPR, p. 71 – 78, 2006.

SILVA, J. C. P. M.; OLIVEIRA, A. S.; VELOSO, C. M. Manejo e administração em bovinocultura leiteira. Viçosa, MG: Edição dos Autores, p. 482, 2009.

SUN, M.; LI, Z.; XING, Y.; MU, X.; CAO, Y.; HAO, Y.; YANG, J.; LI, D. Effects of glucose availability on α S1-casein synthesis in bovine mammary epithelial cells. **Journal of Animal Science**, v. 100, 2022.

SWAISGOOD, H. E. Chemistry of the caseins. In: *Advanced Dairy Chemistry*, v. 1. 3. Ed; p. 139 – 201, 2003.

SWEETSUR, A. W. M.; MUIR, D. D. Role of cyanate ions in the urea-induced stabilization of the caseinate complex in skim-milk. **Journal of Dairy Research**, v.48, n.1, p.163-166, 1981.

THOMPSON, A.; BOLAND, M.; SINGH, H. Milk Proteins: from Expression to Food. In: *Food Science and Technology*, 1. Ed, p. 561, 2009.

TRUSWELL, A.S. The A2 Milk Case: A Critical Review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 623 – 631, 2005.

VARNAM, A. H. E.; SUTHERLAND, J. P. *Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología*. Editorial Acribia (Zaragoza), p. 474, 1995.

VINCENT, D.; EZERNIEKS, V.; ELKINS, A.; NGUYEN, N.; MOATE, P. J.; COCKS, B. G.; ROCHFORD, S. Milk Bottom-Up Proteomics: Method Optimization. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 1 – 24, 2016.

WANG, X.; ZHONGNA, Y.; ZHAO, X.; HAN, R.; HUANG, D.; YANGA, Y. CHENG, G. Comparative proteomic characterization of bovine milk containing β -casein variants A1A1 and A2A2, and their heterozygote A1A2. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, p. 718 – 725, 2021.

CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O polimorfismo dos alelos A1 e A2 para o gene da β -caseína possivelmente afetou o metabolismo energético, principalmente o genótipo A2A2 que foi associado com as maiores médias de concentração de glicose (mg/dL). E ao relacionar as informações contidas no genoma das vacas leiteiras em lactação com as informações contidas no proteoma das amostras de leite dessas mesmas vacas verificou-se que as concentrações de metabólitos, sobretudo os energéticos (α_{S1} -csn, β -csn e β -lg) e nitrogenados (κ -csn), as variáveis de composição do leite em especial os teores de lactose (κ -csn e α -la), sólidos totais (β -lg), sólidos não gordurosos (κ -csn), contagem de células somáticas (κ -csn) e os dias de lactação (α -la) associam-se em proporção crescente ou decrescente com as proteínas diferencialmente abundantes identificadas no leite das vacas portadoras dos três genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene da β -caseína.

Os resultados indicaram que a análise proteômica é uma boa ferramenta para separação e quantificação e a cromatografia para identificação das frações proteicas do leite. Apesar de ainda serem escassas na literatura, pesquisas relacionadas ao polimorfismo dos alelos para o gene da β -caseína com as características fenotípicas produtivas e reprodutivas, e possivelmente que um número de animais e de repetições pode subestimar ou superestimar os resultados das análises e talvez essa limitação tenha sido um dos principais motivadores para a não detecção de mais efeitos estatisticamente significativos no presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKERMAN, M.; JOHANSEN, L. B.; RAUH, V.; SØRENSEN, J.; LARSEN, L. B.; POULSEN, N. A. Relationship between casein micelle size, protein composition and stability of UHT milk. **International Dairy Journal**, v. 112, p. 1 – 13, 2021.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T.; ANDRADE, A. E. B.; BIRAZZO, C. V.; RENARD, G. *Biologia Molecular da Célula*. 6. Ed., p. 1464, 2017.

ALEXANDER, L. J.; STEWART, A. F.; MACKINLAY, A. G.; KAPELINSKAYA, T. V.; TKACH, T. M.; GORODETSKY, S. I. Isolation and characterization of the bovine κ -casein gene. **European Journal Biochemistry**, v. 178, p. 395 – 401, 1988.

ALLMERE, T.; ANDRÉN, A.; BJÖRCK, L. Interactions between different genetic variants of b-lactoglobulin and k-casein during heating of skim milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 45, p. 1564 – 1569, 1997.

ÁLVARES, J. G. Pagamento do leite por sólidos. In: Visão técnica e econômica da produção leiteira, Piracicaba. Anais, FEALQ. p.129-140, 2005.

AMALFITANO, N.; STOCCO, G.; MAURMAYR, A.; PEGOLO, A.; CECCHINATO, A. Quantitative and qualitative detailed milk protein profiles of 6 cattle breeds: Sources of variation and contribution of protein genetic variants. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 11190 – 11208, 2020.

ASCHAFFENBURG, R.; DREWRY, J. Genetics of the β -lactoglobulins of cow's milk. **Nature**, v. 180, p. 376 – 378, 1957.

ASLEDOTTIR, T. et al. Release of β -casomorphin-7 from bovine milk of different β -casein variants after ex vivo gastrointestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 81, p. 8–11, 2018.

AUDAGNOTTO, M.; PERARO, M. D. Protein posttranslational modifications: in silico prediction tools and molecular modeling. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 307 – 319, 2017.

AUESTAD, N.; LAYMAN, D.K. Dairy Bioactive Proteins and Peptides: A Narrative Review. **Nutrition Reviews**, v. 79, p. 36 – 47, 2021.

BAGGIOLINI, M. The enzymes of the granules of polymorphonuclear leukocytes and their functions. **Enzyme**, v. 13, p. 132 – 60, 1972.

BANDEIRA, A. Leite: Pagamento por qualidade: A experiência do Pool Leite ABC. In: *Seminário Estadual sobre Qualidade do Leite*, v. 3, 2004.

BANGAR, Y. C.; MAGOTRA, A.; CHAUHAN, A.; YADAV, A. S. Genetic polymorphisms of kappa casein gene and its association with milk and composition traits in cows: An updated meta-analysis. **Meta Gene**, v. 30, p. 100948 – 100952, 2021.

BECH, A. M.; KRISTIANSEN, K. R. Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield. **Journal of Dairy Research**, v. 57, p. 53 – 62, 1990.

BEJA-PEREIRA, A.; ERHARDT, G.; MATOS, C.; GAMA, L.; FERRAND, N. Evidence for a geographical cline of casein haplotypes in Portuguese cattle breeds. **Animal Genetics**, v. 33, p. 295 – 300, 2002.

BELL K. One-dimension of starch gel electrophoresis of bovine skim milk. **Nature**, v. 195, p. 705 – 706, 1962.

BELL, K.; HOPPER, K. E.; MCKENZIE, H. A. Bovine α -lactalbumin C and α s1-, β -, and κ -caseins of Bali (Banteng) cattle, *Bos (Bibos) javanicus*. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 34, p. 149 – 159, 1981.

BENDIXEN, E. Understanding the Proteome. *In: Proteomics in Foods*, p. 3 – 19, 2013.

BENTIVOGLIO, D.; FINCO, A.; BUCCI, G.; STAFFOLANI, G. Is There a Promising Market for the A2 Milk? Analysis of Italian Consumer Preferences. **Sustainability**, v. 12, p. 1 - 16, 2020.

BHATTACHARYA, S. D.; ROYCHOUDHURY, A. K.; SINHA, N. K.; SEN, A. Inherited α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin Polymorphism in Indian Zebu Cattle. Comparison of Zebu and Buffalo α -Lactalbumins. **Nature**, v. 197, p. 797 – 799, 1963.

BHAVANA, T; ROSHAN, D. A2 milk Market by Form (Liquid and Powder), Packaging Form (Carton, Bottle and Others), and Distribution Channel (Supermarket & Hypermarket, Grocery & Convenience Stores, Online Retail and Others): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2021–2027. **Allied Market Research**, v. 61, p. 230 – 240, 2020.

BIJL, E.; DE VRIES, R.; VAN VALENBERG, H.; HUPPERTZ, T.; VAN HOOIJDONK, T. Factors influencing casein micelle size in milk of individual cows: Genetic variants and glycosylation of k-casein. **International Dairy Journal**, v. 34, p. 135 – 141, 2014.

BIRGISDOTTIR, B. E.; HILL, J. P.; HARRIS, D. P.; THORSDDOTTIR, I. Variation in consumption of cow milk proteins and lower incidence of Type 1 diabetes in Iceland vs the other 4 Nordic countries. **Diabetes Nutrition and Metabolism**, v. 15, p. 240 – 245, 2002.

BISSONNETTE, N.; DUDEMAINE, P. L.; THIBAUT, C.; ROBITAILLE, G. Proteomic analysis and immunodetection of the bovine milk osteopontin isoforms. **Journal of Dairy Science**, n. 95, p. 567 – 579, 2012.

BISUTTI, V.; PEGOLO, S.; GIANNUZZI, D.; MOTA, L. F. M.; VANZIN, A. TOSCANO, A.; TREVISI, E.; MARSAN, P. A.; BRASCA, M.; CECCHINATO, A. The β -casein (*CSN2*) A2 allelic variant alters milk protein profile and slightly worsens coagulation properties in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 105, p. 3794 – 3809, 2022.

BLOM, N.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; GUPTA, R.; GAMMEILTOFT, S.; BRUNAK, S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. **Proteomics**, v. 4, p. 1633 – 1649, 2004.

BOVENHUIS, H.; VAN ARENDONK, J.; KORVER, S. Association between milk protein polymorphisms and milk production traits. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2549 – 2559, 1992.

BRANTL, V.; TESCHEMACHER, H.; HENSCHEN, A.; LOTTSPREICH, F. Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**, v. 360, p. 1211 – 1216, 1979.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 76, *Diário Oficial da União*, de 26 de novembro de 2018.

BROOKE-TAYLOR, S. et al. Systematic Review of the Gastrointestinal Effects of A1 Compared with A2 β -Casein. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 8, n. 5, p. 739–748, 2017.

BROOKE-TAYLOR, S.; DWYER, K.; WOODFORD, K.; KOST, N. Systematic Review of the Gastrointestinal Effects of A1 Compared with A2 β -Casein. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 8, n. 5, p. 739–748, 2017.

BROOKE-TAYLOR, S.; DWYER, K.; WOODFORD, K.; KOST, N. Systematic Review of the Gastrointestinal Effects of A1 Compared with A2 β -Casein. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 8, p. 739–748, 2017.

CADE, R.; PRIVETTE, M.; FREGLY, M.; ROWLAND, N.; SUN, Z.; ZELE, V.; WAGEMAKER, H.; EDELSTEIN, C. Autism and schizophrenia: Intestinal disorders. **Nutritional Neuroscience**, v. 3, p. 57 – 72, 2000.

CARAGEA, C.; SINAPOV, J.; SILVESCU, A.; DOBBS, D.; HONAVAR, V. Glycosylation site prediction using ensembles of Support Vector Machine classifiers. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 438, 2007.

CAROLI, A. M.; CHESSA, S.; ERHARD, G. J. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5335 – 5352, 2009.

CARTER, D. C., AND J. X. HO. Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 153 – 203, 1994.

CASADO, B.; AFFOLTER, M.; KUSSMANN, M. OMICS-rooted studies of milk proteins, oligosaccharides and lipids. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 196 – 208, 2009.

CERBULIS, J.; FARRELL, H. M. Composition of milk of dairy cattle. Protein, lactose and fat contents and distribution of protein fraction. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 817 – 827, 1975.

CHEN, Q.; YIN, Q.; XIE, Q.; SMITH, E.E.; ZHAO, X.; LI, B.; HUO, G. Elucidating the physicochemical properties and surface composition of goat milk-based infant formula powders. **Food Chemistry**, v. 377, p. 2 - 9, 2022.

CHENG, J. B.; WANG, J. Q.; BU, D. P.; LIU, G. L.; ZHANG, C. G.; WEI, H. Y.; ZHOU, L.Y.; WANG, J. Z. Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 970 – 976, 2008.

CHOWANADISAI, W.; LONNERDAL, B. Alpha(1)-antitrypsin and antichymotrypsin in human milk: origin, concentrations, and stability. **The American Journal Clinical Nutrition**, v. 76, p. 828 – 833, 2002.

CIESLINSKA, A.; KAMIŃSKI, S.; KOSTYRA, E.; SIENKIEWICZ-SZLAPKA, E. β -casomorphin 7 in raw and hydrolyzed milk derived from cows of alternative β -casein genotypes. **Milchwissenschaft**, v. 62, p. 125 – 127, 2007.

CIEŚLIŃSKA, A.; KOSTYRA, E.; KOSTYRA, H.; OLEŃSKI, K.; FIEDOROWICZ, E.; KAMIŃSKI, S. Milk from cows of different β -casein genotypes as a source of β -casomorphin-7. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, p. 426 – 430, 2012.

CLARE, D. A.; SWAISGOOD, H.E. Bioactive milk peptides: a prospectus. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1187 – 1195, 2000.

COULSON, E. J.; STEVENS, H. The serological relationship of bovine whey albumin to serum albumin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 187, p. 355 – 363, 1950.

CREAMER, L. K. Some aspects of casein micelle structure. *In: Interactions in Food Proteins*. **Journal of the American Chemical Society**, p. 148–163, 1991.

CUNSOLO, V.; MUCCILLI, V.; SALETTI, R.; FOTI, S. Applications of mass spectrometry techniques 833 in the investigation of milk proteome. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 17, p. 305 – 320, 2011.

D’ALESSANDRO, A.; SCALONI, A.; ZOLLA, L. Human milk proteins: an interactomics and updated functional overview. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n, 7, p. 3339 – 3373, 2010.

DANIEL, H. Genomics and proteomics: Importance for the future of nutrition research. **British Journal of Nutrition**, 87, p. 305 – 311, 2003.

DANIELS, K. M.; WEBB, K. E., JR.; MCGILLIARD, M. L.; MEYER, M. J.; VAN AMBURGH, M. E.; AKERS, R. M. Effects of body weight and nutrition on mammary protein expression profiles in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, n. 89, p. 4276 – 4288, 2006.

DANILOSKI, D.; CUNHA, N.M.D.; MCCARTHY, N.A.; O’CALLAGHAN, T.F.; MCPARLAND, S.; VASILJEVIC, T. Health-related outcomes of genetic polymorphism of bovine beta-casein variants: A systematic review of randomized controlled trials. **Trends in Food Science & Technology**, v. 111, p. 233 – 248, 2021.

DANILOSKI, D.; MCCARTHY, N. A.; VASILJEVIC, T. Impact of heating on the properties of A1/A1, A1/A2, and A2/A2 β -casein milk phenotypes. **Food Hydrocolloids**, v. 128, 2022.

DAS, S.; GOSWAMI, B.; BISWAS, K. Milk adulteration and detection: A review. **Sensor Letters**, v. 14, p. 4 – 18, 2016.

DAVOODI, S. H.; SHAHBAZIC, R.; ESMAELID, S.; SOHRABVANDID, S.; MORTAZAVIANE, A. M.; JAZAYERIE, S.; TASLIMIE, A. Health-Related Aspects of Milk Proteins. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 573 – 591, 2016.

DE NONI, I.; CATTANEO, S. Occurrence of β -casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and in their digests following in vitro simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 560–566, 15 mar. 2010.

DELWICHE L, SLAUGHTER S. The Little SAS_ Book: A Primer, Fifth ed. Chapter 8 and chapter9. Oct. SAS Institute. ISBN# 978-1-61290-343-9, 2012.

DI STASIO, L.; P. MARIANI. The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production. *Zootecnica e Nutrizione Animale*, v. 26, p. 69 – 90, 2000.

DOMINICI, S.; MARESCOTTI, F.; SANMARTIN, C.; MACALUSO, M.; TAGLIERI, I.; VENTURI, F.; ZINNAI, A.; FACIONI, M. S. Lactose: Characteristics, Food and Drug-Related Applications, and Its Possible Substitutions in Meeting the Needs of People with Lactose Intolerance. **Foods**, v. 11, 1 – 18, 2022.

EIGEL, W. N.; BUTLER, J. E.; ERNSTROM, C. A.; FARRELL, H. M.; HARWALKAR, V. R.; JENNESS, R.; WHITNEY, R. M. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 1599 – 1631, 1984.

ELFERINK, A. J. W.; ENTIRIWAA, D.; BULGARELLI, P.; SMITS, N. G. E.; PETERS, J. Development of a Microsphere-Based Immunoassay Authenticating A2 Milk and Species Purity in the Milk Production Chain. **Molecules**, v. 27, n. 3199, p. 1 – 11, 2022.

ELLIOTT, R. B.; HARRIS, D. P.; HILL, J. P.; BIBBY, N. J.; WASMUTH, H. E. Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: Casein variant consumption. **Diabetologia**, v. 42, n. 3, p. 292–296, 1999.

EL-SALAM, M. H. A. Application of proteomics to the area of milk production, processing and quality control – A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, p. 153 – 166, 2014.

ERHARDT, G. Detection of a new k-casein variant in the milk of pinzgauer cattle. **Animal Genetics**, v. 27, p. 105 – 107, 1996.

ERHARDT, G. κ -Kaseine in der Rindermilch—Nachweis eines weiteren Allels (κ -CN E) in verschiedenen Rassen. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 106, p. 225 – 231, 1989.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. **EFSA Journal**, v. 231, p. 1 – 107, 2009.

FARRELL, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.;

SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1641 – 1674, 2004.

FASSIO, F.; FACIONI, M. S.; GUAGNINI, F. Lactose Maldigestion, Malabsorption, and Intolerance: A Comprehensive Review with a Focus on Current Management and Future Perspectives. **Nutrients**, v. 10, p. 1 – 12, 2018.

FEAGAN, J. T.; BAILEY, L. A.; HEHIR, A. F.; MCLEAN, D. M.; ELLIS, N. J.S. Coagulation of milk proteins. I. Effect of genetic variants of milk proteins on rennet coagulation and heat stability of normal milk. **Australian Journal Dairy Technology**, v. 27, p. 129 – 134, 1972.

FITZGERALD, R. J.; HILL, J. P. The relationship between milk protein polymorphism and the manufacture and functionality of dairy products. In Milk Protein Polymorphism. **International Dairy Federation**, p. 355 – 371, 1997.

FITZGERALD, R. J.; MURRAY, B.A. Bioactive peptides and lactic fermentations. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, p. 118 – 125, 2006.

FONSECA, D. C. M. **Sistema de rastreabilidade para controle da cadeia de leite A2 no Brasil**. Piracicaba, SP, 2022, 35 p. Trabalho de Conclusão de Curso – MBA em Agronegócios, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2022.

Food and Agriculture Organization of The United Nations. FAOSTAT. Crops and Livestock Products. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>>. Acessado em: 26 de janeiro de 2023.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*, 1998.

FOX, P. F.; McSWENEY, P. L. H. The major constituents of milk. In: *Advanced dairy chemistry: proteins*, v. 1, p. 740, 2003.

GALLINAT, J. L.; QANBARI, S.; DRÖGEMÜLLER, C.; PIMENTEL, E. C. G.; THALLER, G.; TETENS, J. DNA-Based Identification of Novel Bovine Casein Gene Variants, **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 699 – 709, 2013.

GANJAM, L. S.; THORNTON, W. H.; MARSHALL, R.T.; MACDONALD, R. S. Antiproliferative effects of yoghurt fractions obtained by membrane dialysis on cultured mammalian intestinal cells. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2325 – 2339, 1997.

GAPPER, L.W.; COPESTAKE, D. E. J.; OTTER, D. E.; INDYK, H. E. Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.389, p. 93 – 109, 2007.

GIGLIOTI, R.; GUTMANIS, G.; KATIKIA, L. M.; OKINOB, C. H.; OLIVEIRA, M. C. S.; VERCESI FILHO, A. E. New high-sensitive rhAmp method for A1 allele detection in A2 milk samples. **Food Chemistry**, v. 313, p. 1 – 7, 2020.

GILL, H. S.; DOULL, F.; RUTHERFURD, K. J.; CROSS, M. L. Immunoregulatory peptides in bovine milk. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. 111 – 117, 2000.

GOBBETTI, M.; STEPANIAK, L.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; DI CAGNO, R. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy products. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 42: 223–239, 2002.

GORDON, W. G. α -Lactalbumin. *In Milk Proteins*, v. 2, p. 331 – 363, 1971.

GOULABCHAND, R.; VINCENT, T.; BATTEUX, F.; ELIAOU, J. F.; GUILPAIN, P. Impact of autoantibody glycosylation in autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, p. 742 – 750, 2014.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD T. A. J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 39 – 63, 2002.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4. Ed, v.1, p. 2 – 80, 2012.

GRIFFIN, J. Methods of sperm DNA extraction for genetic and epigenetic studies. **Methods in Molecular Biology**, v. 927, p. 379 – 384, 2013.

GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M. F.; ACCOLAS, J. P. Note sur le polymorphisme genetique des lactoproteines de bovins et de yaks Mongols. **Annales de Genetique et de Selection Animale**, v. 14, p. 545 – 550, 1982.

GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M. F.; DUMAS, R. B. Structure primaire de la caséine α_{S1} et de la caséine β -bovines. Correctif. **European Journal of Biochemistry**, v. 40, p. 323 - 324, 1973.

GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M. F.; MERCIER, J. C.; BONNEMAIRE, J.; TEISSIER. J. H. Polymorphisme des lactoproteines de bovines Nepalais. Polymorphisme des caseine α_{S2} -mineurs. **Genetics Selection Evolution**, v. 8, p. 461 – 479, 1976.

GROVES, M. L. Minor milk proteins and enzymes. *In Milk Proteins*, v. 2, p. 367–418, 1971.
GROVES, M. L. The isolation of a red protein from milk. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 82, p. 3345 – 3350. 1960.

GUANTARIO, B.; GIRIBALDI, M.; DEVIRGILIIS, C.; FINAMORE, A.; COLOMBINO, E.; CAPUCCHIO, M. T.; EVANGELISTA, R.; MOTTA, V.; ZINNO, P.; CIRRINCIONE, S.; ANTONIAZZI, S.; CAVALLARIN, L.; ROSELLI, M. A Comprehensive Evaluation of the Impact of Bovine Milk Containing Different Beta-Casein Profiles on Gut Health of Ageing Mice. **Nutrients**, v. 12, p. 1 – 19, 2020.

HABIB, H. M.; IBRAHIM, S.; ZAIM, A.; IBRAHIM, W.H. The Role of Iron in the Pathogenesis of COVID-19 and Possible Treatment with Lactoferrin and Other Iron Chelators. **Biomed Pharm**, v. 136, p. 934 – 943, 2021.

HAKANSSON, A., ZHIVOTOVSKI, B., ORRENIUS, S., SABBHARWAL, H., AND SVANOR, C. Apoptosis induced by human milk proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 8064 – 8068, 1995.

HANDFORD, C. E.; CAMPBELL, K.; ELLIOTT, C. T. Impacts of Milk Fraud on Food Safety and Nutrition with Special Emphasis on Developing Countries. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, p. 130 – 142, 2016.

HARTWIG, A.; TESCHEMACHER, H.; LEHMANN, W.; GAULY, M.; ERHARDT, G. Influence of genetic polymorphisms in bovine milk on the occurrence of bioactive peptides. *In: Proceedings IDF “Milk Protein Polymorphism Seminar II”*, p.459 – 460, 1997.

HASIN, Y.; SELDIN, M.; LUSI, A. Multi-omics approaches to disease. **Genome Biology**, v. 18, n. 83, p. 1 – 15, 2017.

HECK, J. M. L.; SCHENNINK, A.; VAN VALENBERG, H. J. F.; BOVENHUIS, H.; VISKER, M. H. P. W.; VAN ARENDONK, J. A. M.; VAN HOOIJDONK, A. C. M. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1192 – 1202, 2009.

HILL, J. P.; BOLAND, M. J.; CREAMER, L. K.; ANEMA, S. G.; OTTER, D. E.; PATERSON, G. R. LOWE, R.; MOTION, R. L.; THRESHER, W. C. Effect of the bovine beta-lactoglobulin phenotype on the properties of beta-lactoglobulin, milk composition and dairy products. **Macromolecular Interactions in Food Technology**, v. 650, p. 281-294, 1996.

HILL, J. P.; LOWE, R. The effect of β -lactoglobulin genetic variants on the hydrolysis of as1 and b-casein in Cheddar cheese. *In Milk Protein Polymorphism. International Dairy Federation*, p. 440 – 444, 1997.

HILL, J. P.; PATERSON, G. R. The variation in milk composition from individual beta-lactoglobulin AA and BB phenotype cows. *In: Proceedings of the New Zealand Society for Animal Production*, v.54, p. 293 – 295, 1994.

HINZ, K.; O’CONNOR, P. M.; HUPPERTZ, T.; ROSS, R. P.; KELLY, A. L. Comparison of the principal proteins in bovine, caprine, buffalo, equine and camel milk. **Journal of Dairy Research**, v. 79, p. 185 – 191, 2012.

HOLLAND, J. W.; BOLAND, M. J. Post-translational modifications of caseins. *In M. Boland, H. Singh & A. Thompson (Eds.), Milk proteins*, 2. Ed, p. 141 – 168, 2014.

HOLLAND, J. W.; DEETH, H. C.; ALEWOOD, P. F. Resolution and characterisation of multiple isoforms of bovine k-casein by 2-DE following a reversible cysteine-tagging enrichment strategy. **Proteomics**, v. 6, p. 3087 – 3095, 2006.

HOLT, C.; CARVER, J. A.; ECROYD, H.; THORN, D. C. Invited review: Caseins and casein micelle: Their biological functions, structures and behavior in foods. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 6127 – 6146, 2013.

HORNE, D. S.; BANKS, J. M.; MUIR, D. D. Genetic polymorphism of bovine k-casein: effects on renneting and cheese yield. *In Milk Protein Polymorphism. International Dairy Federation*, p. 162 – 171, 1997.

HRISTOV, P.; TEOFANOVA, D.; MEHANDZHIYSKI, I.; ZAGORCHEV, L.; RADOSLAVOV, G. Application of Milk Proteins Genetic Polymorphism for Selection and Breeding of Dairy Cows in Bulgaria. **Milk Production**, p. 31 – 52, 2012.

HUPPERTZ, T. Chemistry of the caseins. *In: Advanced Dairy Chemistry*; p. 135–160, 2013.
IBEAGHA-AWEMU, E. M.; JANN, O. C.; WEIMANN, C.; ERHARDT, G. Genetic diversity, introgression and relationships among West/ Central African cattle breeds. **Genetics Selection Evolution**, v. 36, p. 673 – 690, 2004.

IBEAGHA-AWEMU, E. M.; PRINZENBERG, E. M.; JANN, O. C.; LÜHKEN, G.; IBEAGHA, A. E.; ZHAO, X.; ERHARDT, G. Molecular characterization of bovine CSN1S2*B and extensive distribution of zebu specific milk protein alleles in European cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3522 – 3529, 2007.

IBM. SPSS Statistics, Put the power of advanced statistical analysis in your hand. Retrieved from <https://www.ibm.com/products/us-en/offers/spss/spssstatistics-try-buy.html>, 2019.

ILLANES, A.; GUERRERO, C.; WILSON, L.; CONEJEROS, R.; SCOTT, F. Lactose: Production and Upgrading. *In Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective*, cap. 1, p. 1 – 33, 2016.

IMAFIDON, G. I.; FARKYE, N. Y.; TONG, P. S.; HARWALKER, V. R. HPLC, FPLC and electrophoretic assessment of proteolysis in Cheddar cheese made from milk containing different genetic variants of β -lactoglobulin and k-casein. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 113, 1993.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2021>. Acessado em: 26 de janeiro de 2023.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Trimestral do Leite. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/leite/brasil>. Acessado em: 26 de janeiro de 2023.

JACKSON, J. G.; JANSZEN, D. B.; LONNERDAL, B.; LIEN, E. L.; PRAMUK, K. P.; KUHLMAN, C. F. A multinational study of α -lactalbumin concentrations in human milk. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, p. 517- 521, 2004.

JACOBS, J. M.; MOTTAZ, H. M.; YU, L. R.; ANDERSON, D. J.; MOORE, R. J.; CHEN, W. N.; AUBERRY, K. J.; STRITTMATTER, E. F.; MONROE, M. E.; THRALL, B. D.; CAMP, D. G.; SMITH, R. D. Multidimensional proteome analysis of human mammary epithelial cell. **Journal of Proteome Research**, v. 3, n. 1, p. 68 – 75, 2004.

JAIWAL, K. P.; SACHINANDAN, A. S. Review on bovine beta-casein (A1, A2) gene polymorphism and their potentially hazardous on human health. **International Journal of Environment & Animal Conservation**, v. 3, 2014.

JAKOB, E.; PUHAN, Z. Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk proteins—A review. **International Dairy Journal**, v. 2 p. 157–178, 1992.

JANN, O. C.; IBEAGHA-AWEMU, E. M.; OZBEYAZ, C.; ZARAGOZA, P.; WILLIAMS, J. L.; AJMONE-MARSAN, P.; LENSTRA, J. A.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; ERHARDT, G. Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus. **Genetics Selection Evolution**, v. 36, p. 243 – 257, 2004.

JENNESS, R. The composition of milk. *In Lactation*, v. 3, p. 107, 1974.

JENNESS, R., B. L. LARSON, T. L. MCMEEKIN, A. M. SWANSON, C. H. WHIMAH, AND R. MCL. WHITNEY. Nomenclature of the proteins of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 39, p. 536, 1956.

JIMÉNEZ-MONTENEGRO, L.; ALFONSO, L.; MENDIZABAL, J. A.; URRUTIA, O. Worldwide Research Trends on Milk Containing Only A2 Casein: A Bibliometric Study. **Animals**, v. 12, n. 1909, p. 1 – 17, 2022.

JINSMAA, Y.; YOSHIKAWA, M. Enzymatic release of neocasomorphin and β -casomorphin from bovine β -casein. **Peptides**, v. 20, n. 8, p. 957–962, 1999.

JOHNSON, J. M.; CONFORTI, F. D. Lactose; Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. **Academic Press**, p. 3472 – 3476, 2003.

KAMIŃSKI, S.; CIEŚLIŃSKA, A.; KOSTYRA, E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, n. 3, p. 189–198, 2007.

KAY, S. S.; DELGADO, S.; MITTAL, J.; ESHRAGHI, R. S.; MITTAL, R.; ESHRAGHI, A. Beneficial Effects of Milk Having A2 β -Casein Protein: Myth or Reality? **The Journal of Nutrition**, v. 151, p. 1061 – 1072, 2021.

KELLY, P.; WOONTON, B. W.; SMITHERS, G. W. Improving the sensory quality, shelf-life and functionality of milk. *In: Functional and Speciality Beverage Technology*, p. 512, 2009.

KETTO, I. A.; KNUTSEN, T. M.; ØYAAS, J.; HERINGSTAD, B.; ÅDNØY, T.; DEVOLD, T. G.; SKEIE, S. B. Effects of milk protein polymorphism and composition, casein micelle size and salt distribution on the milk coagulation properties in Norwegian Red cattle. **International Dairy Journal**, v. 70, p. 55 – 64, 2017.

KETTO, I. A.; ØYAAS, J.; ÅDNØY, T.; JOHANSEN, A. G.; SCHÜLLER, R. B.; NARVHUS, J.; SKEIE, S. B. The influence of milk protein genetic polymorphism on the physical properties of cultured milk. **International Dairy Journal**, v. 78, p. 130 – 137, 2018.

KIM, S.; NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F. The relationship between milk protein phenotypes and lactation traits in Brown Swiss and Canadienne. **Asian–Australian Journal of Animal Science**, v. 11, p. 311 – 317, 1998.

KINSELLA JE, WHITEHEAD DM. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. **Advances Foods Nutrition Research**, v. 33, p. 343 – 438, 1989.

KITTS, D.D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources: Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1309 – 1323, 2003.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 785 - 796, 2004.

KORHONEN, H.; MARNILA, P.; GILL, H. S. Milk immunoglobulins and complement factors. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. 75 – 80, 2000.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 945 – 960, 2006.

KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPÄLA, A.; RANTAMÄKI, P.; TUPASELA, T. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, p. 307 – 319, 1998.

KOSTYRA, E.; KOSTYRA, H.; JARMOLOWSKA, B.; KRAWCZUK, S. Tetrahymena thermophila as a source of the opioid receptors for testing of opioid peptides. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 11, p. 707 – 712, 2002.

KOSTYRA, E.; SIENKIEWICZ-SZLAPKA, E.; JARMOLOWSKA, B.; KRAWCZUK S, KOSTYRA H. Opioid peptides derived from milk proteins. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 13, p. 25 – 35, 2004.

KROEKER, E. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E. Effects of environmental factors and milk protein polymorphism on composition of Casein fraction in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 1752 – 1757, 1985.

KUREK, M.; PRZYBILLA, B.; HERMANN, K.; RING, J. A naturally occurring opioid peptide from cow's milk, beta-casomorphine-7, is a direct histamine releaser in man. **Internation Archives of Allergy Immunology**, v. 97, p. 115 – 120, 1992.

LEGRAND, D.; ELASS, E.; CARPENTIER, M.; MAZURIER, J. Lactoferrin: a modulator of immune and infl ammatory responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 2549 – 2559, 2005.

LEVIEUX, D.; OLLIER, A. Bovine immunoglobulin G, beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post-partum period. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 421 – 430, 1999.

LI, S. S.; SHEN, J. S.; REN, D. X.; LIU, J. X. Effects of the processing methods of corn grain and soybean meal on milk protein expression profiles in dairy cows. **Animal**, n. 9, p. 267 – 274, 2015.

LI, S.; WANG, J.; WEI, H.; YANG, Y.; BU, D.; ZANG, L.; ZHOU, L. Identification of Bovine Casein Phosphorylation Using Titanium Dioxide Enrichment in Combination with Nano Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 11, p. 439 – 445, 2012.

- LI, S.; WANG, Q.; LIN, X.; JIN, X.; LIU, L.; WANG, C.; CHEN, Q.; LIU, J.; LIU, H. The Use of “Omics” in Lactation Research in Dairy Cows. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n. 5, p. 1 – 17, 2017.
- LINDMARK-MÅNSSON. H. Fatty Acids in Bovine Milk Fat. **Food & Nutrition Research**, v. 52, 2008.
- LINDMARK-MÅNSSON. H.; FONDÉN, R.; PETTERSON, H.E. Composition of Swedishdairy Milk. **International Dairy Journal**, v. 13. p. 409 – 425, 2003.
- LIU, WENTAO, YANG, QIUMENG, LIU, BINGYA, ZHU, ZHENGANG, Serum proteomics for gastric cancer. **Clinica Chimica Acta** 431, 179–184, 2014.
- LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **The American Journal Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1537 – 1543, 2003.
- LONNERDAL, B.; LIEN, E. L. Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants. **Nutrition Reviews**, 61, 295 – 305, 2003.
- LOSI, G.; CAPELLA, P.; CASTAGNETTI, G. B.; GRAZIA, L.; ZAMBONELLI, C.; MARIANI, P.; RUSSO, V. Influenza delle variants genetiche della Caseine k sulle formazione e sulle caratteristiche della cagliata. **Scienza e Tecnologia degli Alimenti**, v. 3, p. 373 – 376, 1973.
- MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, C. I.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Bovine whey proteins – overview on their main biological properties. **Food Research International**, v. 40, p. 1197 – 1211, 2007.
- MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, C. I.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Bovine whey proteins – overview on their main biological properties. **Food Research International**, v. 40, p. 1197 – 1211, 2007.
- MAHÉ, M. F.; MIRANDA, G.; QUERAL, R.; BADO, A.; ZAFIDRAJAONA, P. S.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of milk proteins in African *Bos taurus* and *Bos indicus* populations. Characterization of variants α S1-Cn H and k-Cn **Genetics Selection Evolution**, v. 31, p. 239 – 253, 1999.
- MANSO, M. A.; LÉONIL, J.; JAN, G.; GAGNAIRE, V. Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 845 – 855, 2005.
- MARIANI, P.; LOSI, G.; RUSSO, V.; CASTAGNETTI, G. B.; GRAZIA, L.; MORINI, D.; FOSSA, E. Cheesemaking tests made with milk characterized by variants A and B of κ -casein in the production of Parmigiano-Reggiano cheese. **Scienza e Tecnica Lattiero Casearia**, v. 27, p. 208 – 227, 1976.
- MARIANI, P.; RUSSO, V. Polmorfismo genetico della a-lattalbumina nelle razze bovine. **Rivista di Zootecnia e Veterinaria**, v. 6, p. 603 – 610, 1977.

MARKUS, C.R., JONKMAN, L.M., LAMMERS, J.H.C., DEUTZ, N.E.P., MESSER, M.H., AND RIGTERING, N. Evening intake of alpha-lactalbumin increases plasma tryptophan availability and improves morning alertness and brain measures of attention. **The American Journal Clinical Nutrition**, v. 81, p. 1026 – 1033, 2005.

MARSHALL, C. Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. **Science**, v. 259, p. 1865 – 1867, 1993.

MARTIN, P.; BIANCHI, L.; CEBO, C.; MIRANDA, G. Genetic polymorphism of milk proteins. *In: Advanced Dairy Chemistry, Proteins: Basic Aspects*, 4. Ed, v. 1, p. 463–514, 2013.

MARTIN, P.; SZYMANOWSKA, M.; ZWIERZCHOWSKI, L.; LEROUX, C. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminants milks. **Reproduction Nutrition Development**, n. 42, p. 433 – 459, 2002.

MARTIN, P.; SZYMANOWSKA, M.; ZWIERZCHOWSKI, L.; LEROUX, C. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 433 – 459, 2002.

MARTINI, M.; CECCHI, F.; SCOLOZZI, C.; SALARI, F.; CHIATTI, F.; CHESSA, S.; CAROLI, A. The influence of b-lactoglobulin genetic polymorphism on morphometric characteristics of milk fat globules and milk fatty acids composition in Italian Friesian cow. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 449, 2007.

MARZIALI, A. S.; NG-KWAI-HANG, K. F. Effects of Milk Composition and Genetic Polymorphism on Cheese Composition: Minutes of the Executive Committee Meetings and Summary Reports of ADSA Committees and Representatives. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 2533 – 2542, 1986.

MARZIALI, A. S.; NG-KWAI-HANG, K. F. Relationships between milk protein polymorphisms and cheese yielding capacity. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 1193 – 201, 1986.

MASSON, P. L.; HEREMANS, J. F.; DIVE, C. An iron-binding protein common to many external secretions. **Clinica Chimica Acta**, v. 14, p. 735 – 738, 1966.

MATHER, I. H. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 203 – 247, 2000.

MATSUDOMI, N.; OSHITA, T.; KOBAYASHI, K. Synergistic interaction between β -lactoglobulin and bovine serum albumin in heat-induced gelation. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1487 – 1493, 1994.

MATSUDOMI, N.; OSHITA, T.; SASAKI, E.; KOBAYASHI, K. Enhanced heat-induced gelation of β -lactoglobulin by α -lactalbumin. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, p. 1697 – 1700, 1992.

- MATSUDOMI, N.; RECTOR, D.; KINSELLA, J. E. Gelation of bovine serum albumin and β -lactoglobulin; effects of pH, salts and thiol reagents. **Food Chemistry**, v. 40, p. 55 – 69, 1991.
- MAYER, H. K.; LENZ, K.; HALBAUER, E. M. “A2 milk” authentication using isoelectric focusing and different PCR techniques. **Food Research International**, v. 147, p. 1 – 9, 2021.
- MAYER, H. K.; MARCHLER, A.; PROHASKA, C.; NORZ, R. Milk protein polymorphism in Austrian dairy cattle breeds. **Milchwissenschaft**, v. 52, p. 366 – 369, 1997.
- McLACHLAN, C. N. S. β -casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. **Medical Hypotheses**, v. 56, n. 2, p. 262 – 272, 2001.
- McLEAN, D. M.; GRAHAM, E. R. B.; PONZONI, R. W.; MCKENZIE, H. A. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. **Journal of Dairy Research**, v. 51, p. 531 – 546, 1984.
- McSWEENEY, P. L. H., OLSON, N. F.; FOX, P. F.; HEALY, A. Proteolysis of bovine α_{S2} -casein by chymosin. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 119, p. 429 – 432, 1994.
- MEHTA, B. M. Chemical Composition of Milk and Milk Products. *In: Handbook of Food Chemistry*, p. 511 – 553, 2015.
- MEISEL, H.; BOCKELMANN, W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 207 – 215, 1999.
- MEISEL, H.; GOEPFERT, A.; GÜNTHER, S. ACE-inhibitory activities in milk products. **Milchwissenschaft**, v. 52, p. 307 – 311, 1997.
- MENCARINI, I.; WOODFORD, K.; OLD, K. Comparing herd selection strategies for A2 beta-casein. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 73, p. 149 – 154, 2013.
- MERCIER, J. C.; GROSCLAUDE, F.; DUMAS, R. B. Structure primaire de la caseine α_{S1} bovine. Sequence complete. **European Journal of Biochemistry**, v. 23, p. 41 – 51, 1971.
- MERCIER, J.C.; BRIGNON, G.; DUMAS, B. R. Structure primaire de la caseine kB bovine. Sequence complete. **European Journal of Biochemistry**, v. 35, p 222 – 235, 1973.
- MICHEEL, C. M.; NASS, S. J.; OMENN, G. S. Omics-Based Clinical Discovery: Science, Technology, and Applications. *In: Evolution of Translational Omics*, Washington (DC): National Academies Press (US), 2012.
- MORGAN, A.; WINCK, C. A. Rastreabilidade da cadeia produtiva do leite como ferramenta de diferenciação mercadológica. **Revista de Administração de Roraima**, v. 6, p. 430 – 449, 2016.

MORINI, D.; LOSI, G.; CASTAGNETTI, G. B.; BENEVEILLI, M.; RESMINI, P.; VOLONTENO, G. The influence of genetic variants of kappa casein on the size of Casein micelles. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v. 26, p. 437 – 444, 1975.

MUEHLENKAMP, M. R.; WARTHESEN, J. J. β -Casomorphins: Analysis in Cheese and Susceptibility to Proteolytic Enzymes from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 1, p. 20–26, 1996.

NEELIN, J. M. Variants of κ -casein revealed by improved starch gel electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, v. 47, p. 506 – 509, 1964.

NG-KWAI-HANG KF, KIM S. Different amounts of β -lactoglobulin A and B in milk from heterozygous AB cows. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 689 – 695, 1996.

NG-KWAI-HANG, K. F. Genetic variants of milk proteins and their effects on the yield and quality of cheese. **Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 1, 2006.

NG-KWAI-HANG, K. F.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of milk proteins. *In Advanced Dairy Chemistry – Proteins*, v. 1, p. 739 – 816, 2003.

NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Variation in milk protein concentration associated with genetic polymorphism and environmental factors. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 563 – 570, 1987.

NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 835 – 840, 1984.

NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 22 – 26, 1986.

NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Percentages of Protein and Nonprotein Nitrogen with Varying Fat and Somatic Cells in Bovine Milk. **Journal of Dairy Science**, v 68, p. 1257 – 1262, 1985.

NG-KWAI-HANG, K. F.; JOHNSTON, K.; BOLAND, M. J.; AULDIST, M. J. Cheddar cheesemaking characteristics of Jersey milk containing genetic variants A, B and C of β -lactoglobulin. **Milchwissenschaft**, v. 57, p. 383 – 387, 2002.

NGUYEN, D.; Busetti, F.; JOHNSON, S.K. SOLAH. V.A. Identification and quantification of native beta-casomorphins in Australian milk by LC-MS/MS and LC-HRMS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 44, p. 102–110, 2015.

NGUYEN, H. T. H.; SCHWENDEL, H.; HARLAND, D. DAY, L. Differences in the yoghurt gel microstructure and physicochemical properties of bovine milk containing A1A1 and A2A2 β -casein phenotypes. **Food Research International**, v. 112, p. 217–224, 2018.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems biology: Metabonomics. **Nature**, v. 455, p. 1054 – 1056, 2008.

NIKIFOROV, Y. E.; NIKIFOROVA, M. N. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. **Nature**, v. 7, p. 569 – 580, 2011.

NILSEN, H.; OLSEN, H. G.; HAYES, B.; SEHESTED, E.; SVENDSEN, M.; NOME, T.; MEUWISSEN, T.; LIEN, S. Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 41, p. 1 – 12, 2009.

NOBREGA, M. M. **Desenho, caracterização e encriptação de peptídeos bioativos como estratégia para o processo de entrega e otimização do perfil de atividade**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade de Brasília, p. 128, 2017.

NUYTS-PETIT, V.; DELACRIOX-BUCHET, A.; VASSAL, L. Influence de trois haplotypes des caséines α_{S1} , β et k fréquents en race bovine Normande sur la composition du lait et l'aptitude à la fabrication fromagère. **Le Lait**, v. 77, p. 625 – 639, 1997.

NYSTROM, J.; WINSTON, D. R. A2 milk marketing and human health. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 18, 2016.

O'DONNELL, R., HOLLAND, J. W., DEETH, H. C.; ALEWOOD, P. F. Milk proteomics. **International Dairy Journal**, 14, 1013–1023, 2004.

O'MAHONY, J. A.; FOX, P. F. Milk: An overview. In *M. Boland, H. Singh & A. Thompson (Eds.), Milk proteins*, 2. Ed, p. 19 – 73, 2014.

OLIVEIRA, D.; MACHÍN, L.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; WALTER, E.H.; GIMÉNEZ, A.; ARES, G. Consumers' attention to functional food labels: Insights from eye-tracking and change detection in a case study with probiotic milk. **LWT Food Science and Technology**, v. 68, p. 160 – 167, 2016.

OSTA, R., S. MARCOS, AND C. RODELLAR. A *MnII* polymorphism at the bovine α_{S2} -casein gene. **Animal Genetics**, v. 26, p. 213, 1995.

OTAVIANO, A. R.; TONHATI, H.; SENA, J. A. D.; CERÓN, M. F. M. Kappa-casein gene study with molecular markers in female buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Genetics and Molecular Biology**, n. 28, p. 237 - 241, 2005.

PACCHIAROTTI, V. L.; MENDES, J. P. G.; FERREIRA, L. M. Produção do leite A2 e melhoramento genético do rebanho. **Revista Interdisciplinar de Saúde e Educação**, v. 1, p. 208 – 226, 2020.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837 – 846, 2000.

PATERSON, G. R.; OTTER, D. E.; HILL, J. P. Application of capillary electrophoresis in the identification of phenotypes containing the b-lactoglobulin C variant. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2637 – 2644, 1995.

PAVONCELLO, V.; BARRAS, F.; BOUVERET, E. Degradation of Exogenous Fatty Acids in *Escherichia coli*. **Biomolecules**, v. 12, p. 1 – 25, 2022.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, p. 619 – 627, 2014.

PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R. J.; O'BRIEN, N. M. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 643 – 654, 2009.

POLIS, B. D., H. W. SHMUKLER, AND J. H. CUSTER. Isolation of a crystalline albumin from milk **Journal of Biological Chemistry**, v. 187, 349 – 354, 1950.

PORTNOY, M.; BARBANO, D. M. Lactose: Use, Measurement, and Expression of Results. **Journal of Dairy Science**, v. 104, p. 8314 – 8325, 2021.

POULSEN, N. A.; JENSEN, H. B.; LARSEN, L. B. Factors influencing degree of glycosylation and phosphorylation of caseins in individual cow milk samples. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 3325 – 3333, 2016.

PRINZENBERG, E. M.; JIANLIN, H.; ERHARDT, G. Genetic variation in the kappa-casein gene (CSN3) of Chinese yak (*Bos grunniens*) and phylogenetic analysis of CSN3 sequences in the genus *Bos*. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1198 – 1203, 2008.

PRINZENBERG, E. M.; KRAUSE, I.; ERHARDT, G. SCCP analysis of the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphism (H, I, A1). **Animal Biotechnology**, v. 10, p. 49 – 62, 1999.

PRINZENBERG, E.; HIENDLEDER, M. S.; IKONEN, T.; ERHARDT, G. Molecular genetic characterization of new bovine κ -casein alleles CSN3-F and CSN3-G and genotyping by PCR-RFLP. **Animal Genetics**, v. 27, p. 347 – 349, 1996.

PUHAN, Z.; JAKOB, E. Genetic variants of milk proteins and cheese yield. *In: Proceedings of the IDF Seminar on Cheese Yield and Factors Affecting its Control*, p. 111 – 122, 1994.

RAMBARAN, R. N.; SERPELL, L. C. Amyloid fibrils: Abnormal protein assembly. **Prion**, v. 2, p. 112 – 117, 2008.

RAMPILLI, M.; CAROLI, A.; BOLLA, P.; PIROLO, G. Relationships of milk protein genotypes with casein composition and rennet ability of milk during lactation. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v.39, p. 362 – 379, 1988.

RAPOSO, H. F. Efeito dos ácidos graxos n-3 e n-6 na expressão de genes do metabolismo de lipídeos e risco de aterosclerose. **Revista de Nutrição**, v.23, p.871-879, 2010.

RASMUSSEN, L. K; HOJRUP, P.; PETERSEN, T. E. Localization of two interchain disulfide bridges in dimers of bovine α_{s2} -casein. **European Journal of Biochemistry**, v. 203, p. 381 – 386, 1992.

REALE, S.; CAMPANELLA, A.; MERIGIOLI, A.; PILA, F. A novel method for species identification in milk and milk-based products. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 107 – 112, 2008.

REINHARDT, T. A.; LIPPOLIS, J. D. Bovine milk fat globule membrane proteome. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p. 406–416, 2006.

ROBITAILLE, G. Influence of kappa-casein and beta-lactoglobulin genetic variants on the heat stability of milk. **Journal of Dairy Research**, v.62, n.4, p.593-600, 1995.

RUPRECHTER, G.; ADRIEN, M. L.; LARRIESTRA, A.; MEOTTI, O.; BATISTA, C.; MEIKLE, A.; NORO, M. Metabolic predictors of peri-partum diseases and their association with parity in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 118, p. 191–198, 2018.

RYŠLAVÁ, H.; DOUBNEROVÁ, V.; KAVAN, D.; VANĚK, O. Effect of posttranslational modifications on enzyme function and assembly. **Journal of Proteomics**, v. 92, p. 80 – 109, 2013.

SAITO, M.; YIN, L. J.; KOBAYASHI, I.; NAKAJIMA, M. Comparison of stability of bovine serum albumin-stabilized emulsions prepared by microchannel emulsification and homogenization. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 1020 – 1028, 2006.

SAITO, T.; NAKAMURA, T.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y.; ITOH, T. Isolation and Structural Analysis of Antihypertensive Peptides That Exist Naturally in Gouda Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1434 – 1440, 2000.

SANTOS, L. H. L. M. L. M.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Quantification of α -lactalbumin in human milk: Method validation and application. **Analytical Biochemistry**, v. 362, p. 293 – 295, 2007.

SANTOS, M. V. S.; FONSECA, L. F. L. Síntese e composição do leite. *In: Controle da mastite e qualidade do leite: desafios e soluções*, p. 20 – 33, 2019.

SANTOS, R. D.; GAGLIARDI, A. C. M.; XAVIER, H. T.; MAGNONI, C. D.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A. M. Sociedade Brasileira de Cardiologia: I diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.100, p.1 – 40, 2013.

SCHAAR, J.; HANSSON, B.; PETTERSON, H. E. Effects of genetic variants of k-casein and b-lactoglobulin on cheesemaking. **Journal of Dairy Research**, v. 52, p. 429 – 437, 1985.

SCHANBACHER, F. O., R. E. GOODMAN, AND R. S. TALHOUK. Bovine mammary lactoferrin: Implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v.76, p. 3812 – 3831, 1993.

SCHANBACHER, F. O.; GOODMAN, R. E.; TALHOUK, R. S. Bovine mammary lactoferrin: Implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 3812 –3831, 1993.

SEBASTIANI, C.; ARCANGELI, C.; CIULLO, M.; TORRICELLI, M.; CINTI, G.; FISICHELLA, S.; BIAGETTI, M. Frequencies Evaluation of Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central Italy. **Animals**, v. 10, n. 252, 2020.

SHERBON, J. W.; LEDFORD, R. A.; REGENSTEIN, J. Variants of milk proteins and their possible relation to milk properties. **Journal of Dairy Science**, v. 50, p. 951, 1967.

SILVA, A. F. S.; ROCHA, F. R. P. A novel approach to detect milk adulteration based on the determination of protein content by smartphone-based digital image colorimetry. **Food Control**, v. 115, p. 1 – 6, 2020.

SMITH, I. H. The 20th anniversary of proteomics and some of its origins. **Proteomics**, v. 15, p. 1773 – 1776, 2015.

SMOLENSKI, G.; HAINES, S.; KWAN, F.Y.; BOND, J.; FARR, V.; DAVIS, S.R.; STELWAGEN, K.; WHEELER, T.T. Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 1, p. 207 – 215, 2007.

SOBCZAK, M.; SAŁAGA, M.; STORR, M.A.; FICHNA, J. Physiology, Signaling, and Pharmacology of Opioid Receptors and Their Ligands in the Gastrointestinal Tract: Current Concepts and Future Perspectives. **Journal of Gastroenterology**, v. 49, p. 24 – 45, 2014.

SODHI, M.; MUKESH, M.; SHARMA, V.; KATARIA, R. S.; SOBTI, R. C. Harnessing potential of A2 milk in India: an overview. **Advances in Animal Experimentation and Modeling**, p. 379 – 392, 2022.

SOKOLOV, O. Y.; PRYANIKOVA, N. A.; KOST, N. V.; ZOLOTAREV, Y. A.; RYUKERT, E. N.; ZOZULYA. Reactions between β -Casomorphins-7 and 5-HT 2 Serotonin Receptors Bulletin of Experimental Biology and Medicine. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 140, n. 5, 2005.

STOOP, W. M.; SCHENNINK, A.; VISKER, M. H. P. W.; MULLAART, E.; VAN ARENDONK, J. A. M.; BOVENHUIS, H. Genome-wide scan for bovine milk-fat composition: I: quantitative trait loci for short- and medium-chain fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4664 – 4675. 2009.

SULIMOVA, G. E.; BADAGUEVA, I. N.; UDINA, I. G. Polymorphism of the κ -casein gene in subfamilies of the Bovidae. **Genetika**, v. 32, p. 1576 – 1582, 1996.

SULIMOVA, G. E.; SOKOLOVA, S. S.; SEMIKOZOVA, O. P.; NGUET, L. M.; BERBEROV, E. M. Analysis of DNA polymorphisms of clustered genes in cattle: casein genes and genes of the major histocompatibility complex (BOLA). **TSitologii i genética**, v. 26, p. 18 – 26, 1992.

SUMMER, A.; DI FRANGIA, F.; AJMONE MARSAN, P.; DE NONI, I.; MALACARNE, M. Occurrence, biological properties and potential effects on human health of β -casomorphin 7: Current knowledge and concerns. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 60, p. 3705 – 3723, 2020.

SUN, M.; LI, Z.; XING, Y.; MU, X.; CAO, Y.; HAO, Y.; YANG, J.; LI, D. Effects of glucose availability on α S1-casein synthesis in bovine mammary epithelial cells. **Journal of Animal Science**, v. 100, 2022.

SUN, Z.; CADE, R.; FREGLY, M. J.; PRIVETTE, R. M. β -casomorphin induces Fos-like immunoreactivity in discrete brain regions relevant to schizophrenia and autism. **Autism**, v. 3, p. 67 – 83, 1999.

SUN, Z.; CADE, R.; ZHANG, Z.; ALOUDOR, J.; VAN, H. Angiotensinogen gene knockout delays and attenuates cold-induced hypertension. **Hypertension**, v. 41, p. 322–327, 2003.

SWAISGOOD, H. E. Chemistry of the caseins. *In: Advanced Dairy Chemistry – Proteins*, v. 1, p. 139 – 201, 1992.

SWAISGOOD, H. E.; LARSON, B. L.; KALAN, E. B.; BRUNNER, J. R.; MORR, C. V.; HANSEN, P. M. T. Methods of gel electrophoresis of milk proteins. **American Dairy Science Association**, 1975.

Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). NNF Center for Protein Research, and European Molecular Biology Laboratory, STRING program. Retrieved from <http://string-db.org>, 2019.

TAILFORD, K. A.; BERRY, C. L.; THOMAS, A. C.; CAMPBELL, J. H. A Casein Variant in Cow's Milk Is Atherogenic. **Atherosclerosis**, v. 170, p. 13 – 19, 2003.

TAKAYAMA, Y.; MIZUMACHI, K. Effect of bovine lactoferrin on extracellular matrix calcification by human osteoblast-like cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, p. 226 – 230, 2008.

TESCHEMACHER, H. Opioid receptor ligands derived from food proteins. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1331 – 1344, 2003.

THOMPSON, M. P.; FARRELL, H. M. Genetic variants of the milk proteins. *In: Lactation*, v. 3, p. 109 – 134, 1974.

THORSODDOTTIR, I.; BIRGISDOTTIR, B. E.; JOHANNSDOTTIR, I. M.; HARRIS, D. P.; STEINGRIMSDOTTIS, L.; THORSSON, A. V. Different β -Casein fractions in Icelandic versus Scandinavian cow's milk may influence diabetogenicity of cow's milk in infancy and explain low incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in Iceland. **Pediatrics**, v. 106, p. 719–724, 2000.

TOELSTED, S.; HOFMANN, T. Quantitative Studies and Taste Re-Engineering Experiments toward the Decoding of the Nonvolatile Sensory Metabolome of Gouda Cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5299 – 5307, 2008.

TONG, L. M.; SASAKI, S.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1473 – 1478, 2000.

TONG, P. S.; VINK, S.; FARKYE, N. Y.; MEDRANO, J. F. Effect of genetic variants of milk proteins on the yield of Cheddar cheese. *In Proceedings of the IDF Seminar on Cheese Yield and the Factors Affecting its Control*, p. 179 – 187, 1994.

TREWEEK, T. M.; THORN, D. C.; PRICE, W. E.; CARVER, J. A. The chaperone action of bovine milk α S1- and α S2-caseins and their associated form α S-casein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 510, p. 42 – 52, 2011.

TRUSWELL, A. S. The A2 milk case: A critical review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 623 – 631, 2005.

TRUSWELL, A.S. The A2 Milk Case: A Critical Review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 623 – 631, 2005.

Uniprot. ID Mapping. Disponível em: < <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02663/entry>>. Acessado em: 19 de dezembro de 2022.

Uniprot. ID Mapping. Disponível em: < <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02666/entry>>. Acessado em: 19 de dezembro de 2022.

Uniprot. ID Mapping. Disponível em: < <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02668/entry>>. Acessado em: 19 de dezembro de 2022.

Uniprot. ID Mapping. Disponível em:< <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02662/entry>>. Acessado em: 19 de dezembro de 2022.

Uniprot. ID Mapping. Disponível em:< <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02754/entry>>. Acessado em: 19 de dezembro de 2022.

Uniprot. ID Mapping. Disponível em:< <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00711/entry>>. Acessado em: 19 de dezembro de 2022.

Uniprot. ID Mapping. Disponível em:< <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02769/entry>>. Acessado em: 19 de dezembro de 2022.

Uniprot. ID Mapping. Disponível em:< <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P24627/entry>>. Acessado em: 19 de dezembro de 2022.

URRUTIA, O.; MENDIZABAL, J. A.; ALFONSO, L. Reconversión de las explotaciones de vacuno de leche a la producción A2. **Rev. Frisona Esp**, v. 232, p. 88 – 90, 2019.

VAN DEN BERG G. Genetic polymorphism of k-casein and b-lactoglobulin in relation to milk composition and cheesemaking properties. *In Proceedings of the IDF Seminar on Cheese Yield and Factors Affecting its Control*, p. 123 – 133, 1994.

VAN EENENNAAM, A. L.; MEDRANO, J. F. Differences in allelic protein expression in the milk of heterozygous k-casein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1491–1496, 1991.

VINCENT, D.; EZERNIEKS, V.; ELKINS, A.; NGUYEN, N.; MOATE, P. J.; COCKS, B. G.; ROCHFORD, S. Milk Bottom – Up Proteomics: Method Optimization. **Frontiers**, v. 6, p. 1 24, 2016.

VISKER, M. H. P. W.; HECK, J. M. L.; VAN VALENBERG, H. J. F.; VAN ARENDONK, J. A. M.; BOVENHUIS, H. A new bovine milk-protein variant: α -Lactalbumin variant D. **Journal of Dairy Science**, 95, 2165 – 2169, 2012.

VITTE, K.; KERZIENE, S.; KLEMENTAVIČIŪTĖ, J.; VITTE, M.; MIŠEIKIENĖ, R.; KUDLINSKIENĖ, I.; ČEPAITĖ, J.; DILBIENE, V.; STANKEVIČIUS, R. Relationship of β -casein genotypes (A1A1, A1A2 and A2A2) to the physicochemical composition and sensory characteristics of cows' milk. **Journal of Applied Animal Research**, v. 50, p. 161- 166, 2022.

WALSH, C. D.; GUINEE, T. P.; REVILLE, W. D.; HARRINGTON, D.; MURPHY, J. J.; O'KENNEDY, B. T.; FITZGERALD, R. J. Influence of k-casein genetic variant on rennet gel microstructure, cheddar cheesemaking properties and casein micelle size. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 707 – 714, 1998.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? **International Dairy Journal**, v. 9, 189 – 192, 1999.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 1965 – 1979, 1990.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. *Dairy Science and Technology*, v. 2, p. 808, 2005.

WANG, J.; LI, D.; DANGOTT, L. J.; WU, G. Proteomics and its role in nutrition research. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1759 – 1762, 2006.

WANG, M.; JIANG, Y.; XU, X. A novel method for predicting post-translational modifications on serine and threonine sites by using site-modification network profiles. *In: Molecular BioSystems*, 2015.

WANG, X.; ZHONGNA, Y.; ZHAO, X.; HAN, R.; HUANG, D.; YANGA, Y. CHENG, G. Comparative proteomic characterization of bovine milk containing β -casein variants A1A1 and A2A2, and their heterozygote A1A2. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, p. 718 – 725, 2021.

WANG, Y.; XU, C.; AN, Z.; LIU, J.; FENG, J. Effect of dietary bovine lactoferrin on performance and antioxidant status of piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 140, p. 326 – 336, 2008.

WANISKA, R. D.; SHETTY, J. K.; KINSELLA, J. E. Protein-stabilized emulsions: effects of modification on the emulsifying activity of bovine serum albumin in a model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, p. 826 – 831, 1981.

WARD, T. J; HONEYCUTT, R. L.; DERR, J. N. Nucleotide sequence evolution at the kappa-casein locus: evidence for positive selection within the family Bovidae. **Genetics**, v. 147, p. 1863 – 1872, 1997.

WASINGER, V. C.; CORDWELL, S. J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; WILKINS, M. R.; DUNCAN, M. W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K. L.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1090 – 1094, 1995.

WEI, L.; XING, P.; SHI, G.; JI, Z.; ZOU, Q. Fast prediction of protein methylation sites using a sequence-based feature selection technique. **IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics**, v. 16, p. 1264 – 1273, 2017.

WHITNEY, R. M.; BRUNNER, J. R.; EBNER, K. E.; FARRELL JR. H. M.; JOSEPHSON, R. V.; MORR, C. V.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the proteins of cow's milk: fourth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 795 – 815, 1976.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGLES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, v. 14, p. 61 – 65, 1996.

WILLARD, H. F.; NUSSBAUM, R.; MCINNES, R. R. THOMPSON & THOMPSON – Genética Médica. 8. Ed., p. 560, 2016.

WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 597 – 608, 1998.

WOYCHIK, J. H. Polymorphism in κ -casein of cow's milk. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 16, p. 267 – 271, 1964.

WU, C. C.; HOWELL, K. E.; NEVILLE, M. C.; YATES, J. R.; MCMANAMAN, J. L. Proteomics reveal a link between the endoplasmic reticulum and lipid secretory mechanisms in mammary epithelial cells. **Electrophoresis**, v. 21, p. 3470 – 3482, 2000.

YANG, Y. X.; WANG, J. Q.; YUAN, T. J.; BU, D. P.; YANG, J. H.; SUN, P.; ZHOU, L. Y. Effects of duodenal infusion of free linolenic acid on the plasma and milk proteome of lactating dairy cows. **Animal**, v. 7, p. 293 – 299, 2013.

YANG, Y. X.; SHEN, W. J.; ZHAO, X. W.; ZHAO, H. L.; HUANG, D. W.; CHENG, G. L. Proteomics and pathway analysis of N-glycosylated mammary gland proteins in response to *Escherichia coli* mastitis in cattle. **The Veterinary Journal**, v. 200, p. 420 – 425, 2014.

ZANELA, M. B.; KOLLING, G. J.; RIBEIRO, M. E. R.; FISCHER, V. Análises de composição e estabilidade do leite ao álcool. In.: *Conferencia internacional sobre leche inestable*, v. 2., p. 2 -5, 2011.

ZLATAREV, S.; HRISTOV, P.; TEOFANOVA, D.; RADOSLAVOV, G. Impact of genetic polymorphism of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits in cows of the Bulgarian Rhodopean cattle. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, v. 61, p. 1577 – 1582, 2008.