

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ELIZANGELA DOMENIS MARINO

Influência do polimorfismo do gene CSN-2 na produção e características do leite de vacas Holandesas

Pirassununga-SP

2021

ELIZANGELA DOMENIS MARINO

Influência do polimorfismo do gene CSN-2 na produção e características do leite de vacas Holandesas

(Versão Corrigida)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal

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

M339i Marino, Elizangela Domenis
Influência do polimorfismo do gene CEN-2 na
produção e características do leite de vacas
Holandesas / Elizangela Domenis Marino ; orientador
Ana Maria Centola Vidal. -- Pirassununga, 2021.
46 f.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.
1. Bovinocultura de leite. 2. Genótipos. 3.
Fenótipos. 4. Produção Animal. I. Vidal, Ana Maria
Centola, orient. II. Título.



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 (ID 001407), sob a responsabilidade de **Ana Maria Centola Vidal e equipe; Danielle de Cássia Martins da Fonseca; Elizangela Domenis Marino; Alenia Naliato 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 (ID 001407), under the responsibility of **Ana Maria Centola Vidal and team; Danielle de Cássia Martins da Fonseca; Elizangela Domenis Marino; Alenia Naliato 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, 28 de janeiro de 2020

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: MARINO, Elizangela Domenis

Título: Influência do polimorfismo do gene CSN-2 na produção e características do leite de vacas Holandesas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data:10/09/2021

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Júlio Cezar de Carvalho Balieiro
Instituição: FMVZ/USP

Julgamento_____

Prof. Dr.: Anibal Eugênio Vercesi Filho
Instituição: Instituto de Zootecnia

Julgamento_____

Dr.: Rodrigo Giglioti
Instituição: Instituto de Zootecnia

Julgamento_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Egidio Isaias Marino e Zenilda Domenis Marino, pelo carinho, afeto, dedicação e cuidado que me deram durante toda a minha existência. Sou grata!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, fé, saúde e perseverança para conquistar essa vitória de vida profissional.

Agradeço a minha família por me permitir ter um lar estruturado, unido e com muita felicidade.

Agradeço a minha querida mãe Zenilda Domenis Marino por todo seu amor, empenho e motivação ao me encorajar a seguir meus sonhos. Sem você eu jamais teria coragem de chegar até aqui.

Agradeço ao meu amado pai Egídio Isaias Marino, por me ensinar os valores da vida, disciplina e honestidade. Seus ensinamentos me tornaram a pessoa que sou hoje.

Agradeço ao meu irmão Adilson, minha cunhada Roberta e meu sobrinho Vicente, por cuidarem de meus amados pais e por compreenderem a minha ausência em suas vidas.

Agradeço aos meus amigos que embora distantes sempre enviaram suas boas energias e vibrações para o meu crescimento profissional.

Agradeço aos pós-graduandos Alenia, Danielle, Thaís, José e Vinicius e aos estagiários e a técnica Andréia do Laboratório de Qualidade de Produtos de Origem Animal (Quali-POA), por não medirem esforços em me ajudar durante minha pesquisa.

Agradeço aos professores de disciplinas teóricas durante o mestrado, por contribuírem para o meu crescimento e conhecimento profissional através de seus ensinamentos e experiências.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo e todos os seus funcionários.

Agradeço ao professor Júlio Balieiro por dedicar horas do seu tempo, seu conhecimento e sua experiência, e por me motivar a ser uma profissional melhor todos os dias. Por você tenho muita admiração.

Agradeço a minha orientadora Ana Maria Centola Vidal, por tornar minha caminhada mais leve com seus conselhos maternos e por contribuir com meu crescimento científico com seus conselhos profissionais, fazendo com que eu me apaixonasse ainda mais pela pesquisa e pela docência. Você tem todo o meu respeito.

Agradeço a agencia de fomento FAPESP pela bolsa de mestrado a mim concedida (2019/11585-6) e ao auxílio FAPESP do projeto (2019/09583-5).

Agradeço aos funcionários e colaboradores da Granja leiteira por não medirem esforços em me auxiliar na coleta de dados.

Muito obrigada!

“Ou você diminui seus sonhos ou aumenta suas habilidades. A escolha é sua!”

Jim Rohn

RESUMO

MARINO, E. D. Influência do polimorfismo do gene CSN-2 na produção e características do leite de vacas Holandesas. 2021. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

Este trabalho teve como objetivo identificar possíveis efeitos genotípicos e fenotípicos frequentes em vacas com os alelos A1 e A2 da β -caseína (β -CN) e de avaliar as características de produção, composição e contagem de células somáticas (CCS) do leite proveniente de vacas com os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2. Para a análise genotípica foram utilizadas informações de 1.816 vacas holandesas, durante os anos de 2015 a 2019 e caracterizadas as frequências alélicas (A1 e A2) e genotípicas (A1A1, A1A2 e A2A2), associadas a 1.816 lactações. Também foram relacionados os diferentes genótipos com as seguintes características fenotípicas: Produção de leite total, produção de leite ajustada aos 305 dias, teor de proteína, gordura, lactose, extrato seco total e desengordurado e contagem de células somáticas (CCS) do leite das vacas. Com este estudo foi possível concluir que de acordo com os resultados apresentados para um rebanho de vacas holandesas de alta produção, não houve diferença entre os genótipos para a composição do leite e CCS e ambos os genótipos apresentaram valores de referência dentro dos valores estabelecidos pela instrução normativa N^o76. No entanto, os animais com o genótipo A1A1 demonstraram ter uma maior produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação. Além disso, o rebanho se encontra em Equilíbrio de Hardy-Winberg até o presente momento, indicando que estes animais são responsivos para a seleção genética do alelo A2.

PALAVRA- CHAVE: β -caseína, Genótipo, Fenótipo, Leite A2.

ABSTRACT

MARINO, E. D. Influence of CSN-2 gene polymorphism on milk production and characteristics of Holstein cows. 2021.M.Sc. Dissertation– Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

This work aimed to identify possible genotypic and phenotypic effects occurring in cows with the A1 and A2 alleles of β -casein (β -CN) and to evaluate the characteristics of production, composition and somatic cell count (CCS) of milk from cows with the A1A1, A1A2 and A2A2 genotypes. For the genotypic analysis, information from 1,816 Holstein cows was used, from 2015 to 2019 and characterized as allelic (A1 and A2) and genotypic (A1A1, A1A2 and A2A2) frequencies, associated with 1,816 lactations. The different genotypes with the following phenotypic characteristics were also related: total milk production, milk production adjusted to 305 days, protein, fat, lactose, total dry extract and defatted extract and somatic cell count (CCS). With this study it was possible to conclude that according to the results obtained for a herd of high-yielding Holstein cows, there was no difference between the genotypes for a milk composition and CCS and both genotypes of reference values within the values provided by the instruction Normative No. 76. However, animals with the A1A1 genotype were shown to have a higher milk production adjusted to 305 days of lactation. In addition, the herd is in Hardy-Winberg Equilibrium so far, indicating that these animals are responsive to genetic selection of the A2 allele.

KEYWORD: β -casein, Genotype, Phenotype, Milk A2.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1 Produção de Leite no Brasil e no Mundo	12
1.2 Importância do Consumo do Leite	13
1.3 Composição do leite.....	14
1.4 Leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 (leite A2).....	17
1.5 Genética de população e o Gene CSN-2.....	18
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Análise genotípica das vacas.....	21
3.2 Efeitos dos genótipos em relação aos fenotípicos avaliados	22
3.3 Análises de produção, composição e contagem de células somáticas (CCS) do leite	22
3.4 Análise estatística	22
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	38

INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DO GENE CSN-2 NA PRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS DO LEITE DE VACAS HOLANDESAS

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Produção de Leite no Brasil e no Mundo

Nos últimos 20 anos a produção de leite mundial aumentou, cerca de 62%, um total de 339 milhões de toneladas de leite foi captado ao redor do mundo. Em 2019, a captação de leite foi de 816 milhões de toneladas e considera-se que cada habitante consome em média 116,5 kg de leite ao ano. Os principais países que contribuíram para o aumento da produção de leite nesse período foram a Índia com 23%, Estados Unidos com 11%, Paquistão com 5%, Brasil com 4%, Alemanha com 4%, China 3% e Nova Zelândia com 3% da produção, totalizando em 53% da produção total (EMBRAPA, 2020; EMBRAPA, 2019).

No Brasil, o agronegócio é responsável por $\frac{1}{4}$ de todo o Produto Interno Bruto (PIB) e a cadeia produtiva de leite é um dos principais setores que contribuem para estes resultados, colaborando com a renda de mais de 4 milhões pessoas, gerando empregos diretos ou indiretos, além de ser uma importante alavanca na economia nacional (DE REZENDE, 2018). Em 2019 o país exportou 24,5 milhões de toneladas de laticínios, 6,2% a mais que em 2018, o commodity mais vendido foram o leite fluido e o creme de leite. Quanto a importação, foi comprado 142,2 mil toneladas, 6,9% a menos que o mesmo período de 2018 (CEPEA, 2020)

O país está em 3º lugar no ranking de países que mais produzem leite no mundo, com um aumento de 2,3%, o setor lácteo produziu 25,1 bilhões de litros de leite no ano de 2019, registrando o maior aumento nos últimos dez anos. Diante destes resultados, também houve um aumento no consumo de leite de 1,8%. Os estados que mais contribuíram com estes resultados foram: Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Goiás, apresentando um aumento relevante na captação do leite, com exceção do estado de São Paulo que apresentou uma queda de 1,8% na sua captação, quando comparado com o mesmo período de 2018 (IBGE, 2019; IBGE, 2020).

A queda na produção de leite no estado de São Paulo é justificada pelo aumento do número de produtores rurais que optaram por arrendar suas terras para a produção de cana de açúcar. No entanto, ainda é no estado de São Paulo onde estão as principais propriedades produtoras de leite do Brasil, de acordo com o ranking nacional a Fazenda Colorado em Araras/SP está em 1º lugar no ranking e produziu 80.024 (litros/dia) em 2020, a Fazenda São José em Tapiratiba, ficou com o 4º lugar e produziu 62.454 (litros/dia) em 2020 e a Fazenda Santa Rita/Agrindus em Descalvado ficou em 5º lugar e produziu 61.015 (litros/dia) em 2020 (IEA, 2018; MILK POINT, 2021).

1.2 Importância do Consumo do Leite

Segundo a Sociedade brasileira de alimentação e nutrição (SBAN) (2015) o mundo tem passado por várias mudanças no âmbito alimentar, fatores como o custo dos alimentos, a renda, tradições culturais, fatores socioeconômicos e geográficos podem influenciar diretamente os hábitos alimentares de toda a população. Tombini et al. (2012), citaram que essa transição é qualificada pelo aumento no consumo de gorduras, açúcares e cereais refinados e pela diminuição do consumo de outros nutrientes como carboidratos complexos e alimentos ricos em fibra, o que pode expor a população a vários tipos de doenças crônico-degenerativa quando associada ao sedentarismo.

A alimentação diária deve ter quantidade suficiente para atender o necessário para cada pessoa, deve ser variada, equilibrada e incluir todos os grupos alimentares. Diante disso, uma pirâmide alimentar foi desenvolvida com base em todas as necessidades alimentares e na realidade da população brasileira. Essa pirâmide é composta por 8 grupos e o leite e seus derivados, por ser um produto com alto valor nutricional e essencial para o desenvolvimento humano, ocupa o grupo 4 (SBAN, 2015; TOMBINI et al., 2012).

O leite é um alimento de grande relevância para a alimentação de pessoas de todas as idades, de crianças a idosos. Devido seu alto valor nutricional, o leite é definido como um alimento completo, rico em proteína, vitaminas, lactose, gordura e cálcio (CALLEFE; LANGONI, 2015). Além de sua riqueza de nutrientes, o leite está associado a diversos estudos que comprovam a sua participação na prevenção de

diversas doenças. Dentre essas doenças está a osteoporose e outras fraturas ortopédicas, que de acordo com Matía-Martín et al. (2019), ao relacionar essas doenças com a ingestão de produtos lácteos observaram que o risco de fraturas vertebrais diminuir em consumidores deste produto.

Yun et al. (2020) destacaram que a deficiência nutricional pode prejudicar o metabolismo ósseo e ao estudar exossomos derivados de leite bovinos na dieta de camundongos induzidos por osteoporose, puderam observar que o isolado de colostro de leite bovino pode ser importante na prevenção da osteoporose, na remodelação óssea e na melhora da reabsorção óssea.

Em estudo realizado por Thorning et al. (2016) utilizando dados de meta-análises, onde o objetivo foi relacionar a ingestão de leite e derivados com o risco de obesidade, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, osteoporose, câncer e mortalidade por todas as causas, os autores observaram que o consumo de leite auxilia na perda de peso durante a restrição de energia, além de causar uma melhora na condição corporal, outro fato concluído neste estudo é a não associação do consumo de leite a doenças como diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares. O risco de câncer também não foi relacionado ao consumo de leite.

1.3 Composição do leite

De acordo com Klein (2014) os mamíferos secretam leite através de glândulas mamárias durante a fase de lactação para que a sua prole seja nutrida na primeira fase de sua vida. Em bovinos, as glândulas mamárias ficam localizadas no úbere, elas são compostas por dois diferentes tecidos, um deles é o parênquima glandular, responsável pela secreção do leite e formado por células epiteliais secretoras que formam os alvéolos mamários e se prolongam desde os pequenos ductos até a cisterna e o outro é o estroma glandular, formado por tecido conjuntivo e responsável por armazenar as células mioepiteliais, fibras reticulares e capilares sanguíneas (BRAGULLA; KÖNIG, 2004; FEITOSA, 2008).

O leite possui em sua composição, sólidos e água, onde 12,5% do leite é o chamado extrato seco total (EST) diluindo em 87,5% de água. O EST é composto por proteínas, gordura, lactose, vitaminas e minerais que juntamente com a água se torna um produto completo e nutritivo. Os componentes do leite tendem a

permanecer sempre em equilíbrio, no entanto, alguns fatores como fase de lactação, raça, alimentação, temperatura, intervalo entre ordenhas e até mesmo algumas patologias como a mastite, podem interferir e alterar a composição do leite (YÜKSEL; ERDEM, 2010; REZENDE et al., 2015; LEIRA et al., 2018).

De acordo com a instrução normativa Nº 76 o leite deve apresentar um teor mínimo de proteína total de 2,9/100g (BRASIL, 2018). A proteína do leite é o componente de maior importância para a indústria, além de ser responsável por disponibilizar micronutrientes essenciais para a nutrição animal e humana, como cálcio, fósforo, aminoácidos, imunoglobulinas e lactoferrina (LIVNEY, 2010). Ela é dividida em caseínas (80%) e proteínas do soro do leite (20%), dentre as proteínas do soro do leite há a α -lactalbumina e β -lactoglobulina (HOLT, 2016).

As caseínas estão arranjadas na forma de micelas, são hidratadas e porosas e compostas por água, cálcio e outros minerais, além das próprias moléculas de caseína que se dividem em: α -s₁, α -s₂, β -caseínas (encontradas em maior quantidade no leite) e kappa-caseínas, estes componentes são constituídos por 199, 207, 209 e 169 aminoácidos, respectivamente, e ao se unirem formam uma estrutura rígida que impede sua destruição. Sua principal função é disponibilizar estes aminoácidos e realizar o transporte de cálcio para o organismo (DALGLEISH; CORREDIG, 2012; HOLT et al., 2013; HOLLAND, BOLAND, 2014; BRASIL, 2015).

Esta importante proteína possui em sua estrutura regiões hidrofóbicas que é o caso das α _{s1}, α _{s2}, β -caseínas (β -CN) e regiões hidrofílicas que é o caso das kappa-caseínas, isso a torna capaz de realizar atividade anfipática, vale ressaltar que quando a parte hidrofóbica é exposta e entra em contato com a água presente no leite, a micela de caseína se torna insolúvel (DE KRUIF; GRINBERG, 2002; HOLLAND; BOLAND, 2014). Ainda, uma informação de extrema importância é o fato de a β -CN possuir 13 variantes genéticas, A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G, as quais A1 e A2 são as variantes mais comuns (KAMINSKI et al., 2007).

A β -lactoglobulina representa 50% de todos os compostos presentes no soro do leite, é uma molécula composta por 162 aminoácidos ligados por cadeia simples de peptídeos. A α -lactalbumina é uma molécula de 123 aminoácidos e representa 13% das proteínas do soro do leite, e se destaca por ser a única proteína com potencial de se ligar ao cálcio e ao zinco o que facilita a absorção destes minerais. Composta por aminoácidos essenciais, também pode facilitar a absorção de

vitaminas hidrossolúveis, pois tem em sua composição o aminoácido niacina, responsável por esta absorção (KRISSENS, 2007; RENHE, 2008).

Para a gordura do leite o teor mínimo deve corresponder a 3,0g/100g, de acordo com a Instrução Normativa Nº 76 (BRASIL, 2018). A gordura do leite apresenta a forma de gotículas, estas gotículas também podem ser chamadas de glóbulo de gordura. O glóbulo de gordura do leite é dividido em interior e membrana e cada parte tem seus próprios componentes. A membrana do glóbulo de gordura possui em sua composição proteínas, fosfolipídios, cerebrosídeos, colesterol e traços de enzimas, enquanto o interior do glóbulo de gordura é composto por triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol, carotenoides e vitaminas lipossolúveis (ORDÓÑEZ et al., 2005; MÉNARD et al., 2010).

Ainda, conforme estabelecido pela Instrução Normativa Nº 76, para que o leite seja considerado dentro dos padrões, o teor mínimo de lactose deve ser de 4,3g/100g (BRASIL, 2018). A lactose é um carboidrato que sofre hidrólise através da ação de enzimas no intestino, hidrolisando a lactose em duas moléculas distintas, a glicose e a galactose, onde uma é absorvida pelo próprio intestino e a outra é metabolizada pelo fígado, respectivamente. Vale ressaltar que a galactose ao ser metabolizada pelo fígado é convertida em glicose e também se torna disponível para o organismo, fazendo com que ele consiga exercer sua função vital (MATTAR; MAZO, 2010; CZARNOBAY et al., 2017).

Fazendo parte dos sólidos não gordurosos, o leite tem em sua composição os sais minerais, com aproximadamente 0,7%, dentre eles o potássio, cálcio, fosfatos, citratos, cloretos, sulfatos e magnésio e a sua função é importante para a homeostasia do corpo humano e para a formação do sistema ósseo. Já as vitaminas do leite são as lipossolúveis A, D, E e K e as hidrossolúveis B1, B6, B12, niacina e ácido pantotênico, elas são transportadas pela gordura e são responsáveis pelo metabolismo celular e facilitam reações químicas para a absorção de nutrientes (FEITOSA, 2008; FAO, 2021).

Quanto à contagem de células somáticas do leite (CCS), de acordo com a Instrução Normativa Nº 76 (BRASIL, 2018), o leite cru refrigerado de tanque individual ou comunitário deve apresentar no máximo 500mil céls./mL. A CCS é uma importante ferramenta no monitoramento da qualidade do leite e na saúde da glândula mamária e a sua observação dentro do rebanho pode identificar a

ocorrência de mastite subclínica, uma patologia de extrema importância na produção de leite responsável por grandes perdas econômicas (SANTOS; FONSECA, 2019).

1.4 Leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 (leite A2)

O leite proveniente de vacas apenas com alelo A2 é considerado hoje um nicho de mercado, ele surgiu em meados dos anos 2000 na Nova Zelândia, desde então, acredita-se que este leite tem maiores benefícios para a saúde humana que permeiam desde uma melhor digestibilidade até a melhora no comportamento de crianças com TEA (transtorno do espectro do autismo) e pessoas com esquizofrenia, quando comparado ao leite proveniente de vacas com alelo A1 e A2 (SUN; CADE, 1999). Acredita-se que um polimorfismo no gene que produz a β -CN ocorreu a cerca de 5.000 a 10.000 milhões de anos atrás e que antes disso todos os bovinos eram portadores apenas do alelo A2 (ÇALDAK, 2005; WOODFORD, 2007).

A diferença entre o leite proveniente de vacas apenas com alelo A2 do leite proveniente do alelo A1 e A2 ocorre a nível genético, mais precisamente no éxon 7 do cromossomo 6 do bovino, onde o gene CSN-2, responsável pela produção de β -CN no organismo de todo mamífero está localizado e possui dentre as 13 variantes de alelos, o alelo A1 e o alelo A2. Ainda na fita de DNA ocorre um polimorfismo no códon 67, onde o alelo A2, tem a sequência de nucleotídeos formado por CCT(citosina, citosina e timina) e o alelo A1, tem a sequência de nucleotídeos formados por CAT(citosina, alanina e timina), fazendo com que no momento da transcrição para o RNAm e posteriormente a tradução para a cadeia de aminoácidos da B-CN, produza aminoácidos diferentes, no alelo A2 forma-se a prolina, enquanto no alelo A1 forma-se a histidina (ELLIOTT et al., 1999; MCLACHLAN, 2001; TRUSWELL, 2005; SULIMOVA et al., 2007; WOODFORD, 2007; KAMINSKI et al., 2007; NCBI, 2021).

Enquanto a variante A1 apresenta a ligação peptídica entre histidina e isoleucina (His-Ille), a variante A2 apresenta uma ligação peptídica entre prolina e isoleucina (Pro-Ille). Essa diferença estrutural é foco de recentes pesquisas (ASLEDOTTIR et al., 2018; NGUYEN et al., 2018), pois pode exercer influência sobre as propriedades físico-químicas e microestruturais do leite (ELLIOTT et al., 1999; MCLACHLAN, 2001; NGUYEN et al., 2018) e, também, porque as proteases

intestinais atuam mais fortemente na ligação His-Ille, resultando no aparecimento da β -casomorfina-7 (BCM-7) (JINSMAA; YOSHIKAWA, 1999; DE NONI; CATTANEO, 2010; ASLEDOTTIR et al., 2018).

As β -casomorfinas (BCMs) são um grupo de peptídeos bioativos com propriedades opióides (DE NONI; CATTANEO, 2010) e apresentam estruturas semelhantes, com uma sequência de 4 a 11 aminoácidos (KAMINSKI et al., 2007) e a mesma sequência para os três primeiros aminoácidos: tirosina, prolina e fenilalanina (MUEHLENKAMP; WARTHESEN, 1996). A sequência de aminoácidos da BCM-7 corresponde às posições 60 a 66 da cadeia da β -CN (TIROSINA, PROLINA, FENILALANINA, PROLINA, GLICINA, PROLINA, ISOLEUCINA).

A BCM-7 é produzida, até quatro vezes mais, no leite com a variante A1 da β -CN (HARTWIG et al., 1997; JINSMAA; YOSHIKAWA, 1999; KAMINSKI et al., 2007) e segundo Elliott et al. e Sun; Cade (1999); Thorsdottir et al. (2000); Mclachlan (2001); Birgisdottir et al. (2002); Laugesen et al. e Sun et al. (2003); Cieslinska et al. (2007 e 2012); e Barbosa et al. (2019), ela pode aumentar o risco de doenças crônicas, doença cardíaca isquêmica humana, arteriosclerose, diabetes tipo 1, síndrome da morte súbita do lactente e desconfortos no sistema gastrointestinal. Este peptídeo bioativo é absorvido por regiões cerebrais relevantes para a esquizofrenia e o autismo (SUN; CADE, 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).

1.5 Genética de população e o Gene CSN-2

No Brasil a atividade leiteira faz parte de mais de 1,3 milhões de propriedades e é considerada uma das mais importantes fontes de renda da agropecuária. Nesse seguimento da pecuária brasileira, existem diversas ferramentas que contribuem para tornar a produção mais eficiente, uma delas é o melhoramento genético, um método que segundo pesquisas está ligado diretamente com fatores produtivos e não produtivos dos animais (IBGE, 2019; LAMB et al., 1977). Segundo a ABCBRH (Associação brasileira de criadores de bovinos da raça Holandesa) (2021), a raça

Holandesa é considerada altamente especializada na produção de leite em todo o mundo, e no Brasil ela vem sendo muito utilizada desde o período de 1530-1535.

Criadores de gado Holandês de todo o país veem buscando alternativas para agregar valor ao seu produto, e uma alternativa que vem sendo cada vez mais aderida pelas propriedades rurais é a genotipagem do gene CSN-2 nos rebanhos. Dentre as 13 variantes descritas na literatura para o gene responsável pela produção da β -CN, os alelos A1 e A2 são as mais comuns e vem sendo pauta de estudos recentes. A frequência destes alelos no rebanho pode variar a depender de vários fatores, principalmente a raça dos animais e a frequência genotípica dos animais está ligada a características de produção, como a produção total de leite (HANUSOVÁ et al., 2010; KUMAR et al., 2019).

O gene CSN-2 foi associado a características de desempenho do leite, acredita-se que o polimorfismo que ocorreu no exon 7 dando origem ao alelo A1 pode alterar características de produção e rendimento do leite, tais como: Aumento do rendimento do leite e teor de proteína e diminuição do teor de gordura, para os alelos A1 e A2, respectivamente. O cromossomo 6, onde fica localizado o gene CSN-2 foi associado com fatores que afetam as características como produção de leite e teor de proteína em animais da raça Holandesas (VELMALA et al., 1995; IKONEN et al., 1999; ZHANG et al., 1998).

Segundo Swan; Kinghorn (1992), o cruzamento do gado Holandês não era muito comum em climas tropicais, pois acreditava-se que esta raça já tinha um alto potencial de produção de leite. No entanto, sabe-se que o cruzamento entre raças pode melhorar alguns aspectos da produção e também tornar os animais mais resistente a doenças, diante disso, foram implantados sistemas que tinham como objetivo avaliar o potencial genético de doadores dentro de uma população de gado Holandês, verificando os possíveis genes que poderiam contribuir de forma positiva algumas características produtivas.

O cruzamento entre raças é utilizado para se obter uma maior vantagem quanto a heterose entre os animais, assim, é possível que ocorra a combinação de características desejáveis de várias raças. Na genética básica para se observar os efeitos de cruzamentos entre os animais deve se levar em consideração dois principais elementos: o efeito aditivo e o efeito não aditivo (EUCLIDES FILHO, 1996; SWAN; KINGHORN, 1992).

O efeito aditivo entende-se que é aquele que atribui o mérito genético médio das raças que estão envolvidas no cruzamento, já o efeito genético não aditivo (dominância) é a diferença entre a média das características que estão sendo avaliadas, ou seja, os fenótipos das raças que estão envolvidas no cruzamento. O efeito genético não aditivo é conhecido também como heterose que atribui fatores genéticos a interação entre os locus ou dentro dos locus de um gene, epistasia e dominância, respectivamente (SWAN; KINGHORN, 1992; FALCONER; MACKEY, 1996).

De acordo com Pereira (2008), a genética aditiva tem a capacidade de aumentar o valor da característica fenotípica (composição do leite) de cada indivíduo através de cada gene presente em um genótipo. Quando um gene é somado, subtraído ou alterado por outro gene, ele altera a característica fenotípica.

A dominância é um efeito genético não aditivo, um tipo de interação entre os alelos de uma mesma série. Nesta situação, para a genética indivíduos homozigotos e heretozigotos se misturam a nível de característica fenotípica quando ocorre a dominância (PEREIRA, 2008). A dominância (heterose) é consequência do aumento da heterozigose em animais utilizados em cruzamentos, técnica utilizada para fins economicos e de produção (FALCONER; MACKAY, 1996; EUCLIDES FILHO, 1997).

A genética das populações é utilizada para estudar as frequências alélicas e genotípicas dentro de uma população, além de observar o estudo de várias forças que são capazes de alterar essas frequências ao longo de gerações no mesmo tempo e espaço (BEIGUELMAN, 2008), sendo importante para vários estudos científicos, tanto em plantas quanto em seres humanos e animais podendo esclarecer dúvidas quanto a doenças hereditárias, mapeamento genético e identificação de genes (HARTL et al., 2010).

Para estimá-la, Wilhelm Weinberg e Godfrey Harold Hardy em 1908 desenvolveram a teoria de Hardy-Winberg trabalhando de formas independentes, porém simultâneas. A teoria de Hardy-Winberg é utilizada na genética de populações para indicar a frequência de cada alelo dentro de uma população, além disso, é possível observar a frequência de indivíduos homozigotos e heterozigotos (frequência genotípica) (OSÓRIO, 2013).

A frequência alélica é quem inicia a fase de produção de gametas, os genes ao serem transmitidos separam os genótipos do pai e da mãe, assim, são formados

os gametas que são responsáveis por transportar os alelos de cada um, permitindo a formação de uma nova geração (SALMAN, 2007; BEIGUELMAN, 2008). Para que isso ocorra são necessárias 3 etapas. A 1^o é a geração paterna e a formação dos gametas, 2^o é a união dos gametas e as frequências dos genótipos nos zigotos produzidos e a 3^o é os genótipos dos zigotos e a frequência alélica na progênie (LOPES, 2005). Para delinear os componentes genéticos em um grupo de indivíduos, é necessário identificar o quanto há de cada genótipo e de cada alelo dentro da população.

Segundo Salman (2008) frequência genotípica de uma determinada população é a intensidade que um genótipo ocorre em relação aos demais. Alguns fatores são exigidos para que seja possível observar a frequência genotípica dentro da população, como: os alelos e o loci presente, os genótipos de seus pais e a efetividade tanto dos gametas quanto dos genótipos.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo identificar possíveis efeitos genotípicos e fenotípicos frequentes em vacas com os alelos A1 e A2 da β -CN e de avaliar as características de produção, composição e contagem de células somáticas (CCS) do leite proveniente de vacas com os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As informações zootécnicas utilizadas neste estudo, foram obtidas do rebanho de uma granja leiteira, localizada no estado de São Paulo, que atualmente conta com um total de 4.341 animais da raça Holandesa em toda a propriedade, sendo 1.718 vacas em lactação ordenhadas diariamente, com média de produção de 35 litros/vaca/dia, obtidos em 3 ordenhas diárias que produzem aproximadamente 50 mil litros de leite por dia.

3.1 Análise genotípica das vacas

Para a análise genotípica, foram utilizadas informações genotípicas de 1.816 vacas, durante os anos de 2015 a 2019, extraídas do programa Clarifide Zoetis® e

disponibilizada pela granja leiteira. Foram caracterizadas as frequências alélicas (A1 e A2) e genóticas (A1A1, A1A2 e A2A2) da β -caseína nas vacas do rebanho de acordo com Falconer (1987).

3.2 Efeitos dos genótipos em relação aos fenotípicos avaliados

Para observar a relação entre os diferentes genótipos e fenótipos das vacas do rebanho da granja leiteira, foram utilizadas informações associadas às 1.816 lactações. As características fenotípicas utilizadas neste estudo foram a produção de leite total (1.816 informações), produção de leite ajustada aos 305 dias (1.816 informações), teor de proteína, gordura, lactose, extrato seco total e desengordurado e contagem de células somáticas (1.556 informações) do leite destas vacas.

3.3 Análises de produção, composição e contagem de células somáticas (CCS) do leite

Para as análises de composição e produção tais como a produção de leite total, produção de leite ajustada aos 305 dias, teor de proteína, teor de gordura, teor de lactose, extrato seco total e desengordurado e contagem de células somáticas do leite, utilizou-se os resultados das análises realizadas mensalmente pela clínica do leite (ESALQ/USP). O equipamento utilizado para a determinação de teor de proteína, teor de gordura, teor de lactose, extrato seco total e desengordurado foi o infravermelho e para a determinação de CCS foi utilizado o aparelho de citometria de fluxo.

3.4 Análise estatística

Os dados de produção de leite total, produção de leite ajustada aos 305 dias, teor de gordura, proteína, lactose, extrato seco total, extrato seco desengordurado e contagem de células somáticas (logaritmo de base 10) do leite, foram analisados como variáveis dependentes. Os resultados foram expressos em termos de médias dos genótipos (e respectivos erros padrão), e cálculo dos efeitos aditivos (contraste entre os homozigotos), desvios de dominância (contraste entre os heterozigotos em relação aos homozigotos) e efeito de substituição gênica (regressão linear do

número de alelos A2 em cada indivíduo). Todas as análises foram realizadas com o auxílio do procedimento MIXED do programa computacional *Statistical Analysis System*® (SAS, 2001), adotando-se os níveis de significância de p-valor de 5% ($p \leq 0,05$) e de 1% ($p \leq 0,01$).

Foi utilizado o modelo linear de efeitos mistos em que considerou-se como efeitos fixos de ano-estação de parto, número de lactação, combinação genotípica do animal (grau de sangue) e genótipos (A1A1, A1A2, A2A2), bem como o efeito aleatório de reprodutor e erro. Nestas análises foram adotadas estruturas de medidas repetidas nos animais, uma vez que alguns animais exibiram mais que uma lactação. O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijklmn} = \mu + AE_i + N_j + C_k + G_l + R_m + e_{ijklmn}$$

em que,

Y_{ijklm} = é o valor observado para a característica fenotípica em questão;

μ = média geral;

AE_i = efeito fixo de ano-estação de parto i , sendo $i = 1$ (2015-verão), 2 (2015-outono), ..., 20 (2019-primavera);

N_j = efeito fixo de número de lactação k , sendo $k = 1, 2, 3, 4, 5, 6$;

C_k = efeito fixo de combinação genotípica k , sendo $j = 1$ (GC) e 2 (PO);

G_l = efeito fixo de genótipo i , sendo $i = 1$ (A1A1), 2 (A1A2) e 3 (A2A2);

R_m = efeito aleatório do Reprodutor m , com média 0 e σ^2_R ;

e_{ijklmn} = efeito aleatório associado a cada observação, com média 0 e σ^2_e .

4. RESULTADOS

As análises das frequências genotípicas referentes aos genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 e das frequências alélicas A1 e A2 da β -caseína, foram realizadas a partir de 1.816 de vacas da raça Holandesa, do rebanho da granja leiteira estudada, extraídos do programa Clarifide Zoetis® como apresentadas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Frequência genotípica na população e número total de vacas Holandesas, observadas entre os anos de 2015-2019.

Frequência	Genótipos			Número de Vacas
	A1A1	A1A2	A2A2	
Absoluta ¹	391	863	562	1.816
Relativa (%)	0,2051	0,4956	0,2993	1

Fonte: Própria autoria.

¹Unidade animal.

Tabela 2: Frequência alélica, dos alelos A1 e A2 em vacas Holandesas, observadas entre os anos de 2015-2019.

Frequência	Alelos		Total
	Freq(A1)	Freq(A2)	
Relativa (%)	0,4529	0,5471	1

Fonte: Própria autoria.

No rebanho estudado, a frequência na população para o genótipo A1A1 foi de 0,2051% (391 vacas), para o genótipo A1A2 de 0,4956% (863 vacas) e para o genótipo A2A2 foi de 0,2993% (562 vacas), indicando que a maioria das vacas do rebanho estudado, encontram-se amplamente distribuídas nos genótipos A1A2.

Quanto à frequência alélica, os resultados demonstram uma situação em que o alelo A1 apresentou 0,4529%, enquanto o alelo A2 apresentou 0,5471% de frequência no rebanho, totalizando 100% do rebanho, indicando que o alelo A2 encontra-se em maior frequência no rebanho estudado.

As médias relacionadas às características de produção, de composição e CCS do leite de vacas Holandesa do rebanho da granja leiteira estudada, estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Estimativa das médias (MED), mínimo (MIN) e máximo (MÁX) relacionadas às características de produção, de composição e CCS do leite de vacas da raça Holandesa, observadas entre os anos de 2015-2019.

Características	Nº de vacas	MED	MIN	MÁX
PRTOTAL(Kg) ¹	1.816	13.660,11	5.520,27	37.638,30
PL305 (kg) ²	1.816	11.021,49	6.092,00	17.380,00
GOR (%) ³	1.556	3,64	1,95	6,51
PROT (%) ⁴	1.556	3,06	2,33	3,94
LACT (%) ⁵	1.556	4,66	2,81	5,37
EST (%) ⁶	1.556	12,35	9,97	15,42
ESD (%) ⁷	1.556	8,70	7,41	9,71
CCS (log céls. /mL) ⁸	1.556	1,91	0,92	3,69

Fonte: Própria autoria.

¹Produção de leite total; ²Produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação; ³Teor de gordura do leite; ⁴Teor de proteína do leite; ⁵Teor de lactose do leite; ⁶Teor de extrato seco total do leite; ⁷Teor de extrato seco desengordurado do leite; ⁸Logaritmo da contagem de células somáticas/mL de leite.

O número de vacas é referente ao número de observações utilizadas na base limpa.

Os resultados demonstram que as vacas do rebanho estudado têm um volume de produção total e produção ajustada aos 305 dias de lactação característicos dos rebanhos comerciais brasileiros de alta produção. Os teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco total e extrato seco desengordurado e CCS apresentaram-se dentro do que se considera normal para a composição do leite de acordo com o estabelecido pela instrução normativa N°76 (BRASIL, 2018).

Os resultados relacionados aos três diferentes genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) em relação aos fenótipos (produção de leite total, produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação, teor de gordura, proteína, lactose, extrato seco total, extrato seco desengordurado e CCS do leite) de vacas do rebanho da granja leiteira estudada, estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Estimativas Médias (MED) e erro padrão da média (EPM) dos três diferentes genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) para o gene CSN-2 comparados com as características fenotípicas de um rebanho leiteiro comercial, entre os anos de 2015-2019.

Características	A1A1		A1A2		A2A2		P-valor
	MED	EPM	MED	EPM	MED	EPM	
PRTOTAL(Kg) ¹	13.805	372,72	14.269	347,91	14.435	367,71	0,0639
PL305 (kg) ²	11.260 ^a	160,55	10.966 ^b	149,10	10.995 ^{ab}	158,15	0,0183
GOR (%) ³	3,55	0,06	3,47	0,05	3,50	0,05	0,1522
PROT (%) ⁴	3,06	0,02	3,07	0,02	3,08	0,02	0,2909
LACT (%) ⁵	4,57	0,02	4,55	0,01	4,56	0,01	0,1396
EST (%) ⁶	12,17	0,07	12,09	0,07	12,13	0,07	0,1539
ESD (%) ⁷	8,61	0,03	8,61	0,03	8,63	0,03	0,4804
CCS (log céls./mL) ⁸	2,26	0,05	2,19	0,05	2,23	0,05	0,1449

Fonte: Própria autoria.

EPM: Erro padrão da média.

MED: Média

¹Produção de leite total; ²Produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação; ³Teor de gordura do leite; ⁴Teor de proteína do leite; ⁵Teor de lactose do leite; ⁶Teor de extrato seco total do leite; ⁷Teor de extrato seco desengordurado do leite; ⁸Logaritmo da contagem de células somáticas/mL de leite. Na mesma linha as letras, letras diferentes (^a e ^b) diferem-se estatisticamente entre si e letras iguais (^a e ^a) não diferem estatisticamente entre si. O ^{ab} representa as maiores médias ao nível de significância menor ou igual a 5% (p < 0,05).

Para a produção de leite total, teor de gordura, teor de proteína, teor de lactose, extrato seco total, extrato seco desengordurado e CCS, de acordo com os resultados do teste de média, não houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), entre os três diferentes genótipos.

Para a produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação, de acordo com os resultados de teste de média, houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), entre o genótipo A1A1 (11.260 kg), A1A2 (10.966 kg) e A2A2 (10.995 kg), onde o A1A2 apresentou uma menor produção ajustada aos 305 dias de lactação. Quanto ao genótipo A2A2 não demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação aos outros 2 genótipos.

O efeito aditivo do alelo A1 sobre o alelo A2 para o gene da β -caseína, em relação às características de produção, de composição e de CCS do leite de vacas do rebanho da granja leiteira estudada, estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Estimativa do efeito aditivo do alelo A1 sobre o alelo A2 para o CSN-2, em relação às características de produção, de composição e CCS do leite de vacas, entre os anos de 2015-2019.

Características	Efeito Aditivo	EPM	t-Valor	P-Valor
PRTOTAL(Kg) ¹	629,90	274,51	2,29	0,0219
PL305 (kg) ²	-265,06	118,98	-2,23	0,0260
GOR (%) ³	-0,04	0,04	-1,08	0,2821
PROT (%) ⁴	0,02	0,01	1,57	0,1163
LACT (%) ⁵	-0,01	0,01	-1,00	0,3183
EST (%) ⁶	-0,03	0,05	-0,68	0,4967
ESD (%) ⁷	0,01	0,02	0,66	0,5118
CCS (log céls./mL) ⁸	-0,03	0,04	-0,73	0,4646

Fonte: Própria autoria.

EPM: Erro padrão da média.

¹Produção de leite total; ²Produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação; ³Teor de gordura do leite; ⁴Teor de proteína do leite; ⁵Teor de lactose do leite; ⁶Teor de extrato seco total do leite; ⁷Teor de extrato seco desengordurado do leite; ⁸Logaritmo da contagem de células somáticas/mL de leite. Nível de significância menor ou igual a 5% ($p < 0,05$).

Para teor de gordura, teor de proteína, teor de lactose, extrato seco total, extrato seco desengordurado e CCS de acordo com os resultados apresentados na tabela 5, não houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), entre o alelo A1 e A2.

Para produção total e para produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação de acordo com os resultados apresentados na tabela 5, houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), entre o alelo A1 sobre o A2, onde ao se adicionar o alelo A1 no rebanho, os animais demonstrariam melhores resultados para estas duas características de produção.

O efeito associado ao desvio de dominância para o gene da β -caseína em relação às características de produção, de composição e CCS do leite de vacas do rebanho da granja leiteira estudada, estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Estimativa do efeito associado ao desvio de dominância para o gene CSN-2, em relação às características de produção, de composição e CCS do leite de vacas, entre os anos de 2015-2019.

Características	Desvios de Dominância	EPM	t-Valor	P-Valor
PRTOTAL(Kg) ¹	149,42	194,72	0,77	0,4430
PL305 (kg) ²	-162,29	81,61	-1,99	0,0469
GOR (%) ³	-0,05	0,02	-1,74	0,0821
PROT (%) ⁴	0,00	0,01	0,23	0,8145
LACT (%) ⁵	-0,01	0,00	-1,83	0,0680
EST (%) ⁶	-0,06	0,03	-1,88	0,0599
ESD (%) ⁷	-0,01	0,01	-0,93	0,3522
CCS (log céls./mL) ⁸	-0,05	0,02	-1,90	0,0573

Fonte: Própria autoria.

EPM: Erro padrão da média.

¹Produção de leite total; ²Produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação; ³Teor de gordura do leite; ⁴Teor de proteína do leite; ⁵Teor de lactose do leite; ⁶Teor de extrato seco total do leite; ⁷Teor de extrato seco desengordurado do leite; ⁸Logaritmo da contagem de células somáticas/mL de leite. Nível de significância menor ou igual a 5% ($p < 0,05$).

Para a produção total, teor de gordura, teor de proteína, teor de lactose, extrato seco total, extrato seco desengordurado e CCS não houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), entre as vacas homozigotas e as vacas heterozigotas.

Para a produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação, houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), entre os homozigotos e heterozigotos onde as vacas heterozigotas apresentam uma maior produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação, quando comparadas com as vacas homozigotas para este rebanho estudado.

O efeito de substituição gênica para o gene da β -caseína em relação às características de produção, de composição e CCS do leite de vacas do rebanho da granja leiteira estudada, estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Estimativas dos efeitos da substituição gênica do alelo A1 sobre o alelo A2 para o gene CSN-2, em relação às características de produção, de composição e CCS do leite de vacas, entre os anos de 2015-2019.

Características	Efeito de Substituição Gênica	EPM	t-valor	P-Valor
PRTOTAL(Kg) ¹	302,26	136,24	2,22	0,0266
PL305 (kg) ²	-119,36	59,20	-2,02	0,0439
GOR (%) ³	-0,01	0,02	-0,86	0,3888
PROT (%) ⁴	0,01	0,00	1,56	0,1202
LACT (%) ⁵	-0,00	0,00	-0,77	0,4402
EST (%) ⁶	-0,01	0,02	-0,45	0,6529
ESD (%) ⁷	0,00	0,01	0,78	0,4370
CCS (log céls./mL) ⁸	-0,01	0,02	-0,50	0,6168

Fonte: Própria autoria.

EPM: Erro padrão da média.

¹Produção de leite total; ²Produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação; ³Teor de gordura do leite; ⁴Teor de proteína do leite; ⁵Teor de lactose do leite; ⁶Teor de extrato seco total do leite; ⁷Teor de extrato seco desengordurado do leite; ⁸Logaritmo da contagem de células somáticas/mL de leite. Nível de significância menor ou igual a 5% ($p < 0,05$).

Para o teor de gordura, teor de proteína, teor de lactose, extrato seco total, extrato seco desengordurado e CCS de acordo com os resultados apresentados na tabela acima, não houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), entre o alelo A1 sobre o alelo A2.

Para produção total e produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação de acordo com os resultados apresentados na tabela 7, houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), entre o alelo A1 sobre o alelo A2, onde ao se adicionar o alelo A1 no rebanho, a produção total e ajustada aos 305 dias de lactação, aumentam.

5. DISCUSSÃO

As frequências alélica e genotípica do gene CSN-2 foram estudados por Rahimi et al. (2015) em 131 bovinos nativos do Irã, onde observaram que a frequência alélica do A1 e A2 foi de 38, 2% e 61,8%, respectivamente e que a

frequência dos genótipos foram de 16,8% para A1A1, 42,7% para A1A2 e 40,5% para A2A2. Estes resultados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo (tabela 1 e 2).

Os autores consideraram uma porcentagem alta para o alelo A1 no rebanho da região estudada e destacaram a necessidade de estudos mais amplos em rebanhos de outras regiões da Àsia para melhores conclusões. No entanto, a frequência do alelo A1 apresentou-se com valor muito próximo ao encontrado no presente estudo, além disso, de acordo com as demais literaturas consultadas, esta frequência também é semelhante e não é considerada elevada.

Heck et al. (2009) encontraram os seguintes resultados em um rebanho de vacas Holandesas: em 1989 o alelo A1 representava 0,462%, enquanto o alelo A2 apresentavam 0,498% do rebanho; em 2005, utilizando 1.912 vacas de 398 diferentes rebanhos a frequência do alelo A2 foi de 0,692%, enquanto o alelo A1 representava 0,285% da população. Os autores ressaltam que na Holanda não houve programa de melhoramento genético que selecionasse as variantes das proteínas e que essas mudanças no percentual das frequências alélicas poderiam ter ocorrido por desvio aleatório.

Muito embora o presente estudo tenha sido realizado em um rebanho onde já ocorra o melhoramento genético e a seleção do alelo A2 na população com o objetivo de produzir leite proveniente de vacas com o genótipo A2A2, os resultados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo (tabelas 1 e 2).

A seleção ao acaso dos animais em um rebanho distribui os genes de forma aleatória dentro de uma população, está evolução acontece com o tempo, e não é possível controlar, tudo dependerá de quais animais estão sendo utilizados para se reproduzir dentro do rebanho e os seus genes, isso fará com que a frequência alélica e genotípica seja alterada. Neste caso, a distribuição do gene foi favorável para o alelo A2, este pode ser o motivo pelo qual os resultados são semelhantes.

Chessa et al. (2013), observaram a frequência alélica de rebanhos Holandeses em dois diferentes anos (2003 e 2012) com um total de 100 vacas. Dentre os genes da proteína do leite avaliados, o CSN-2 apresentou 0,392% (A1), 0,533% (A2), 0,005% (A3), 0% (I) e 0,070% (B) referente ao ano de 2003 e 0,395% (A1), 0,530% (A2), 0% (A3), 0,035% (B) e 0,040% (I) em 2012.

Em discussão os autores destacam que a seleção gênica pode afetar fortemente o polimorfismo dos genes da proteína do leite e que a mudança na frequência das variantes também pode alterar a composição do leite interferindo em suas propriedades. De acordo com a literatura consultada, acredita-se que tanto a seleção genética quanto a evolução das espécies e acasalamento ao acaso, sejam responsáveis pelo polimorfismo do gene CSN-2.

Keating et al. (2008), ao estudarem 42 animais das raças: Holstein-Friesian de alto mérito genético, Holstein-Friesian de baixo mérito genético, Irish-Friesian, Dutch-Friesian, Limousin, Montbeliarde, Charolez, Normande, Norwegian Red e Kerry, observaram uma frequência genotípica de 21,4%, 47,60% e 30,90% para os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2, respectivamente.

Daí et al. (2016) ao realizarem estudo para analisar o polimorfismo do gene CSN-2 em 133 vacas Holandesas escolhidas ao acaso dentro de apenas uma propriedade na China, verificaram que dentre todas as variantes da β -CN identificadas os alelos A1 e A2 apresentaram a frequência de 0,432% e 0,453%, respectivamente. Quanto a frequência genotípica os resultados foram de 0,203% (A1A1), 0,353 (A1A2) e 0,226 (A2A2). Para as outras variantes alélicas os resultados foram de 0,060%, 0,045% e 0,004% nos alelos B, I e A3, respectivamente e 0,068% (A1B), 0,060% (A2I), 0,052% (A2B), 0,030% (A1I) e 0,007% (A1A3) para as frequências genotípicas demonstrando assim que as variantes A1 e A2 continuam sendo as mais comuns e que o genótipo A1A2 se demonstra em maior frequência na população.

Massella et al. (2017) realizaram um estudo na Itália com 1.230 animais (1.226 holandesas e 4 Braunvieh) e chegaram aos seguintes resultados: a frequência do alelo A2 se apresentou com maior percentual de 0,546% e o alelo A1 apresentou uma frequência de 0,371%. Para os genótipos, o estudo revelou uma frequência de 0,139%(A1A1), 0,400(A1A2) e 0,301(A2A2), indicando que o genótipo A1A2 também está em maior frequência neste rebanho.

Oleński et al. (2012) destacam que o gene CSN-2 é utilizado como marcador de determinadas características para a produção de leite, pois dentro do gene, ocorrem mutações que podem contribuir na variação de produção. Diante disso, realizaram um estudo com 650 touros da raça Holandesa entre os anos de 1997 e 2003 escolhidos ao acaso, onde buscaram verificar os efeitos de diferentes SNPs

(Single Nucleotide Polymorphism) relacionados a características de produção, ainda, observaram os efeitos dos diferentes genótipos sobre as características de produção em animais da raça Holandesa e ao observar a frequência alélica dos animais entre os anos de 1996 e 2003, verificaram que o alelo A1 obtivera 0,33% e o A2 0,67% da sua frequência representada no rebanho. Quanto ao genótipo os resultados foram de 0,122% (A1A1), 0,452% (A1A2) e 0,436% (A2A2).

Cieślińska et al. (2012) obtiveram os seguintes resultados ao realizarem um estudo que identificou a frequência genotípica de 177 vacas da raça Holandesa de um mesmo rebanho: na frequência alélica do rebanho os resultados foram de 0,32%(A1) e 0,68%(A2), enquanto a frequência genotípica os resultados foram de A1A1 foi de 12,43%, de A1A2 foi de 48,59% e de A2A2 foi de 38,98%.

Kumar et al. (2019) estudaram a frequência alélica e genotípica de 429 animais da raça Holandesa de um rebanho na região da Índia e obtiveram os seguintes resultados: a frequência alélica foi de 0,432% (A1) e 0,563% (A2), enquanto a frequência genotípica foi de 0,175% (A1A1), 0,515% (A1A2) e 0,310% (A2A2). Os autores concluíram que o estudo foi importante para oferecer suporte nos métodos de seleção genética e inclusão do alelo A2 em rebanhos, uma vez que, de acordo com algumas pesquisas o alelo A1 está diretamente ligado ao risco de várias doenças, dentre elas diabetes, doenças cardíacas, dentre outras.

Sabe-se que um fator importante para a realização de pesquisas como esta é o número de animais e que uma quantidade maior de animais pode representar melhor a realidade. No entanto, embora o número de animais estudados por Keating et al. (2008), Daí et al. (2016), Oleński et al. (2012), Cieślińska et al. (2012), Kumar et al. (2019) seja menor do que do presente estudo, que utilizaram 1.764 animais e ao estudo de Massella et al. (2017) todos os resultados corroboram com os apresentados nas tabelas 1 e 2.

A frequência dos alelos e dos genótipos em rebanhos pequenos ou grandes pode ser semelhante, pois o que é levando em consideração nestas situações é o número dos genes presentes na população. O melhoramento genético é uma ferramenta que pode ser utilizada em ambos os rebanhos e favorece o aumento da frequência do alelo escolhido na população de forma mais rápida e eficiente.

Outro fator a ser considerado são as raças dos animais, pois alguns autores acreditam que há cerca de 10 mil anos o rebanho total de bovinos apresentava

apenas o alelo A2 para produção de β -caseína e que fatores como a evolução da espécie e o melhoramento genético forçou o polimorfismo e a formação do alelo A1, após isso, os animais da raça taurina apresentam uma maior frequência de alelo A1, no entanto, de acordo com a literatura consultada os rebanhos da raça Holandesa apresentam uma maior frequência do alelo A2 mesmo quando não são selecionados geneticamente e a seleção acontece de forma aleatória.

Resultados que divergem aos do presente estudo (tabelas 1 e 2) foram verificados por Hanusová et al. (2010) onde a frequência alélica do gene CSN-2 nas vacas foi de 0,54% para o alelo A1 e 0,46% para o alelo A2, enquanto nos touros, foram de 0,60% para o alelo A1 e 0,40% para o alelo A2. As frequências genotípicas destes animais foram de A1A1 (0,13%), A1A2 (0,83%), A2A2 (0,04%) nas vacas e A1A1 (0,20%) e A1A2 (0,80%) nos touros e por Cieślińska et al. (2019) onde a frequência alélica foi de 0,63%(A1) e 0,37%(A2) nas vacas e 0,42% (A1) e 0,58% (A2) nos touros, as frequências genotípicas nas vacas apresentaram-se 36,7% (A1A1), 52,5% (A1A2) e 10,7% (A2A2) e nos touros foram de 12,5% (A1A1), 58,3% (A1A2) e 29,2% (A2A2).

A alta frequência do alelo A1 nas vacas e nos touros pode gerar uma maior frequência dos genótipos homozigotos (A1A1) e até mesmo heterozigotos (A1A2), isso justificaria a ausência do genótipo A2A2 nos touros e a baixa frequência do genótipo A2A2 nas vacas. Ainda, o equilíbrio da frequência alélica entre as vacas e os touros também pode aumentar a frequência de heterozigotos na população, isso sugere que em um rebanho onde o acasalamento dos animais é feito ao acaso o aumento dos alelos e dos genótipos também ocorre de forma aleatória, não é possível prever como isso interfere na evolução genética do rebanho.

Deitos et al. (2011) em um estudo utilizando 32 vacas (16 Holandesas e 16 Pardo-Suíça) para os animais da raça Holandesa foi possível observar a produção de leite de 30,02 (kg/vaca/dia), o teor de gordura 2,85%, teor de proteína 3,15%, teor de lactose 4,65%, EST 11,72%, ESD 8,77% e CCS 297,83 log céls./mL. Já nos animais Pardo-Suíços a produção de leite foi de 29,17(kg/vaca/dia), o teor de gordura 3,43%, teor de proteína 3,17%, teor de lactose 4,58%, EST 12,17%, ESD 8,73% e CCS 142,12 log céls./mL.

Ludovico et al. (2019) ao estudarem os efeitos de diferentes grupo genéticos relacionados ao estresse térmico e características produtivas em 14.181

informações coletadas durante 7 anos de animais das raças Holandesas, Jersey e Girolanda chegaram aos seguintes resultados: os animais da raça holandesa apresentaram melhor desempenho para produção de leite total, teor de proteína (3,14%), teor de lactose (4,56%), EST (12%) e ESD (8,61%), mas para o teor de gordura os animais da raça Jersey apresentaram um teor de 4,36%, enquanto os animais da raça holandesa apresentaram um teor de 3,40%. Os autores relacionam o aumento de temperatura com a diminuição da concentração dos componentes do leite em todas as raças, incluindo a raça holandesa que apresentaram uma diminuição ainda maior.

Krolow et. al (2012) realizaram um estudo onde buscaram avaliar a composição do leite de vacas holandesas sob pastejo de azevem e alternativas para substituição de componente proteico da ração, neste caso, o estudo utilizou farelo de soja, e o outro tratamento foi feito com trevo branco e apresentaram os seguintes resultados: Para os animais tratados com trevo branco o teor de proteína foi de 3,02%, teor de lactose foi de 4,57%, EST 10,40% e CCS de 182,88 log céls./mL, quanto ao farelo de soja, os resultados foram de 2,96% teor de proteína, 4,64% teor de lactose, EST 10,39% e CCS 153,53 log céls./mL, demonstrando assim que o teor de proteína foi maior em animais do tratamento do trevo branco e que para o EST e CCS os resultados foram semelhantes em ambos os tratamentos, desta forma, os autores concluem que é possível a substituição do farelo de soja para o trevo branco, uma vez que esta alternativa é viável economicamente na região onde o estudo foi realizado.

Os resultados para composição do leite, como: teor de gordura (3,64%), teor de proteína (3,06%), teor de lactose (4,66%), EST (12,35%) e ESD (8,70) e CCS (1,91 log céls./mL) encontrados no presente estudo (tabela 3) corroboram com os resultados encontrados por Deitos et al. (2011), Ludovico et al. (2019) e Krolow et al. (2012) e estão de acordo com a Instrução Normativa Nº 76 (BRASIL, 2018).

Fatores ambientais, nutricionais e genéticos presentes na produção animal, podem variar estes índices para mais ou para menos e a sincronização de todos estes índices juntamente com animais de boa genética e aptidão para produção de leite, e demais componentes presentes no leite podem favorecer a reprodução gerando animais mais produtivos e levar resultados positivos para a economia da propriedade.

Ao estimar as métricas dos três diferentes genótipos (A1A1, A1A2 e A2A2) foi observado que apenas para a produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação houve diferença entre os genótipos e que os animais com o genótipo A1A1 apresentaram uma maior produção. Estes resultados se diferem aos resultados encontrados por Hanusová et al. (2010) que ao delinear o perfil de produção de 92 vacas Holandesas, primíparas observaram que para produção total de leite os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2 não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Já para gordura os genótipos A1A2 (3,90%) e A2A2 (3,90) apresentaram maior percentual ao se comparar com os genótipos A1A1 (3,77%). Para teor de proteína, os genótipos A1A1 (3,17%) e A1A2 (3,20%) tinham menor produção quando comparado com o genótipo A2A2 (3,28%). Os autores ressaltam a importância de estudos com uma maior quantidade de animais para saber se estes resultados seguem da mesma forma.

Molle et al (2011) também encontraram resultados que diferem aos resultados encontrados neste estudo (tabela 4) onde ao analisar os efeitos do gene da β -CN e k-caseína sobre característica de produção e composição de vacas holandesas verificaram que a única diferença estatisticamente significativa encontrada foram nos animais heterozigotos A1A2 que apresentaram um teor de gordura significativamente maior quando comparados com os animais homozigotos A1A1 e A2A2.

Esta informação pode ser de interesse da indústria que tem como foco principal a quantidade de leite adquirido. A introdução de animais com o genótipo A1A1 no rebanho de propriedades pode aumentar a quantidade de leite produzido aos 305 dias, aumentando a quantidade de leite disponibilizado aos laticínios gerando uma maior receita para a propriedade de leite.

Os resultados para efeito aditivo, desvio de dominância e efeito de substituição gênica relacionados ao gene CSN-2 não foram discutidos, pois não foram encontradas pesquisas com este gene específico e seus alelos de interesse para esta pesquisa (A1 e A2), desta forma, não foi possível realizar a comparação de dados desta pesquisa com outros autores, no entanto, artigos semelhantes, utilizando outros genes de interesse para composição de leite, serão discutidos.

Olenski et al. (2012) observando o efeito aditivo dos alelos A2 do gene CSN-2 e C do gene BCE129 verificaram que ao introduzir animais com o alelo A2 no

rebanho ocorre um aumento de produção de leite total e teor de proteína e que o alelo C está relacionado ao maior teor de gordura no leite. Os autores concluem que o alelo A2 pode ser utilizado como marcador molecular para características de produção de leite e teor de proteína e que os dois alelos (A1 e A2) são úteis para a seleção assistida em propriedades que pretendem trabalhar com melhoramento genético para este gene.

Estes resultados se diferem com os do presente estudo (tabela 5) para o efeito genético aditivo do alelo A1 sobre o alelo A2 onde foi possível observar que ao se adicionar o alelo A1 no rebanho ocorre uma melhora na produção de leite total e na produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação.

Diante disso, ao analisarmos os dados de produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação do rebanho, podemos verificar que vacas A1A1 tem uma produção média de 11.260 kg (tabela 4) e que vacas A2A2 tem uma produção média de 10.995 kg (tabela 4), ou seja, a adição do alelo A1 no rebanho aumenta em 206,06 kg (tabela 5) a produção de leite ajustada aos 305 dias de lactação.

De acordo com os resultados apresentados, pelo ponto de vista econômico é possível observar que este rebanho pode estar deixando de ganhar cerca de R\$ 772,50 por animal com alelo A2, levando em consideração o preço do litro de leite integral convencional de R\$ 3,75 para o consumidor (cotação comercial retirada na data de 20 de outubro de 2021) e que os animais A1A1 podem gerar cerca de R\$ 42.225,00 por animal de acordo com a média apresentada e o preço do litro de leite integral convencional de R\$ 3,75 para o consumidor (cotação comercial retirada na data de 20 de outubro de 2021). No entanto, vale ressaltar que o leite proveniente de vacas com o genótipo A2A2 é um nicho de mercado e que o litro deste leite pode chegar a R\$7,20 para a consumidor (cotação comercial retirada na data de 20 de outubro de 2021) e este valor multiplicado pela média de produção dos animais A2A2 gera uma quantia de R\$ 79.164,00 por animal.

Tabaran et al. (2015) realizaram um estudo com o polimorfismo do gene DGAT1 K232A e a frequência alélica e genotípica dos alelos A e K em animais da raça holandesa da Romênia e observaram a sua relação com o teor de gordura no leite. Nos resultados deste estudo foi observado que o alelo K está relacionando com a característica de gordura do leite, aumentando o seu teor quando comparado com o alelo A. Os autores concluem destacando que o polimorfismo gênico pode ser

utilizado como ferramenta em programas de melhoramento genético e que a seleção de determinado alelo pode influenciar nas características de composição do leite.

Szyda et al. (2007) utilizaram dados de 252 animais da Polônia para observar o efeito e interação de 9 diferentes genes e suas características de produção de leite. Os resultados demonstraram que para o efeito genético aditivo do gene K232A o alelo GC apresentou um aumento na produção de leite, e que o alelo AA apresentou um maior percentual na produção de gordura. Os autores também verificaram os desvios de dominância, porém não houve diferença estatisticamente significativa.

Assim como Tabaran et al. (2015) e Szyda et al. (2007) o presente estudo também buscou verificar o efeito genético aditivo do alelo A1 sobre o alelo A2 e observou que ao introduzir o alelo A1 no rebanho características como produção de leite total e produção ajustada aos 305 dias de lactação podem apresentar melhores resultados quando comparados com o alelo A2. Ainda, para desvio de dominância o presente estudo (tabela 6) apresentaram resultados diferentes aos encontrados por Szyda et al. (2007) e verificaram que vacas heterozigotas apresentam uma maior produção aos 305 dias de lactação, quando comparadas com as vacas homozigotas para este rebanho estudado.

Heck et al. (2009) verificaram os efeitos estimados das variantes do gene CSN-2 de 1.912 vacas Holandesas e observaram que o alelo A1 está relacionado com uma menor produção de proteína e maior concentração de α_{s1} quando comparada ao alelo A2. A Variante B foi relacionada a uma maior concentração de kappa-caseína quando comparada com os alelos A1 e A2.

Estes resultados demonstram a importância da interação entre os genes e o quanto a adição ou subtração de um gene pode influenciar a produção do leite, pois sabe-se que os genes que possuem herança de interesse econômico para estas características tanto de produção quanto de composição são poligênicos.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados para um rebanho de vacas holandesas de alta produção, não houve diferença entre os genótipos para a composição do leite e CCS e ambos os genótipos apresentaram valores de referência dentro dos valores estabelecidos pela instrução normativa N°76. No entanto, os animais com o genótipo A1A1 demonstraram ter uma maior produção de

leite ajustada aos 305 dias de lactação. O leite proveniente de vacas com genótipo A2A2 se tornou interessante para indústrias que buscam produzir leite com diferencial a saúde, abrangendo até mesmo uma população de consumidores com alimentações mais restritivas devido a certos desconfortos gastrointestinais. Além disso, para o interesse a nível genético, através do estudo da frequência alélica e genotípica foi possível concluir que o rebanho se encontra em Equilíbrio de Hardy-Winberg até o presente momento, indicando que estes animais são responsivos para a seleção genética do alelo A2.

REFERÊNCIAS

- ABCBRH- **Associação brasileira de criadores de bovinos da raça Holandesa**. Acesso em 26/05/2021.
- 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, vol 81, p. 8-11, junho. 2018.
- BARBOSA, M. G. et al. **Leites A1 e A2: Revisão sobre seus potenciais efeitos no trato digestório**. Segurança alimentar e nutricional. v. 26, p. e019004-e019004, 2019.
- BEIGUELMAN, B. **Genética de populações humanas**. Ribeirão Preto: SBG, p. 483-488, 2008.
- BIRGISDOTTIR, B. E. **Influence of nutrition on prevention of diabetes mellitus**. Scandinavian Journal of Nutrition, v. 46, n. 3, p. 143 - 146, 2002.
- BRAGULLA, H. & KÖNIG, H. E. **Anatomia dos Animais Domésticos Vol.2 – Órgãos e Sistemas**. Porto Alegre: Artmed. p. 335-342. 2004.
- BRASIL, R. B. et al. **Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino**. Ciência Animal, 25, p 1-80, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 76**. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Brasília, DF: 26 de novembro de 2018. Diário Oficial da União, Brasília, 2018.
- BROOK, T. S. et al. **Systematic review of the gastrointestinal effects of A1 compared with A2 β -Casein**. Advances in Nutrition, v. 8, p. 739 - 748, 2017.
- BUGEAC, T. et. al. **Genetic polymorphism of beta-casein gene and its associations with milk traits in Holstein-Friesian cows**. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies 48.1, 103-107, 2015.
- CALLEFE, J. L. R.; LANGONI, H. **Qualidade do leite: uma meta a ser atingida**. Veterinária e Zootecnia, v. 22, n. 2, p. 151-162, 2015.
- 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 Science, v. 35, n. 1, p. 41-47, 2005.

CEPEA- Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **Leite**. Piracicaba, SP. 2020. Acesso em 12 de dezembro de 2020.

CHESSA, S., et al. **Bovine β -casein: Detection of two single nucleotide polymorphisms by bidirectional allele specific polymerase chain reaction (BAS-PCR) and monitoring of their variation**. Journal of Animal Sciences. Vol.3, p.36, 2013.

CIESLINSKA, A. et al. **Beta-casomorphin 7 in raw and hydrolyzed milk derived from cows of alternative b-casein genotypes**. Milchwissenschaft, v. 62, n. 2, p. 125 - 127, 2007.

CIESLINSKA, A. et al. **Milk from cows of different b-casein genotypes as a source of b-casomorphin-7**. International Journal of Food Sciences and Nutrition, v. 63, n. 4, p. 426 - 430, 2012.

CIEŚLIŃSKA, A., et al. **Genetic polymorphism of β -Casein gene in Polish Red Cattle—Preliminary study of A1 and A2 frequency in genetic conservation herd**. Animals, v. 9, n. 6, p. 377, 2019.

CIEŚLIŃSKA, A., et al. **Milk from cows of different β -casein genotypes as a source of β -casomorphin-7**. International journal of food sciences and nutrition, v. 63, n. 4, p. 426-430, 2012.

COSTA, M. D. et al. **Análise da relação benefício-custo em sistema de produção de leite com animais mestiços no norte de Minas Gerais**. Boletim de Indústria Animal, v. 73, n. 3, p. 244-251, 2016.

CZARNOBAY, M. et al. **Cinética de hidrólise de lactose em leite de ovelha e leite de vaca**. Revista CIATEC-UPF, 9(1). 2017.

DAI, R., et al. **Identification of alleles and genotypes of beta-casein with DNA sequencing analysis in Chinese Holstein cow**. The Journal of dairy research, v. 83, n. 3, p. 312, 2016.

DALGLEISH, D. G.; CORREDIG, M. **The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing**. Annual Review of Food Science and Technology, 3(1), p. 449-467. 2012.

DE KRUIF, C. G.; GRINBERG, V. Y. **Micellisation of β -casein**. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. v. 210, p. 183-190. 2002.

DE NONI I, CATTANEO S. **Occurrence of b-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, 2010.

DE REZENDE N. J., et al. **Substituição parcial do farelo de soja por diferentes fontes nitrogenadas em dietas a base de cana de açúcar na alimentação de vacas leiteiras.** Veterinária e Zootecnia. p. 101-113. 2015.

DE REZENDE. M. **Viva o leite!** Revista DBO. 2018. Acesso em: 26/05/2021. <https://www.portaldbo.com.br/viva-o-leite/>.

DEITOS, A. C. et. al. **Produção e qualidade de leite de vacas de diferentes grupos genéticos.** Campo Digital, v. 5, n. 1, 2011.

DUIFHUIS, T. et al. **Polymorphisms in beta and kappa casein are not associated with milk production in two highly technified populations of Holstein cattle in México.** J Anim Plant Sci, v. 24, n. 5, p. 1316-1321, 2014.

ELLIOTT, R. B. et al. **Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption.** Diabetologia, v. 42, n. 3, p. 292-296, 1999.

ELLIOTT, R. B. et al. **Type I (insulindependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption.** Diabetologia 42: 292–296, 1999.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Anuário do Leite.** São Carlos, SP. 53 p. 2020. Acesso em 12 de dezembro de 2020.

EMBRAPA. **O Mercado Consumidor de Leite e Derivados.** Juíz de Fora, MG. 17 p. 2019. Acesso em 12 de dezembro de 2020.

ENGELKING, L. R. **Fisiologia Endócrina e Metabólica em Medicina Veterinária.** 2 ed. São Paulo, p. 44-49. 2010.

EUCLIDES FILHO, K. O melhoramento genético e os cruzamentos em bovino de corte. Embrapa Gado de Corte-Documentos (INFOTECA-E), 1997.

EUCLIDES FILHO, K. **O melhoramento genético e os seus cruzamentos em bovinos de corte.** Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 35p. 1996.

FACÓ, O. et al. **Efeitos genéticos aditivos e não-aditivos para características produtivas e reprodutivas em vacas mestiças Holandês x Gir.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 37, n. 1, p. 48-53, 2008.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics.** Harlow: Longman Group Limited, 464p, 1996.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to Quantitative Genetics**. 4^o ed. Editora Pearson, p. 464, 1996.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food and Agriculture Organization of the United Nations statistical databases**. 2019. Disponível em: <[https:// faostat.fao.org](https://faostat.fao.org)>. Acesso em: 25 abr. 2021.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico**. 2 ed. São Paulo: Roca. p. 321- 323. 2008.

HANUSOVÁ, E. et al. **Genetic variants of beta-casein in Holstein dairy cattle in Slovakia**. Slovak Journal of Animal Science, v. 43, n. 2, p. 63-66, 2010.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações 4**. 4^o ed. Editora Artmed, 2010.

HARTWIG, A. et al. **Influence of genetic polymorphisms in bovine milk on the occurrence of bioactive peptides**. International Dairy Federation special issue, n. 2, p. 459-460, 1997.

HECK, J. M. L., et. al. **Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk**. Journal of dairy science, 92(3), p.1192-1202. 2009.

HOLLAND, J. W.; BOLAND, M. J. Post-translational modifications of caseins. Milk proteins, p. 141-168. London: Elsevier. 2014.

HOLT, C. **Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species**. International Dairy Journal, 60, p. 2-13. 2016

HOLT, C., et al. **Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods**. Journal of Dairy Science, 96(10), p. 6127-6146. 2013.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Trimestral do Leite**. 2019. Acesso em 12 de dezembro de 2020.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Trimestral do Leite**. 2020. Acesso em 12 de dezembro de 2020.

IEA. Instituto de Economia Agrícola. **Diagnóstico da Produção e Consumo de Leite no Estado de São Paulo**. 2018. Acesso em 26/05/2021.

IKONEN, T., et. al. **Associations between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows**. Journal of Dairy Science. 82:1026–1033, 1999.

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

KAMINSKI, S. et al. **Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health**. Journal of applied genetics, v. 48, n. 3, p. 189-198, 2007.

KAMINSKI, S. et al. **Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health**. Journal of applied genetics, v. 48, n. 3, p. 189-198, 2007.

KEATING, A. F. et al. **A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to β -casomorphin**. Irish Journal of Agricultural and Food Research, p. 99-104, 2008.

KLEIN, B. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 5. ed. Rio De Janeiro: Editora Elsevier, 2014.

KRISSANSEN, G.W. **Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications**. Journal of the American College of Nutrition, Vol. 26, No. 6, p. 713S– 723. 2007.

KROLOW, R. H. et al. **Composição do leite de vacas Holandesas em pastejo de azevém com a utilização do trevo branco como fonte proteica**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 64, n. 5, p. 1352-1359, 2012.

KUMAR, A. et al. **Genetic association analysis reveals significant effect of β -casein A1/A2 loci on production & reproduction traits in frieswal crossbred cows**. Biological Rhythm Research, p. 1-14, 2019.

LAUGESEN, M; ELLIOTT, R. **Ischaemic heart disease, type 1 diabetes, and cow milk A1 β -casein**. The New Zealand Medical Journal, v. 24, n. 116, p. 1 - 19, 2003.

LEIRA, M. H., et al. **Fatores que alteram a produção e a qualidade do leite: Revisão**. PUBVET, 12, p. 172. 2018.

LIMA, A. C. J.; LARA, M. A. C. Polimorfismo do gene β -caseína em bovinos. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA**, v. 6, p. 280-285, 2015.

LIMA, A. C. J.; LARA, M. A. C. **Polimorfismo do Gene β -caseína em Bovinos**. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA, v. 6, p. 280-285, 2015.

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

LOPES, P. S.; TORRES, R. A.; PIRES, A. V. **Teoria do melhoramento Animal**. 1º ed. FEPMVZ Editora. 2005.

LUDOVICO, A. et. al. **Fontes de variação da produção e composição de leite em vacas Holandesa, Jersey e Girolando**. Arquivos de zootecnia, v. 68, n. 262, p. 236-243, 2019.

MASSELLA, E., et. al. **Evaluation of bovine beta casein polymorphism in two dairy farms located in northern Italy**. Italian Journal of Food Safety, 6(3). 2017.

MATÍA-MARTÍN, P., et al. **Effects of milk and dairy products on the prevention of osteoporosis and osteoporotic fractures in Europeans and non-Hispanic Whites from North America: a systematic review and updated meta-analysis**. Advances in Nutrition 10: p. S120-S143. 2019.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. **Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular**. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 56, n. 2, São Paulo. 2010.

MCLACHLAN, C. N. S. **β -casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses**. Medical Hypotheses, v. 56, n. 2, p. 262-272, 2001.

MÉNARD, O. et al. **Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane**. Food Chemistry, v. 120, n. 2, p. 544-551. 2010.

MILK POINT, **Levantamento Top 100. 2021**. Acesso em 26/05/2021 <https://www.milkpoint.com.br/top100/2021/>

MOLEE, A. et. al. **The effect of beta and kappa casein genes on milk yield and milk composition in different percentages of Holstein in crossbred dairy cattle**. Animal Science Journal, v. 82, n. 4, p. 512-516, 2011.

MORRIS, C. A. et al. **Associations between β -casein genotype and milk yield and composition in grazing dairy cows**. New Zealand Journal of Agricultural Research, 48(4), 441-450. 2005.

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.

MULIM, H. A. **Estudo de interação genótipo ambiente, vias normas de reação, para características produtivas na raça holandesa do estado do Paraná**. 2019. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, p. 74, 2019.

NCBI- **National Center for Biotechnology Information**. Acesso em 26/05/2012
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281099>.

NGUYEN, H. T.; 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.

OLENSKI, K., et al. **Polymorphism in coding and regulatory sequences of beta-casein gene is associated with milk production traits in Holstein-Friesian cattle**. Animal Science Papers and Reports, v. 30, n. 1, p. 12, 2012.

OLENSKI, K.; KAMIŃSKI, S.; SZYDA, J.; CIESLINSKA, A. **Polymorphism of the beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein–Friesian bulls**. Livestock Science, v. 131, n. 1, p. 137-140, 2010.

ORDÓÑEZ, J. A., et al. **Características gerais do leite e componentes fundamentais**. Tecnologia de Alimentos, 2, p. 13-37. 2005.

OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. M. **Genética humana**. 3. ed. Porto Alegre, Artes Médicas, 2013.

PAULA, M. C. D.; et al. **Interação genótipox ambiente para produção de leite de bovinos da raça Holandesa entre bacias leiteiras no estado do Paraná**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 38, n. 3, p. 467-473, 2009.

PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento genético Aplicado à Produção Animal**. 5^o ed.- Belo Horizonte. FEPMVZ Editora. 2008.

RAHIMI, Z. et al. **Evaluation of beta-casein locus for detection of A1 and A2 alleles frequency using allele specific PCR in native cattle of Kermanshah, Iran**. Biharean Biologist, v. 9, n. 2, p. 85-87, 2015.

RAHIMI, Z.; et al. **Evaluation of beta-casein locus for detection of A1 and A2 alleles frequency using allele specific PCR in native cattle of Kermanshah, Iran**. Biharean Biologist, v. 9, n. 2, p. 85-87, 2015.

REECE, W. O. **Anatomia Funcional e Fisiologia dos Animais Domésticos**. 3 ed. São Paulo, p. 418-431. 2008.

REKAYA, R.; WEIGEL, K. A.; GIANOLA, D. **Bayesian estimation of parameters of a structural model for genetic covariances between milk yield in five regions of the United States**. Journal of Dairy Science, v. 86, n. 5, p. 1837-1844, 2003.

RENHE, I.R.T. **O papel do leite na nutrição.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, nº363, 63: p. 36-43, Jul./Ago. 2008.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite.** São Paulo: Manole, 313 p. 2007.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Controle da Mastite e Qualidade do Leite. Desafios e Soluções.** Edição dos Autores. Pirassununga, 280 p. 2019.

SBAN- Sociedade brasileira de alimentação e nutrição. **Mudanças em Hábitos Alimentares.** São Paulo, SP. 2015. Acesso em 12 de dezembro de 2020.

SOARES, L.R. et al. **Efeito dos Genótipos da Beta Caseína sobre a Produção e Composição do Leite na Raça Gir Leiteiro.** 13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica. Campinas- SP. 2019.

SOKOLOV, O. Y. et al. **Reactions between β -Casomorphins-7 and 5-HT₂ - Serotonin Receptors.** Bulletin of Experimental Biology and medicine, v. 10, n. 5, 2005

STRÅVIK, M., et al. **Maternal Intake of Cow's Milk during Lactation Is Associated with Lower Prevalence of Food Allergy in Offspring.** Nutrients, v. 12, n. 12, p. 3680, 2020.

SULIMOVA, G., et al. **Casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker.** Russian Journal of Genetics 43: 73-79, 2007.

SUN, Z. et al. **Relation of β -casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome.** Peptides, v. 24, n. 6, p. 937 - 943, 2003.

SUN, Z; CADE, J. R. **A peptide found in schizophrenia and autism causes behavioural changes in rats.** Autism, v. 3, n. 1, p. 85 - 95, 1999.

SWAN, A.A.; KINGHORN, B.P. **Symposium: dairy crossbreeding: Evaluation and exploitation of crossbreeding in dairy cattle.** Journal of Dairy Science, v.75, p.624-639, 1992.

SZYDA, J., & KOMISAREK, J. **Statistical modeling of candidate gene effects on milk production traits in dairy cattle.** Journal of dairy science, 90(6), 2971-2979. 2007.

TĂBĂRAN, A. et al. **Influence of DGAT1 K232A polymorphism on milk fat percentage and fatty acid profiles in Romanian Holstein cattle.** Animal biotechnology, v. 26, n. 2, p. 105-111, 2015.

THORNING, T. K., et al. **Milk and dairy products: good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence.** Food & nutrition research, 60(1), p. 32527. 2016.

THORSDOTTIR, I. et al. **Different beta-casein fractions in icelandic milk 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, n. 4, p. 719 - 724, 2000.

TOMBINI, H. et al. **Consumo de leite de vaca e derivados entre agricultores da região oeste do Paraná.** Brazilian Journal of Food & Nutrition/Alimentos e Nutrição, v. 23, n. 2. 2012.

TOMBINI, H. et al. **Consumo de Leite de Vaca e Derivados Entre Agricultores da Região Oeste do Paraná.** Alimentos e Nutrição Araraquara, v. 23, n. 2, p. 267-274, 2012.

TRUSWELL, A. S. **The A2 milk case: A critical review.** European Journal of Clinical Nutrition. 2005.

Velmala, R. et. al. **Casein haplotypes and their association with milk production traits in the Finnish Ayrshire cattle.** Anim. Genet. 26:419–425. 1995.

WOODFORD, K. B. **A2 milk, farmer decisions, and risk management.** In: Proceedings of the 16th International Farm Management Congress: Peer reviewed papers. p. 641-648. 2007.

YÜKSEL, Z.; ERDEM, Y. K. **Detection of the milk proteins by RP-HPLC.** GIDA-Journal of Food, p. 5-11. 2010.

YUN, B., et al. **Dietary bovine milk–derived exosomes improve bone health in an osteoporosis-induced mouse model.** Journal of Dairy Science, 103(9), p. 7752-7760. 2020.

Zhang, Q. D. et. al. **Mapping Quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree.** Genetics. 149:1959–1973, 1998.