

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

CINDY ANNE KLAUSBERGER XIMENES

**PROTEÍNA ALERGÊNICA DO LEITE: ESTUDO EXPLORATÓRIO SOBRE
A β -CASEÍNA A1 E A2 EM BÚFALOS LEITEIROS**

PORTO ALEGRE - RS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

CINDY ANNE KLAUSBERGER XIMENES

PROTEÍNAS ALERGÊNICAS DO LEITE: ESTUDO EXPLORATÓRIO SOBRE
A β -CASEÍNA A1 E A2 EM BÚFALOS LEITEIROS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito de obtenção do
Grau de Bacharel em Zootecnia, Faculdade
de Agronomia, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul.

Orientadora: Elisa Cristina Modesto

Co-orientador: Thales Renato
Ochotorena de Freitas

Porto Alegre – RS

2019

CINDY ANNE KLAUSBERGER XIMENES

PROTEÍNA ALERGÊNICA DO LEITE: ESTUDO EXPLORATÓRIO SOBRE
A β -CASEÍNA A1 E A2 EM BÚFALOS LEITEIROS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do
Grau de Bacharel em Zootecnia, Faculdade de Agronomia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Data de aprovação: ____/____/____

Prof^a Dr^a Elisa Cristina Modesto

Prof^o Dr Thales Renato Ochotorena de Freitas

Mestranda UFRGS Isabelle Damé Veber Angelo
Zootecnista

*Dedico este trabalho aos
meus pais e meu irmão.*

*“Uns tem e não podem,
Outros podem e não tem,
Nós que temos e podemos
Vós agradecemos Senhor”
- Autor desconhecido*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por todas as graças alcançadas até hoje. Agradeço a minha família e ao meu namorado, Douglas Soares de Oliveira, pois sem eles não estaria onde estou.

Minha vida é repleta de educadores, todos os professores que tive a oportunidade de conhecer sempre me ensinaram muito além das suas matérias. Começo agradecendo aos meus primeiros professores, meus pais, Adriana Teresinha Klausberger e Carlos Alberto dos Santos Ximenes, meu irmão, Jonas Klausberger Ximenes, avós, Nelci e Marino Klausberger e Idê e Jesus Ximenes, minha dinda, Josiana Maria Klausberger, tias e tias avós, tios, em especial Tiago Klausberger, primos e primas, em especial minhas primas Amanda Klausberger e Caroline Wolker. Muito além de professores de suas matérias nas escolas, me ensinaram os valores da vida.

Agradeço aos meus amigos, que mesmo sem compreender o que é Zootecnia me apoiaram, obrigada por todo apoio até hoje, Jeniffer Aires, Bárbara Baldasso e Bruno Rapone. Em especial aos meus colegas de curso, tanto de graduação como pós-graduação, futuros colegas de profissão e amigos que vou levar para toda vida. Fica meu sentimento especial a Ariane Andrades, Carolina Chuaste Grando, Isabelle Angelo, Carolina Franceshi, Aline Mello, vocês foram fundamentais para eu decidir meu caminho dentro da Zootecnia, obrigada!

Agradeço aos meus professores, todos eles, desde minhas professoras alfabetizadoras, professores do ensino fundamental e médio, sempre me mostram que o melhor caminho até os nossos objetivos é através do estudo. Em especial a professora Adriane Dal Bó, você sempre terá um espaço especial no meu coração, obrigada por sempre acreditar que eu era capaz!

Agradeço também aos meus professores das artes, Teatro, em especial ao Renan Mion, obrigada pelos ensinamentos e amizade, Ballet, Música, entre outros. Muito obrigada, vocês são responsáveis pela formação de uma cidadã mais sensível e humana.

Um agradecimento especial a todos os meus professores de graduação, que a cada semestre me tornaram um pouquinho mais Zootecnista e muito mais apaixonada pela área. Obrigada a todos os meus Orientadores pelas bolsas de estudos concedidas durante esses anos, e a oportunidade de aprendizado que tive em cada uma delas.

E por fim, mas não menos importante deixo meu agradecimento especial as pessoas que tornaram este trabalho possível. Minha orientadora professora Elisa Cristina Modesto, meu co-orientador professor Thales Renato Ochotorena de Freitas, minha colega de curso e amiga

Bruna Valenzuela Garcia, a Médica Veterinária Veronica Machado Rolim e a Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo incentivo a pesquisa.

Resumo

Equivocadamente tem se considerado alergias e intolerâncias alimentares como sinônimos. Para que a reação alérgica a um alimento ocorra, proteínas ou outros antígenos devem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal, interagir com o sistema imunológico e produzir uma resposta (MOREIRA, 2006). O leite de vaca apresenta maior incidência em respostas alergênicas e uma sintomatologia bastante variável. Uma das principais proteínas do leite é a caseína, representando cerca de 80% das proteínas lácteas. Sua variante, a β -caseína A, em bovinos, apresenta uma mutação ocasionando as variantes β -caseína A1 e β -caseína A2. A Alergia a Proteína do Leite de Vaca (APLV) é causada pelo opioide liberado durante a digestão da β -caseína A1, que segundo literatura, não está presente no leite de outras espécies, como os bubalinos, por exemplo. Este estudo exploratório teve por objetivo analisar a genética do Rebanho Bubalino da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, com o intuito de analisar a prevalência do gene para β -caseína A2. Para amostragem, foi necessário coletar sangue e depositar em tubos EDTA, que foram identificados e armazenados em caixa de isopor devidamente refrigerada. O isolamento do DNA foi realizado no Laboratório de Citogenética e Evolução do Departamento de Genética da UFRGS. Todos os animais apresentaram sequência de bases de aminoácidos semelhante a variante da β -caseína A2 de bovinos. Este resultado era esperado devido aos relatos de literatura. Todos os animais amostrais apresentaram em sua sequência de aminoácidos uma variante semelhante a β -caseína A2 bovina, onde na posição 67 se encontrou uma prolina. Esta variante da β -caseína foi reconhecida por Ferranti et al., 1998, pela nomenclatura de β -caseína A bubalina. Portanto, o Rebanho Bubalino da EEA – UFRGS é produtor de leite do tipo β -caseína A e B. Sendo assim, estes animais geneticamente identificados estão aptos a produzir leite e derivados livres de uma variante da β -caseína que possa causar reações alérgicas no trato gastrointestinal principalmente de lactantes e crianças, e consumidores.

Palavras chave: mutação genética, APLV, búfalo

Abstract

Allergies and food intolerances are erroneously considered synonyms. For an allergic reaction to happen, proteins or other antigens need to be absorbed by the gastrointestinal system, interacts with the immune system and produces a physiological response. Cow milk presents higher incidence of allergenic responses and a variable and wide range of symptoms. One of the main milk proteins is casein, which represents around 80% of all lacto-proteins. The variety β -casein A, in bovines, can present mutations forms named β -casein A1 and β -casein A2. Cow milk allergy is caused by the opioid released during the digestion of B casein A1, which according to recent studies, is absent in the milk of species like water buffalos. This exploratory study intends to genetically analyse a milk's water buffalos of Estação experimental Agronomica of UFRGS, with the aim to verify the prevalence of gene β -casein A2. To produce samples for this study, it was necessary to collect blood stored in the identified EDTA tubes and keep them stored in refrigerated styrofoam boxes. The isolation of DNA was conducted at the Citogenetic and Evolution Laboratory, part of Genetics department of Federal University of Rio Grande do Sul. All tested animals presented a sequence of amino acid bases similar to the bovine variety β -casein A2. This result was expected according to review of existing literature which attributes such results to a low selection process experienced by this animals in the past. All sampled animals presented an amino acid sequence variety, similar to B casein A2 in bovines, where a proline was found in the position 67. This variety of β -casein was recognised by Ferranti et al (1998) as β -casein A whater buffalo. The water buffalo cattle of EEA - UFRGS produces milk types β -casein A and B. Therefore, this genetically identified animals are able to produce milk and its derivatives free from the B casein variety the could cause allergic reaction in the gastrointestinal tract of breast feeding mothers and children.

Keywords: genetic mutation, cow's milk protein allergy, water buffalo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fragmento das variantes genéticas β -caseína A1 e A2 bovinas, destacando a diferenciação de AA na posição 67.	25
Figura 2. Fragmentos das variantes β -caseína A2 bovina e do leite humano, destacando prolina na posição 67 de ambas variantes.	27
Figura 3. Localização da EEA UFRGS em relação a Porto Alegre.	30
Figura 4. Rebanho Bubalino da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul	31
Figura 5. Contenção dos animais para coleta de sangue na veia caudal.	32
Figura 6. Amostras de sangue do rebanho bubalino EEA coletado em tubos EDTA.	33
Figura 7. Produto da PCR em gel agarose 1% com o LADDER da Ludwing®, com banda de 300 pb.	34
Figura 8. Sequência de aminoácidos a partir da posição 65 dos animais amostrais comparadas com amostras do GenBank, para comparação das mutações na posição 67.	36
Figura 9. Pico sobreposto de duas bases nitrogenadas (citosina e guanina) na posição 68, demonstrando heterozigose na amostra 9.	37
Figura 10. Composição da sequência de aminoácidos de búfalos para β -caseína comparada com as proteínas de bovino, ovino, caprinos, humanos e camelo.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios da composição do leite bubalino e bovino	18
Tabela 2. Rendimento industrial de leite de búfala e vaca.....	18
Tabela 3. Características bioquímicas das proteínas do leite.....	22
Tabela 4. Sequência de AA das β -casomorfina bovinas	26
Tabela 5. Identificação dos animais e locais da coleta de sangue.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA.....	Aminoácido(s)
ABCB.....	Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos
APVL.....	Alergia a proteína do leite de vaca
BCM.....	β -casomorfina
DNA.....	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA.....	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EEA.....	Estação Experimental Agronômica
IL.....	Intolerância a Lactose
PCR.....	Reação em Cadeia da Polimerase

LISTA DE SÍMBOLOS

α	ALFA
β	BETA
κ	KAPPA
Pro ⁶⁷	PROLINA NA POSIÇÃO 67
His ⁶⁷	HISITIDINA NA POSIÇÃO 67
β A1.....	β -caseína A1
β A2.....	β -caseína A2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.2 Objetivo	15
1.3 Justificativa	15
1.4 Problema	15
1.5 Hipótese	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 História da Bubalinocultura leiteira e sua atual situação no Brasil	16
2.2 Caracterização de Leite Bupalino	17
2.3 Alergia x Intolerância	19
2.3.1 Intolerância	19
2.3.2 Alergia	20
2.4 Sínteses das proteínas do leite	21
2.5 β-caseína	24
2.5.1 Liberação de BCM-7	25
2.6 Seleção Genética e CSN2	27
3 METODOLOGIA	29
Aprovação pelo CEUA	29
3.1 Local e Rebanho do Estudo	29
3.2 Coleta de amostras	31
3.3 Extração de DNA	33
3.4 Primers	33
4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	34
3.6 Sequenciamento	35
3.7 Análises das sequências	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36

5 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

Equivocadamente tem se considerado alergias e intolerâncias alimentares como sinônimos (ANGELIS, 2006). As alergias alimentares são bem mais comuns no grupo pediátrico do que em adultos e possuem um impacto médico, financeiro e social considerável em crianças menores e suas famílias (SAMPSON, 2005).

Para que a reação alérgica a um alimento ocorra, proteínas ou outros antígenos devem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal, interagir com o sistema imunológico e produzir uma resposta (MOREIRA, 2006). Os alérgenos alimentares mais comuns responsáveis por até 90% de todas as reações alérgicas são as proteínas do leite de vaca, ovo, amendoim, trigo, soja, peixe, frutos do mar e nozes (LOPES et al., 2006). O leite de vaca apresenta maior incidência e uma sintomatologia bastante variável. Seu estudo é prejudicado porque, na prática clínica, muitas vezes, os pesquisadores dividem-se em incrédulos, que subestimam sintomas, ou aqueles que os hiperestimam, levando crianças ao uso de dietas e privações desnecessárias, com graves consequências nutricionais e psicológicas (CARVALHO, 2001).

Das proteínas implicadas nas reações imunológicas, os principais alérgenos encontrados no leite são a caseína, α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina (CASTELLO et al., 2004). A alergia ao leite de vaca (APLV) é uma doença quase exclusiva dos lactentes e da infância e raramente é descrita na adolescência (CARVALHO, 2001).

Segundo a Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia (ASBIA), o ponto principal do tratamento da APLV é a exclusão do leite de vaca e seus derivados da dieta. Atualmente o leite de vaca é o mais consumido no mundo, sendo também o produto lácteo mais comum entre os consumidores. Quando recomendado a exclusão deste alimento tanto para lactentes quanto para as mães durante a amamentação, logo ocorre a exclusão total de toda e qualquer dieta láctea, de qualquer espécie, por desconhecimento da APLV caracterizar a proteína da espécie bovina (ASBIA, 2007)

Trabalhos como de Villares et al. (2006) chamaram a atenção para os eventuais efeitos adversos das dietas de exclusão de leite para crianças. Foram descritos casos de hipocrescimento nas crianças que seguem uma dieta sem produtos lácteos. Foram descritos também suprimento calórico insuficiente, baixo suprimento de cálcio e sinais bioquímicos de nutrição inadequada em crianças com menos de quatro anos (VILLARES et al., 2006).

1.1 Objetivo

Identificar a sequência de aminoácidos dos bubalinos para β -caseína A semelhante a sequência de AA para β -caseína A2 de bovinos.

1.2 Justificativa

Sabendo da importância nutricional do alimento leite para a população humana, principalmente em crianças, buscam-se alternativas de consumo para aqueles que apresentam APLV (OLIVEIRA, 2013). Este estudo exploratório busca apresentar uma possível alternativa de consumo de lácteos para pessoas atingidas pela APLV, apresentando uma alternativa de consumo de lácteos livres da β -caseína A1 (semelhante à bovina).

1.3 Problema

Quando se trata sobre composição do leite bubalino, pouco se tem conhecimento sobre o assunto. O leite de búfala é o segundo mais consumido mundialmente (BERNARDES, 2007). Os bubalinos sofreram pouquíssima seleção genética ao longo dos anos. Sendo assim, poucos estudos a nível genético são realizados com estes animais. Há poucos trabalhos científicos buscando caracterizar o leite bubalino.

Existe um grande mercado de alimentos que é pouco explorado. Este mercado é caracterizado por um produto altamente nutritivo, com alto teor calórico, alta proteína, alta gordura, rico em vitaminas e minerais e com um potencial de nutrir crianças que tenham a APVL.

Atualmente existem afirmações conflitantes sobre intolerância a lactose e alergia ao leite. Segundo Oliveira et al. (2013) e Barbosa et al. (2019), para uma dieta livre de β -caseína A1, o consumo de lácteos de outras espécies como o búfalo é uma alternativa.

Com vista nos conflitos existentes, se identifica uma necessidade de pesquisa acerca das diferenças entre a proteína β -caseína. Apresentar o leite bubalino está como alternativa para nutrir crianças e a parte da população que apresentem alergia a variante da proteína β -caseína A1.

1.4 Hipótese

Espera-se que todos os animais amostrais apresentem sua sequência de aminoácidos para β -caseína A semelhante à β -caseína A2 bovina e não apresentem sequência de AA semelhante à β -caseína A1 bovina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História da Bubalinocultura leiteira e sua atual situação no Brasil

A bubalinocultura no Brasil teve seu início no final do século XIX, em pequenos lotes originários da Ásia, Itália e Caribe. Sua grande adaptabilidade aos mais variados ambientes, sua elevada fertilidade e longevidade produtiva, permitiram que o rebanho se expandisse significativamente, e dos pouco mais de 200 animais introduzidos no país, resultaram em um rebanho de 495 mil búfalos em 1980, com um crescimento anual médio de 10,86% entre 1961 e 1980 (BERNARDES, 2007). Motivo pelo qual a ocorrência de consanguinidade entre os rebanho bubalinos no Brasil é alta (BERNADES, 2014).

O maior conhecimento de suas potencialidades e características produtivas associadas a diversas ações promocionais, notadamente a partir da década de 80, motivou acentuada expansão e disseminação da espécie para diversas regiões. Inicialmente o objetivo era de ocupar os chamados “vazios pecuários”, onde passaram a ser explorados tanto para corte quanto para produção leiteira (BERNARDES, 2007).

Principalmente a partir dos anos 90, se observou uma significativa expansão de unidades industriais dedicadas à produção de derivados de leite de búfalas, devido ao maior rendimento industrial e produção de produtos de maior valor agregado (BERNARDES, 2007).

Boa parte da produção de leite bovino no Brasil vem sendo explorada por pequenos produtores (menos de 50 litros/dia), através de explorações com baixo uso de tecnologia ou intensificação e geralmente como atividade complementar a outras explorações agropecuárias. Nestas condições, seus rebanhos geralmente são formados por animais de baixa produtividade, com produções médias por lactação de pouco mais de 1.000 kg, com taxas de fertilidade que sequer atingem 60% (BERNARDES, 2007).

Ao mesmo tempo em que se observa este fenômeno com relação a leite bovino, verificamos que nas regiões onde existem laticínios especializados na captação do leite de búfalas, o movimento é no sentido inverso, ou seja, é cada vez maior o número de produtores, principalmente pequenos, que passam a se dedicar à exploração leiteira da búfala com a qual têm obtido produção individual, mesmo com rebanhos ainda pouco selecionados, superiores às que obtinham com os bovinos, e significativamente um maior volume global, graças à maior fertilidade da espécie (BERNARDES, 2007).

Além disto, o preço de remuneração do leite bubalino é mais estável durante o ano e duas vezes maior que os valores obtidos com o leite bovino, além de conseguir obter melhor

remuneração pelos bezerros desmamados e, dada a maior longevidade produtiva da espécie, têm menor necessidade de reposição (BERNARDES, 2007).

A produção leiteira bubalina média no Brasil é de cerca de 1.500 a 1.700 litros por lactação, sendo, por exemplo, cerca de 30-40% inferior às médias observadas na Índia e Paquistão atualmente. Em termos de potencial de melhoramento, verifica-se já com relativa frequência nestes países exemplares com produções leiteiras entre 5 e 6 mil kg por lactação, produções estas ainda raramente vistas no Brasil (BERNARDES, 2014).

Enquanto se observa certa estagnação no consumo de derivados de lácteos bovinos no país nos últimos anos, os laticínios que processam leite de búfalo apresentam, entre 2001 e 2005, um crescimento médio anual no leite processado na ordem de 32,3%, segundo a Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos (ABCB). Além da tradicional *Mozzarella* outros derivados começam a ser produzidos a partir do leite de búfala, tais como os queijos tipo minas frescal, a ricota, o doce de leite, o queijo tipo coalho, o iogurte e o provolone, entre outros (BERNARDES, 2007).

Estima-se que a produção de leite de búfalas no Brasil seja de 92,3 milhões de litros, produzidos por cerca de 82.000 búfalas em 2.500 rebanhos e que existam pelo menos 150 indústrias produzindo derivados de leite de búfalas no país. Estas indústrias transformam anualmente 45 milhões de litros de leite em 18,5 mil toneladas de derivados, gerando um faturamento bruto da ordem de U\$ 55 milhões aos laticínios e de cerca de U\$ 17 milhões aos criadores (BERNARDES, 2007).

2.2 Caracterização de Leite Bubalino

O leite é uma secreção característica da glândula mamária de todos os mamíferos. Por causa de sua função nutricional para animais muito jovens, o leite é um alimento rico em minerais, vitaminas, gordura e proteínas, sendo um alimento indispensável ao seu desenvolvimento (BERNARDES, 2007).

A composição do leite difere entre as espécies na porcentagem de seus constituintes, podendo variar também por fatores climáticos e fisiológicos tais como estágio de lactação, idade do animal e de seu próprio genótipo (OTAVIANO, 2006). Na Tabela 1 é possível comparar as diferenças na composição do leite nas espécies bubalina e bovina.

Tabela 1. Valores médios da composição do leite bubalino e bovino

Componente	Búfala	Vaca
Extrato seco (%)	18,50	12,20
Extrato seco desengordurado (%)	10,20	8,70
Gordura (%)	8,30	3,50
Proteína total (%)	4,73	3,30
Lactose (%)	4,90	4,70
Minerais (%)	0,80	0,70
Conteúdo calórico (Kcal)	1.210	690
Conteúdo calórico (MJ)	5,10	2,90

Fonte: Adaptado de Zicarelli, 2001

O leite bubalino difere do bovino, pois contém maiores teores de proteína, gordura, minerais como cálcio e fósforo, bem como maior teor de lactose. A ausência de β -caroteno no leite desses animais é outra notável característica, que confere cor branca peculiar. A acidez titulável do leite de búfala é outra característica importante, e seus valores são mais elevados que os encontrados no leite bovino (MACEDO et. tal., 2001).

Este leite é cerca de 40 – 50% mais produtivo na elaboração de derivados (queijos, iogurte, doce de leite, etc.) que o leite de bovino (Tabela 2). Por conter maior teor de gordura, são necessários apenas 14 litros de leite de búfala para produzir 1 kg de manteiga, ao passo que para obter a mesma quantidade de manteiga com leite de vaca bovina, são necessários mais de 20 litros. Com apenas 5,0 litros de leite de búfala pode-se obter 1 kg de *Mozzarella* de alta qualidade, onde são necessários de 8 a 10 litros de leite de vaca para produzir a mesma quantidade de queijo (SILVA et al., 2003).

Tabela 2. Rendimento industrial de leite de búfala e vaca

Derivado	Volume de leite/quilo de produto		Rendimento Búfala/Vaca (%)
	Búfala	Vaca	
Iogurte	1,20	2,00	40
Mozzarella	5,50	8,0-10,0	29
Provolone	7,43	8,0-10,0	20
Queijo Marajó	6,00	10,0-12,0	41
Doce de leite	2,56	3,50	29

Fonte: Adaptado de Silveira et al., 2003.

2.3 Alergia x Intolerância

Os efeitos adversos que certos alimentos podem causar quando consumidos por alguns indivíduos são conhecidos e relatados desde séculos a Antiguidade (CARVALHO, 2001). Equivocadamente tem se considerado alergias e intolerâncias alimentares como sinônimos (ANGELIS, 2006).

Alergia e intolerância são representadas por reações adversas à ingestão de qualquer alimento ou aditivo alimentar. Estas reações adversas podem ser classificadas em tóxicas e não tóxicas. As reações tóxicas são aquelas que independem da sensibilidade individual e ocorrem a partir da ingestão de determinadas substâncias, como: toxina bacteriana, alimentos com propriedades farmacológicas e por fim doenças metabólicas (BRASIL, 2008).

As reações não tóxicas são aquelas que dependem de uma susceptibilidade individual e podem ser classificadas em: imunomediadas (alergia alimentar) e não imunomediadas (intolerância alimentar) (OLIVEIRA, 2013). A falta de correta distinção entre os termos intolerância e alergia é comum, sobretudo entre os profissionais da área da saúde que são responsáveis pelo tratamento de ambas às patologias (OLIVEIRA, 2013).

2.3.1 Intolerância

São descritas como intolerâncias alimentares qualquer resposta diferente a um aditivo ou alimento, sem que haja intervenções imunológicas. Dentre as intolerâncias alimentares se destaca a intolerância à lactose (IL), frequentemente encontrada na prática pediátrica. De forma geral distinguimos IL de Alergia a Proteína do Leite com a incapacidade de absorver a lactose (SPERIDIÃO & FAGUNDES, 2005).

A IL é uma patologia comum em diversas populações nas mais variadas faixas-etárias (PRETTO et al., 2002). É uma afecção da mucosa intestinal (intestino delgado) que incapacita a digestão da lactose e absorção deste carboidrato da dieta (PEREIRA E FURLAN, 2004). A má absorção da lactose ocorre por conta da inatividade ou ineficiência da enzima β -D-galactosidase, também conhecida por lactase (CARROCCIO et al., 1990).

Pessoas intolerantes à lactose muitas vezes confundem intolerância com alergia, pois os sintomas de ambas são parecidos (PRAY, 2000). Os métodos diagnósticos utilizados para verificar a intolerância à lactose podem ser realizados através de exames de sangue, urina, hidrogênio expirado, ou através da avaliação de material genético (BULHÕES et al., 2007).

O consumo de leite e derivados por pessoas intolerantes varia de acordo com o nível de intolerância. Geralmente pessoas intolerantes ao leite de vaca podem consumir fermentados lácteos e leite hidrolisado (KIM; GILLILAND, 1983).

Pessoas com IL podem consumir lácteos e derivados quando utilizado de suplementação para lactose, vários são os tipos de suplementação para pessoas intolerantes. Cápsulas de lactase e lactase líquida já estão disponíveis no mercado a fim de minimizar os efeitos causados pela ausência ou pouca eficiência da lactase (PRAY, 2000).

Outra proposta para minimizar os efeitos causados pela intolerância à lactose consiste no uso de alimentos funcionais contendo culturas probióticas e prebióticas. Culturas probióticas, por exemplo, pode garantir maior atividade enzimática, no caso de intolerantes, maior atividade da enzima lactase (SAAD, 2006).

2.3.2 Alergia

As reações não tóxicas imunomediadas, recebem o nome de alergia. Diferentemente da intolerância, a alergia ocorre devido às reações com o componente proteico do leite, provocando liberação de anticorpo, histaminas e outros agentes defensivos (ANTUNES e PACHECO, 2009).

A alergia, portanto, são reações adversas aos alimentos, dependentes de intervenção imunológica, podendo ser classificadas de acordo com o mecanismo imunológico subjacente em: IgE mediada, reações mistas e não IgE mediadas. Os sintomas possuem amplo espectro e inclui manifestações gastrointestinais, cutâneos e sistêmicos (BRASIL, 2012).

Dentre as alergias, oito alimentos são responsáveis por 90% das reações alérgicas alimentares; leite, ovo, amendoim, frutos do mar, peixe, castanhas, soja e trigo. Dos quais, a alergia a proteína do leite de vaca (APVL) é a mais frequente (OLIVEIRA, 2013).

A APVL ocorre principalmente nos três primeiros anos de vida (HENRIKSEN et al., 2000). Em países desenvolvidos, APLV afeta entre 2% e 7,5% das crianças, especialmente nos primeiros meses de vida (VEIRA et al., 2004). Em um inquérito epidemiológico, realizado em consultórios de gastroenterologistas pediátricos das regiões sul e sudeste do Brasil, 7,4% de 9.478 crianças apresentaram suspeita de alergia alimentar, relacionada ao leite de vaca em 77% dos casos (VIEIRA et al., 2005). Neste estudo, a incidência e a prevalência da suspeita de APLV, calculadas através dos diagnósticos relatados pelos médicos entrevistados, foram respectivamente 2,2% e 5,7%, embora não se conheçam os métodos de diagnósticos aplicados em cada caso (VIEIRA et al., 2005)

A APVL ocorre quase sempre em crianças geneticamente predispostas, afetando de forma significativa o bem-estar da criança e da família (BRASIL, 2012). As doenças alérgicas vêm sendo apresentadas como uma característica da herança poligênica, a qual é transmitida pelos genes dos pais, sendo assim responsável por 50 – 80% em crianças que apresentam histórico familiar positivo e cerca de 20% para aquelas que não possuem quadro clínico favorável em seus antecedentes (FERREIRA et al., 2007).

Dentre os fatores que mais afetam o desenvolvimento da APVL na infância, estão a permeabilidade da barreira do trato gastrointestinal, a predisposição genética e a imaturidade fisiológica do sistema imunológico e do aparelho digestivo, inerente às crianças nos primeiros dois anos de vida (PEREIRA & SILVA, 2008).

Dentre as proteínas do leite de vaca as de maior poder alergênico estão a caseína, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, globulina e albumina sérica bovina, podendo causar tanto reação alérgica IgE mediadas quanto não IgE mediadas (MORAIS et al., 2010).

O mecanismo fisiopatológico pelo qual se desenvolve a alergia alimentar envolve, além dos antígenos, processos de fundamental importância, como a permeabilidade da barreira do trato gastrointestinal e a predisposição genética individual (MORAIS & NETO, 2003). A imaturidade fisiológica do aparelho digestor, inerente aos dois primeiros anos de vida e o sistema imunológico também imaturo nessa faixa etária, são fatores importantes para que o desenvolvimento da APLV na infância se estabeleça (MORAIS & NETO, 2003; VIEIRA et al., 2004).

O diagnóstico da APLV deve ser realizado de forma criteriosa, já que seu tratamento se baseia na exclusão completa de leite de vaca e derivados da dieta, ou seja, importantes fontes de nutrientes, como o cálcio (MEDEIROS et al., 2004) . A eliminação do leite de vaca sem substituição adequada pode prejudicar o crescimento normal e a qualidade nutricional da alimentação, com possibilidade de repercussões clínicas, razão pela qual se ressalta a importância da avaliação continuada, não só da ingestão alimentar, mas também do estado nutricional das crianças, durante todo o período de dieta de exclusão (MEDEIROS et al., 2003; CORTEZ et al., 2007).

2.4 Sínteses das proteínas do leite

As principais proteínas do leite incluem a caseína, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, soroalbumina e imunoglobulinas. Todas as principais proteínas do leite (exceto soroalbumina e imunoglobulinas) são sintetizadas por células epiteliais na glândula mamária a partir de

aminoácidos (AA) extraídos do sangue. A caseína é uma fosfoproteína relativamente hidrofóbica encontrada na forma de micela (DEPETERS & CANT, 1992) e é sintetizada a partir das células epiteliais da glândula mamária. Observa-se na Tabela 3 que este grupo de proteínas representa em torno de 80% do total de proteína verdadeira do leite segundo Lapierre et al (2012).

Tabela 3. Características bioquímicas das proteínas do leite

Proteínas	Porção (%) do total de proteínas
α -caseína	45 – 55
κ -caseína	8 – 15
β -caseína	25 – 35
λ -caseína	3 – 7
α -lactoalbumina	2 – 5
β -Lactoglobulina	7 – 12
Soroalbumina	0,7 - 1,3
Lactoferrina	0,2 - 0,8

Fonte: Adaptado de Lapierre et al., 2012

As micelas têm aproximadamente 140 nm de diâmetro. Elas são compostas de α , β e κ caseína. A α -caseína apresenta diferentes formas multifosforiladas (α -S2, α -S3, α -S4, α -S5 e α -S6). A β -caseína é a maior caseína do leite. A κ -caseína está distribuída por toda a micela de caseína e atua estabilizando-a. A λ -caseína está composta por fragmentos da β -caseína que são liberados pela digestão da plasmina enquanto o leite está na glândula mamária (LARSON & SMITH, 1978).

A caseína, a β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina correspondem a 95% das proteínas do leite, sendo sintetizadas no úbere. Já a soroalbumina, as imunoglobulinas e a λ -caseína não são sintetizadas no úbere e simplesmente são filtradas do sangue (FONSECA, 1995).

As três possíveis origens dos precursores sanguíneos das proteínas sintetizadas pela glândula mamária são;

1) peptídeos: sua concentração no plasma sanguíneo é inferior à quantidade necessária para fornecer 10% dos AA que formam as proteínas sintetizadas na glândula mamária;

2) proteínas do plasma: fornecem menos de 10% da proteína sintetizada na glândula mamária.

3) AA livres: a maior parte do nitrogênio utilizado para a síntese das proteínas do leite é proveniente dos AA livres absorvidos pela glândula mamária (GOFF et al., 1992).

As proteínas do leite são sintetizadas nas células alveolares a partir de AA derivados do pool sanguíneo (KNIGHT et al., 1994). Os AA podem ser classificados em essenciais e não essenciais, sendo que os primeiros necessitam vir do sangue, enquanto os não essenciais são produzidos pelas próprias células secretoras (GOFF et al., 1992).

É frequentemente postulado que a disponibilidade de AA essenciais pode limitar a síntese de proteína do leite e afetar sua produção. A metionina em particular, mas também a finilalanina, histidina, lisina e treonina têm sido consideradas como possíveis limitantes, sendo que a suplementação destes AA na forma *bypass*, normalmente produz um aumento na produção de leite (HOLMES & WILSON, 1998).

A absorção de AA não essenciais é mais variável do que a de AA essenciais, sugerindo que a glândula mamária não é completamente dependente de precursores do plasma para AA não essenciais. Alguns dos AA não essenciais são absorvidos, como AA livres, a partir do sangue, sendo que outros são sintetizados na glândula mamária (FONSECA, 1995). Esta síntese fundamentalmente consiste em interconversão entre diferentes AA ou síntese a partir de esqueletos de carbono, de carboidratos ou ácidos graxos, para formar, em quantidade suficiente, os AA necessários (FONSECA, 1995).

O retículo endoplasmático rugoso das células secretoras é local de síntese das proteínas do leite. Toda informação genética da proteína está contida no DNA presente no núcleo da célula. No DNA há o molde para síntese de uma fita de RNA que guarda a sequência de AA para as proteínas. Depois de sintetizadas as proteínas são transportadas até o lúmen por vacúolos presentes no citoplasma (GOFF et al., 1992).

As proteínas do leite são sintetizadas pelo retículo endoplasmático rugoso e passam para o complexo de Golgi (GOFF et al., 1992).

Goff et al. (1992) descreveram que a maneira pela qual este movimento ocorre não está totalmente definida. Possivelmente as cadeias peptídicas atravessam o lúmen do retículo

endoplasmático rugoso diretamente para o complexo de Golgi, ou ocorrendo à formação de vesículas fora do retículo endoplasmático rugoso que migram e fundem-se com o complexo de Golgi (GOFF et al., 1992). O complexo de Golgi migra para a membrana apical onde se funde com a membrana plasmática. Então ocorre o processo de pinocitose reversa, onde as proteínas são liberadas para o lúmen do alvéolo (GOFF et al., 1992).

Neste ponto, o aparelho de Golgi torna-se parte da membrana plasmática, servindo de reparo da membrana plasmática perdida durante a formação e secreção de gotículas de gordura (GOFF et al., 1992).

2.5 β -caseína

O grupo das caseínas representa cerca de 75% a 85% das proteínas lácteas. Na maioria das espécies de mamíferos, quatro diferentes proteínas compõem o grupo das caseínas, sendo elas α -caseína s_1 , α -caseína s_2 , β -caseína e κ -caseína (PEREIRA et al., 2016).

A β -caseína é a segunda proteína mais abundante no leite, além de ser crucial para a estrutura micelar da caseína. Apresenta estado polimórfico e constitui-se de 209 AA, que se dividem em 13 variantes: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G (VERCESI, 2012). Sendo estas as variantes identificadas nos bovinos.

O leite mais consumido no Brasil é o de vaca e neste produto a β -caseína representa aproximadamente 30% do total de proteínas contidas e de acordo com a genética do animal serão expressas no leite as variantes β -caseína A1 e/ou A2, originando a denominação leite A1 (o qual haverá apenas β -caseína A1 ou uma mistura de β -caseína A1 e A2) e leite A2 (no qual haverá apenas β -caseína do tipo A2) (BARBOSA et al., 2019).

O que diferencia essas duas variantes genéticas da β -caseína é a substituição de apenas um aminoácido na posição 67 dos 209 AA que compõem esta proteína. A β -caseína A1(β A1) apresenta um resíduo de histidina (His⁶⁷), enquanto a β -caseína A2 (β A2) apresenta um resíduo de prolina (Pro⁶⁷), conforme apresenta Figura 1.

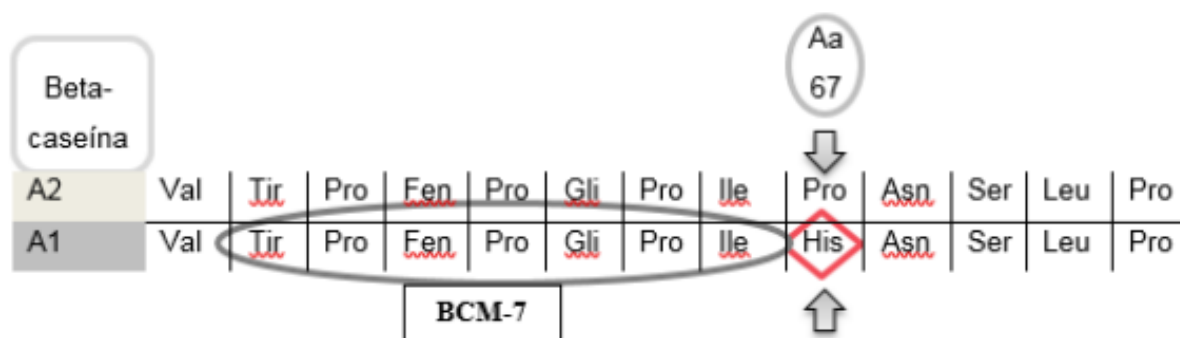


Figura 1. Fragmento das variantes genéticas β -caseína A1 e A2 bovinas, destacando a diferenciação de AA na posição 67.

Fonte: Pal et al., 2015.

Embora a diferença na estrutura seja sutil, estas variantes de β -caseína são digeridas de forma diferente. A His⁶⁷ favorece a liberação do peptídeo opioide β -casomorfina-7 (BCM-7), durante sua digestão gastrointestinal. Por outro lado, a presença do resíduo de aminoácido Pro⁶⁷ na β A2 não a torna suscetível a esta liberação, ou seja, não ocorre à liberação do BCM-7 ou ocorre em quantidades muito pequenas, gerando o peptídeo β -casomorfina-9 (BCM-9) (KOSTYRA, 2004).

Literaturas como Barbosa et al. (2019), Brooke-Taylor S. et al. (2017), Depeters & Cant (1992) e Hamosh et al. (1989), afirmam que a decisão por consumir apenas β A2 é factível dentro de uma dieta com consumo de leite de cabra, ovelha e búfala visto que a mutação genética do alelo que codifica a produção de β A1 só foi observada, até o momento, em rebanhos bovinos. O consumo de leite proveniente de rebanhos geneticamente caracterizados e que são certificados como livres da expressão da β A1 seria a outra possibilidade (BROOKE-TAYLOR S. et al., 2017), conhecidos como leite A2A2.

Recentemente no Brasil passou a ser comercializado o leite obtido de vacas A2. Na Austrália, Reino Unido, Estados Unidos, Nova Zelândia, Holanda e em diversos outros países o mesmo produto é comercializado com indicação de consumo por pessoas com histórico de desconforto gastrointestinal decorrente do consumo de leite de vaca (BARBOSA et al., 2019).

2.5.1 Liberação de BCM-7

A ação das enzimas digestivas sobre a β A1 pode liberar peptídeos bioativos, como o peptídeo opioide BCM-7 (BOUTROU et al., 2013), cuja sequência aminoacídica está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Sequência de AA das β -casomorfina bovinas

β -casomorfina	Fragmentos	Estrutura
BCM-5	β -CNf (60-64)	Tir-Pro-Fen-Pro-Gli
BCM-7	β -CNf (60-66)	Tir-Pro-Fen-Pro-Gli-Pro-Ile
BCM-9	β -CNf (60-68)	Tir-Pro-Fen-Pro-Gli-Pro-Ile-Pro-Asn

Fonte: Adaptado de Brooke-Taylor et al., 2017.

Opioides são substâncias químicas com atividade semelhante à de morfina que têm atividade tanto no sistema nervoso central como em órgãos periféricos (LEBRUN, 2009). No trato gastrointestinal podem agir diminuindo a motilidade intestinal, aumentando a absorção de água, inibindo a secreção gástrica e estimulando a contração da vesícula biliar (LEBRUN, 2009).

A ocorrência de BCM-7 advindo do consumo de leite bovino será dependente da proporção de β -caseína A1 e A2 e possivelmente de condições gastrintestinais específicas dos indivíduos. Destaca-se que este peptídeo bioativo além de apresentar efeitos locais no trato digestório, poderá ser absorvido e atingir o sistema nervoso central, sendo esta absorção possivelmente maior em estados de hiperpermeabilidade intestinal (NONI, 2018).

A BCM-7 também pode ser encontrada em derivados do leite A1, tais como iogurte e queijos (NONI, 2008), embora sejam propostos que certos micro-organismos presentes nestes produtos teriam a capacidade de hidrolisar o BCM-7 até peptídeos menores ou mesmo em AA (NONI, 2008). Ainda não foi demonstrado se tais microrganismos também apresentam similar influência dentro do trato gastrintestinal (NGUYEN et al., 2014). Pode ser prospectado ainda, o potencial da microbiota intestinal humana em hidrolisar peptídeos bioativos, incluindo aqueles com atividade opioide (NGUYEN et al., 2014).

A β -caseína presente no leite humano corresponde à variante genética A2 bovina, ou seja, com uma prolina na posição equivalente na cadeia polipeptídica, conforme a Figura 2. Neste contexto, durante a digestão do leite humano pode ser observada formação de peptídeos bioativos, porém com diferente sequência de AA em relação ao BCM-7 bovino (HAMOSH, HONG, e HAMOSH, 1989) e mais fraca atividade opioide.

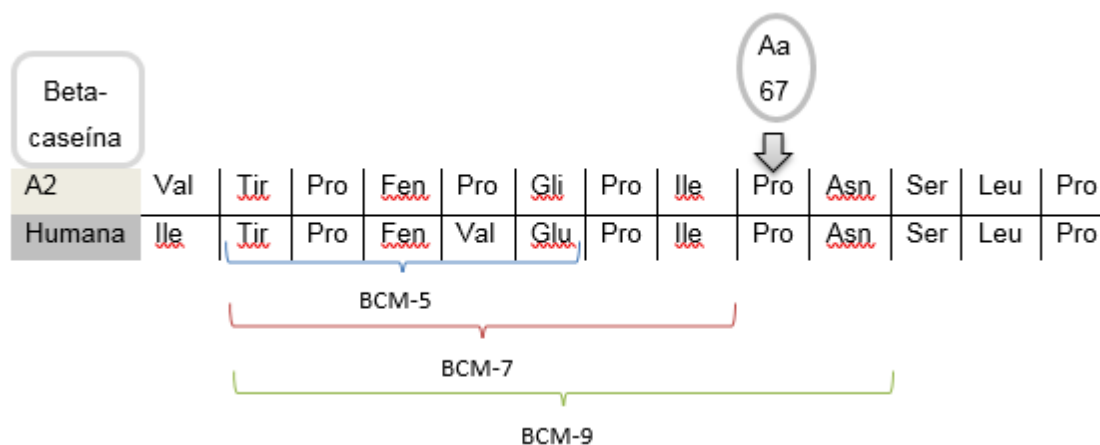


Figura 2. Fragmentos das variantes β -caseína A2 bovina e do leite humano, destacando prolina na posição 67 de ambas variantes.

Fonte: Adaptado de Pal et al., 2015.

BCM-9 é o peptídeo disponibilizado a partir da β -caseína A2, visto que a β -caseína A1 contém histidina na posição 67, tornando este um ponto de clivagem para formação de BCM-7 (WOODFORD, KUKULJAN, e HO, 2015). Esse peptídeo exibe propriedades opioides, mas com aproximadamente um quarto da afinidade do BCM-7 para receptores γ -opioide (BROOKE-TAYLOR, 2017).

2.6 Seleção Genética e CSN2

A β -caseína é uma proteína que em mamíferos é codificada pelo gene CSN2. É da classe das fosfoproteínas e geralmente ocorre no leite de mamíferos (ASCHAFFENBURG & SEN, 1963).

Historicamente, a β A2 é a forma original da proteína, pois está presente no rebanho bovino desde sua domesticação há milhares de anos. A β A1 surgiu decorrente de uma mutação genética transversa, há aproximadamente 5.000 – 10.000 anos, e espalhou-se com a reprodução dirigida dos animais para o aumento da produção leiteira, e com a migração dos rebanhos no processo de colonização pelo homem (NONI, 2008). Esta é considerada uma mutação ao acaso (WOODFORD et al., 2015).

A aptidão de um animal em produzir leite tipo A1 ou tipo A2, pode ser determinada por meio da análise do seu perfil genético. A caracterização do perfil genético é realizada utilizando material biológico (pelos, sangue, swab) do próprio animal, ao invés do leite produzido (BARBOSA et al., 2019).

A compreensão da estrutura genômica populacional é importante para os estudos de predição genômica, seleção e associação, podendo auxiliar nas decisões dos acasalamentos dentro dos programas de melhoramento genético (BARBOSA et al., 2019).

Com tais informações, o potencial genético de um animal poderá ser determinado com maior precisão antes mesmo da expressão do seu fenótipo (REGITANO & COUTINHO, 2001), auxiliando sobremaneira o melhoramento genético assistido dos rebanhos. Por isso, realizar exames genéticos em animais logo que entram no rebanho permite direcionar seu manejo (BARBOSA et al., 2019).

3 METODOLOGIA

Este projeto é uma análise descritiva e exploratória que realizou a identificação da sequência de β -caseína bubalina.

Aprovação pelo CEUA

O projeto de pesquisa PROTEINAS ALERGENICAS DO LEITE: ESTUDO EXPLORATORIO SOBRE A BETA-CASEINA A1 E A2 EM BUFALOS LEITEIROS, encaminhado para análise em 29/10/2019, foi aprovado no(a) Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com o seguinte parecer:

A Comissão De Ética No Uso De Animais (CEUA) aprovou o projeto em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 12 búfalos (machos e fêmeas, diversas idades), provenientes do rebanho da Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

3.1 Local e Rebanho do Estudo

O trabalho foi realizado na Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA – UFRGS), localizada no município de Eldorado do Sul – RS, a uma distância de 12 km da capital Porto Alegre (Figura 3). A fazenda experimental possui uma área de 1.560 hectares e tem clima subtropical temperado. Ela está situada na região climática da Depressão Central, entre as latitudes de 30° 04' 30" S e 30° 07' 30" S e as longitudes de 51° 39' 18" W e 51° 42' 18" W. Na EEA/UFRGS predomina vegetação de campos (campos mistos), infestados por barba-de-bode (*Aristida jubata*). A vegetação alta é arbustiva, representada, principalmente, por capões isolados de mirtáceas (MELLO et al, 1996).



Figura 3. Localização da EEA UFRGS em relação a Porto Alegre.

Fonte: Google Maps (Acesso em: 20 nov. 2019)

O rebanho estudado é composto por 12 animais, sendo 8 búfalas, tendo uma aproximadamente 20 anos de idade e as outras entre 2 a 5 anos, 1 búfalo reprodutor com 2,5 anos de idade e 2 bufalinos com ainda incompletos 1 ano de idade, sendo eles de mestiços nas raças Mediterrâneo e Murrah (Figura 4). Na EEA o sistema de produção destes animais é a pasto, sendo caracterizado por Bioma Pampa, campo nativo. A dieta de volumoso difere de acordo com a estação do ano, tendo maior disponibilidade na primavera e verão. No entanto, quando não atendido as exigências nutricionais no sistema extensivo, os animais são suplementados com silagem de milho produzido na EEA no inverno e outono.



Figura 4. Rebanho Bubalino da Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Fonte: Gimnecki R., 2019

3.2 Coleta de amostras

Pensando em causar o menor efeito estressante aos animais, a coleta de sangue foi realizada junto ao manejo mensal de pesagem no mês de setembro. Os animais foram conduzidos a pé pelos dois funcionários responsáveis pelo manejo dos bubalinos na EEA, sem necessidade de vocalização, somente com auxílio de bandeiras. O centro de manejo que foi utilizado é próprio para bovinos e bubalinos, conferindo maior segurança para os animais e para os manipuladores durante o procedimento. Os animais foram conduzidos até o tronco de contenção, esta que foi realizada na cervical dos animais, garantindo que eles se movam o menos possível (Figura 5).



Figura 5. Contenção dos animais para coleta de sangue na veia caudal.

Fonte: Produção da própria autora, 2019

Para amostragem, foi necessário coletar um volume de no mínimo 1ml e no máximo 2ml de sangue. Conforme apresenta figura 3, a coleta foi realizada na veia caudal e o sangue foi depositado em tubos EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (Figura 6). Estes foram devidamente identificados (Tabela 5) com o número do animal e armazenados em caixa de isopor refrigerada para transporte até o laboratório para extração de DNA.

Tabela 5. Identificação dos animais e locais da coleta de sangue

Identificação do animal	Categoria Animal	Peso (kg)	Identificação do tubo	Local da coleta
6	fêmea	428	1	caudal
1	fêmea	564	2	mamária
5	fêmea	417	3	não coletado
2	fêmea	462	4	mamária
9	fêmea	350	5	caudal
844	touro	600	6	caudal
7	fêmea	391	7	caudal
11	terneiro	180	8	oricular
8	fêmea	402	9	caudal
3	fêmea	504	10	caudal
10	terneiro	157	11	oricular
4	fêmea	514	12	caudal

Fonte: Produção da própria autora, 2019

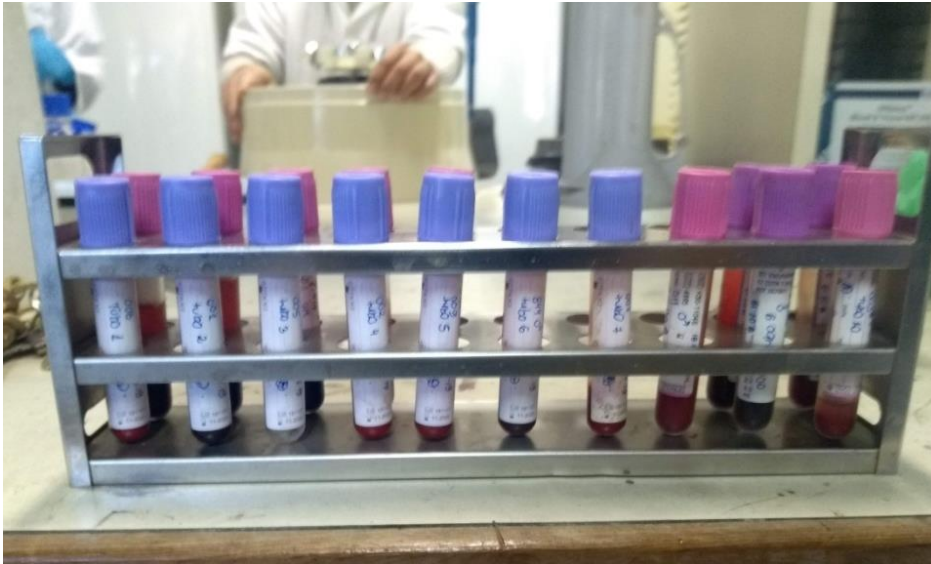


Figura 6. Amostras de sangue do rebanho bubalino EEA coletado em tubos EDTA.

Fonte: Produção da própria autora, 2019

3.3 Extração de DNA

O isolamento do DNA foi realizado no Laboratório de Citogenética e Evolução do Departamento de Genética da UFRGS, a partir do sangue coletado de cada animal experimental, totalizando 11 amostras de sangue, conservados a 18°C em tubos com EDTA – ácido etilendiamino tetra-acético, utilizando o kit de extração de PureLink® Genomic DNA (Invitrogen, Life Technologies), seguindo instruções do fabricante.

A integridade do DNA extraído foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1,0% em TBE 1x (TRIS 0,089 M, ácido bórico 0,089 M e EDTA 0,5 M), por 25 minutos a 100 V, com aplicação de 3 a 4µL de DNA extraído com 1µL do corante não mutagênico safer para eletroforese K9-16C KASVI®. As bandas de alto peso molecular foram reveladas e fotografadas sob luz UV usadas para controle dos resultados positivos.

3.4 Primers

Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na amplificação do gene CSN2 foram: 5'CTGGCTTTCAGTAAAGGGCTCAACTG3' sendo o primer direto e o 5'TGACCCCAATTTCTTAACCAAACCAA3' o primer reverso. Este primer foi descrito por Vercesi Filho et al. (2012), compreendendo uma região parcial do íntron 6 e éxon 7 do gene e

amplificando uma região de 389pb. A diluição foi feita para uma concentração final de 2pmol/ μ L.

4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As sequências foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR. polymerase chain reaction), onde foi utilizado 1 μ L de DNA, na concentração de aproximadamente 200 pmol/ μ L, adicionados a 19 μ L do mix de reação composto pelos seguintes reagentes: 2,0 μ L de Tampão; 1,5 μ L MgC12; 0,2 μ L de dNTP; 0,2 μ L de cada primer; 0,2 μ L de Taq e 14,7 μ L água.

O programa usado para termociclagem na amplificação dos fragmentos alvo foi seguida de 35 ciclos com as seguintes etapas: etapa 1 (desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos), etapa 2 com 3 fases (desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto), etapa 3 (extensão final a 72°C por 7 minutos) e interrupção. O produto da PCR foi verificado em gel de agarose 1% juntamente com o LADDER de 100 pb da Ludwig® (Figura 7). A purificação foi feita com as enzimas Exosap® através de instruções do fabricante.

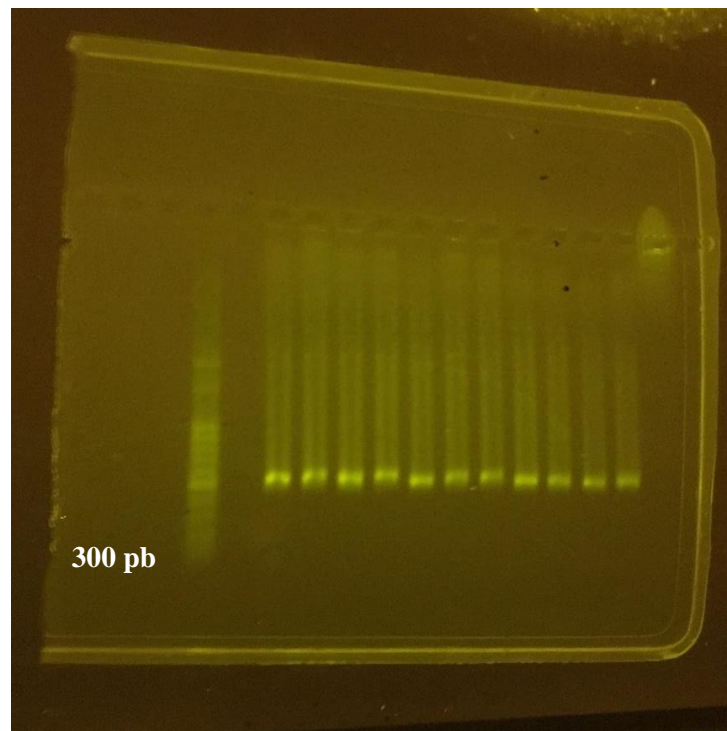


Figura 7. Produto da PCR em gel agarose 1% com o LADDER da Ludwig®, com banda de 300 pb.

Fonte: Valenzuela B., 2019.

3.6 Sequenciamento

As reações de PCR foram enviadas para a empresa Macrogen, localizada na Coreia do Sul, para sequenciamento, com os mesmos primers utilizados na amplificação, no sequenciador automático 3730XL DNA Analyzer, da Applied Biosystems®.

3.7 Análises das sequências

No alinhamento das sequências utilizou-se os Software BioEdit 7.2 (HALL, 1999) e o MEGA v10 (TAMURA et al., 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tubos com as amostras de sangue coletadas foram enumerados de 1 a 12 (Tabela 5), com exceção da amostra do tubo 3, o qual não foi possível realizar a coleta de sangue. O sequenciamento realizado nessas amostras está apresentado na Figura 8. No sequenciamento alinhado, foram adicionadas outras 9 sequências obtidas a partir do GenBank (Anexo I). Estas representam 6 espécies diferentes com a mesma região de interesse, exon 7 do gene CSN2. As amostras foram comparadas com as sequências dos aminoácidos das 6 espécies.

A Figura 8 apresenta o resultado do alinhamento. Nenhuma amostra apresentou mutação para histidina (H) na posição 67, a variante β -caseína A1 de bovinos. Ao invés disso, foram observadas prolina (P) nesta mesma posição.

Dentre as 11 amostras, somente 9 e 12 apresentaram heterozigose para aspargina (N) na posição 68, sendo assim alelo AB (Fig. 9). As demais amostras apresentaram mutação de aspargina (N) para lisina (K), também na posição 68 (Fig. 8).

Species/Abbrv	Gro	*	*	67	68	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
1. 01		P	I	P	K	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
2. 02		P	I	P	K	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
3. 04		P	I	P	K	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
4. 05		P	I	P	K	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
5. 06		P	I	P	K	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
6. 07		P	I	P	K	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
7. 08		P	I	P	K	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
8. 09		P	I	P	N	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
9. 10		P	I	P	K	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
10. 11		P	I	P	K	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
11. 12		P	I	P	N	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
12. Bubalus bubalis alelo A		P	I	P	N	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
13. Bubalus bubalis alelo B		P	I	P	K	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
14. Bos indicus alelo A1		P	I	H	N	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
15. Bos indicus alelo A2		P	I	P	N	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
16. Bos taurus alelo A1		P	I	H	N	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
17. Bos taurus alelo A2		P	I	P	N	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
18. Bos grunniens		P	I	P	N	S	L	P	Q	N	I	P	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
19. Ovis aries		P	I	P	N	S	L	P	Q	N	I	L	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E
20. Giraffa camelopardalis		P	I	P	H	S	L	P	Q	N	I	L	P	L	T	Q	T	P	V	V	V	P	P	F	L	Q	P	E

Figura 8. Sequência de aminoácidos a partir da posição 65 dos animais amostrais comparadas com amostras do GenBank, para comparação das mutações na posição 67.

Fonte: Valenzuela B., 2019.

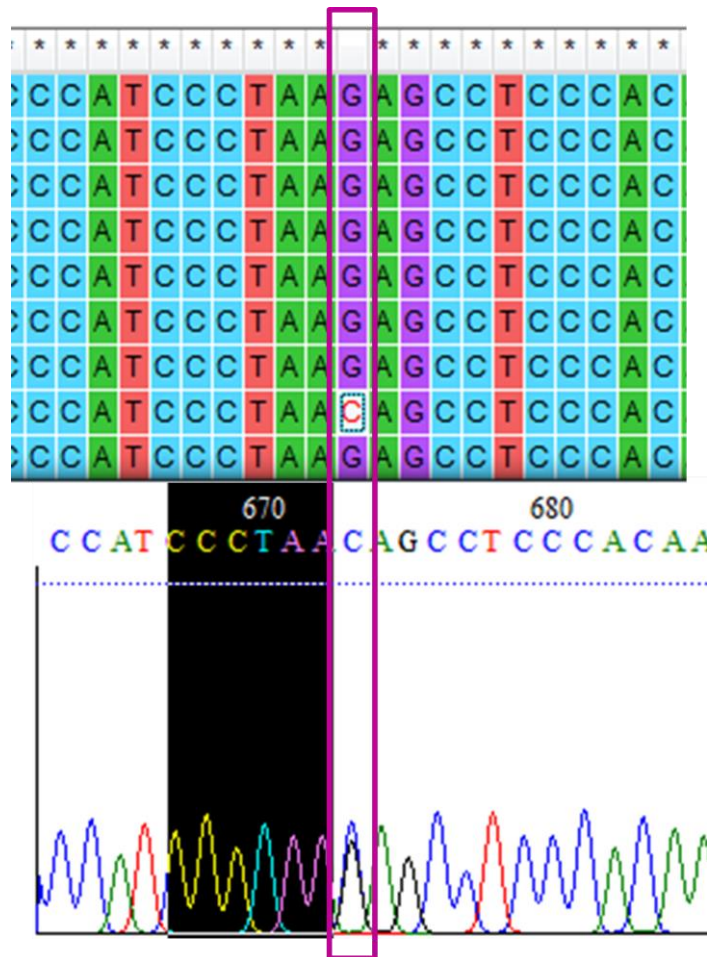


Figura 9. Pico sobreposto de duas bases nitrogenadas (citosina e guanina) na posição 68, demonstrando heterozigose na amostra 9.

Fonte: Valenzuela B., 2019.

Portanto, todos os animais apresentam para variante de β -caseína A bubalina, uma variante semelhante à apresentada em bovinos como β -caseína A2.

Visando compreender esta variante da β -caseína na espécie estudada em questão, e identificando esta como uma variante ancestral é correto afirmar que esta variante da β -caseína em bubalinos, seja denominada como β -caseína A, assim como identificado por Ferranti et al. (1998).

Quando comparado à amostra de búfalo do GenBank *Bubalus bubalis* alelo B, apresenta a mesma troca de base AA que os animais experimentais apresentaram, com a troca de base de asparagina (N) para lisina (K). Esta troca de bases da β -caseína é reconhecida em literatura como uma variante intitulada β -caseína B por Ferranti et al., (1998).

Ferranti et al. (1998) relatou a variante B como uma variante comum às populações italiana e venezuelana bubalinas, enquanto a variante A era encontrada apenas na população venezuelana de búfalos, relatando ter encontrado apenas em um rebanho de 50 animais localizados na Venezuela.

A comparação da sequência de AA das variantes de β -caseína do búfalo aquático com os bovinos (Swaisgood, 1982), ovinos (Richardson e Mercier, 1979), caprinos (Roberts et al., 1992), humanos (Greenberg et al., 1984) e os camelos (Kappeler et al., 1997) feitas por Ferranti et al., (1998), são apresentadas na Figura 10.

Como as variantes de caseína β -caseína A1 e β -caseína A2 bovina contêm His⁶⁷ (β A1) e Pro⁶⁷ (β A2), respectivamente, isso faz com que as variantes de búfalo sejam filogeneticamente semelhantes às bovinas variantes β -caseína A2. Assim como os resultados encontrados neste presente estudo.

	51	60	70	80	90	100
water buffalo B	PFAQTQSLVY	FFPGPI	IKS.LPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEIMGVSKVKE			
water buffalo A	-----	-----	N,-----			
bovine A ₂	-----	-----	N,-----		V-----	
bovine A ₁	-----	-----	HN,-----		V-----	
ovine	-----	-----	AN,-----	L-----		P-----
caprine	-----	A-----	N,-----	L-----		P-----
human	-SF-P-P-I-	VE--	YGF----	L--A-PA--L-	VP-----	E-P-A-D
camel	T-P-P----	SHTE--	YPI----	FL-PL-PA-M-	-----	KV-D-P-T--

Figura 10. Composição da sequência de aminoácidos de búfalos para β -caseína comparada com as proteínas de bovino, ovino, caprinos, humanos e camelo.

Fonte: Adaptado de Ferranti et al., 1998

Em estudo com crianças, Villares et al. (2006), avaliou a evolução do crescimento de 141 lactentes, com idade de 1 e 6 meses, e a APLV isolada ou associada a outras alergias alimentares. Os lactentes receberam leite materno exclusivo até o momento do diagnóstico da APLV (3,8 meses com idade média de 1,5 meses) e posteriormente o leite materno associada a fórmula infantil (fórmula de soja ou hidrolisado proteico). Quando comparado o grupo de pacientes que só apresentaram APLV com os que tinham alergia a outros alimentos observou-se, uma diferença significativa para o peso no momento do diagnóstico, com um e aos dois anos. Os resultados mostraram que crianças com APLV isolada e que receberam fórmulas de substituição apresentaram, aos dois anos, um desenvolvimento pondero-estrutural similar à de uma população sadia (VILLARES et al., 2006). No entanto o trabalho não abordou o uso de lácteos de outras espécies de mamíferos, como búfalos, cabras e ovelhas.

Assim como Medeiros et al. (2004) comparou o estado nutricional de 26 crianças, com média de idade de 19,1 meses, que recebiam dieta isenta de leite de vaca e derivados, a 30 crianças com média de idade de 16,8 meses, sem nenhum tipo de restrição alimentar. Os autores observaram que, o consumo de energia, lipídio, proteína, carboidrato, cálcio e fósforo, foi menor para o grupo de crianças com dieta restritiva quando comparada ao grupo controle. Em adição, o grupo em dieta isenta de leite de vaca e derivados, apresentou maior número de crianças com déficit, comparada ao grupo controle para todos os índices: escore estatura/idade, peso/estatura (MEDEIROS et al., 2004). Este trabalho não relatou como alternativa a inclusão de alimentos lácteos de outras espécies.

Christie et al. (2002), comparou o consumo de 98 crianças com alergia alimentar (com média de idade de 3,7 anos) ao de 99 crianças sem alergia (com média de idade de 4,1 anos) e observou que mais de 25% das crianças em ambos os grupos consumiram menos do que 67% das Ingestões Dietéticas Recomendadas (DRIs) para cálcio, vitamina D e vitamina E. Porém, 58% das crianças com APLV consumiram menos cálcio dietético do que as recomendações específicas para a idade quando comparadas as crianças sem APLV (46%) e, ou alergia a um único tipo de alimento (25%) (CHRISTIE et al., 2002). Este estudo também não relata alimentos lácteos de outras espécies como alternativa de consumo para crianças com APLV.

5 CONCLUSÃO

Todos os animais amostrais apresentaram em sua sequência de aminoácidos uma variante semelhante a β -caseína A2 bovina, onde na posição 67 se encontrou uma prolina. Sendo esta a β -caseína A em bubalinos.

O Rebanho Bubalino da EEA – UFRGS é produtor de leite do tipo β -caseína A e B. Sendo assim, estes animais geneticamente identificados estão aptos a produzir leite e derivados livres de uma variante da β -caseína que pode causar reações alérgicas no trato gastrointestinal de lactentes e crianças. Portanto, este rebanho, pode produzir leite e derivados para este grupo pediátrico afligido por APLV.

São necessários mais estudos para identificar o perfil de caseínas do leite de búfalas, assim como é necessário caracterizar geneticamente o rebanho brasileiro para estas proteínas. Além destes, pesquisas direcionadas ao uso de lácteos de outras espécies como alternativa na alimentação de crianças afligidas por APLV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELIS, C. (2006). Alergias alimentares: tentando entender por que existem pessoas sensíveis a determinados alimentos. *Atheneu* , 12.

ANTUNES, A. E., & PACHECO, M. T. (2009). *Leite para adultos: mitos e fatores frente à ciência*. São Paulo.

ASBIA, A. B. (2007). Alergia Alimentar. Disponível em <<http://www.sbai.org.br/publico8.htm>> , Acesso em: 1 nov. 2019.

ASCHAFFENBURG, R., & SEN, A. (1963). A Comparison of the casein of buffalo's and cow's milk. *Nature* , 797-799.

BARBOSA, M. G., SOUZA, A. B., TAVARES, G. M., & ANTUNES, A. E. (2019). Leite A1 e A2: revisão sobre seus potenciais efeitos no trato gigestório. Campinas, São Paulo, Brasil.

BERNADES, O. (novembro de 2014). Desafios na produção de leite de búfalas. Alambari, São Paulo, Brasil.

BERNARDES, O. (setembro de 2007). Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* , 293-298.

BOUTROU, R., GAUDICHON, C., DUPONT, D., & JARDIM, J. (2013). Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *American Journal Clinical Nutrition* , 14 - 23.

BRASIL. (2008). Congresso brasileiro sobre alergia alimentar: 2007. *Revista Brasileira de Alergia e Imunologia* , 31 (2), 64-89.

BRASIL. (2012). Manual de orientação para a alimentação do lactante, do pré-escolar, do escolar, do adolescente e na escola. *Sociedade Brasileira de Pediatria* (3), 148.

BROOKE-TAYLOR, S., DWYER, K., WOODFORD, K., & KOST, N. (2017). *Systematic Review of the Gastrointestinal Effects os A1 Compared with A2 β -Casein*. Acesso em 30 de setembro de 2019, disponível em Advances in Nutrition: <http://hdl.handle.net/10536/DRO/DU:30109253>

BROOKE-TAYLOR, S., DWYER, K., WOODFORD, K., & KOST, N. (18 de september de 2017). Systematic Review of the Gastrointestinal Effects of A1 Compared with A2 β -Casein. *American Society for Nutrition*. Australia.

CARVALHO, F. J. (jan/fev de 2001). Apresentação clínica da alergia ao leite de vaca com sintomatologia respiratória. *Jornal de Pneumologia*, 10.

CASTELLO, M., HEVIA, X., GÓMEZ, I., CASTRO, A. R., & RODRIGUES, C. (2004). Algumas consideraciones sobre la reacciones adversas por alimentos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 5-6.

COBRASIL. (1987). *Cortume CoBrasil*. Acesso em 3 de outubro de 2019, disponível em Cobrasil: <http://www.cobrasil.com.br/pt/nosso-processo>

DEPER, E. J. (s.d.).

DEPETERS, E. J., & CANT, J. (1992). Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A Review. *Journal Dairy Science*, 43-70.

FERRANTI, P., SCALONI, A., CAIRA, S., CHIANESE, L., MALORNI, A., & ADDEO, F. (1998). The Primary Structure of Water Buffalo α -s1 and β -casein: Identification of Phosphorylation Sites and Characterization of a Novel β -casein Variant. *Journal of Protein Chemistry*, 17, 28-38.

FERREIRA, M., COELHO, R., & TRINDADE, J. C. (2007). Prevenção primária da doença alérgica. *Acta Médica Portuguesa*, 20 (3), 215-219.

FONSECA, F. A. (1995). Fisiologia da lactação. *Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia*, 135.

GOFF, H. D., KINSELLA, J. E., & JORDAN, W. K. (1992). Influence of various milk protein isolates on ice cream emulsion stability. *Journal Dairy Science*, 72, 385-397.

HAMOSH, M., HONG, H., & HAMOSH, P. (1989). β -casomorphins: milk- β -casein derived opioid peptides. In: *Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy*. New York: Leblenthal.

HOLMES, C. W., & WILSON, G. F. (1998). Produção de leite a pasto. *Instituto Campineiro de Ensino Agrícola* , 708.

IBGE, I. B. (12 de setembro de 2018). Indicadores IBGE. *Estatística da Produção Pecuária* . Brasil.

KNIGHT, C. H., FRANCE, J., & BEEVER, D. E. (1994). Nutrient metabolism and utilization in the mammary gland. *Livestock Production Science* , 129-137.

KOSTYRA, E. (2004). Opioid peptides derived from milk proteins. *Polish Journal of Nutrition Science* , 100-112.

LARSON, B., & SMITH, V. R. (1978). Lactation, a comprehensive treatise. *Academic Press Inc* , II, 458.

LEBRUN, I. (9 de julho de 2009). Peptídeos bioativos derivados do leite e suas ações no sistema nervoso central. *Leite para adultos: mitos e fatos frente à ciência* , 206-211. Varela, São Paulo, Brasil: Antunes AEC, PACHECO MTB.

LIMA, T. C. (junho de 2014). Polimorfismo no Gene da Beta-Caseína em Rebanhos Zebu Leiteiros no Estado do Rio Grande do Norte. Macaíba, Rio Grande do Norte, Brasil.

LUIZ, V. F., SPERIDIÃO, P. G., & FAGUNDES, U. F. (2005). *Terapia nutricional nas intolerâncias e alergia alimentares*. Acesso em 30 de setembro de 2018, disponível em The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition, and Liver Diseases: http://www.egastroped.com.br/jun05/terapia_nutricional.htm

MACEDO, M. P., WECHSLER, F. S., RAMOS, A. A., & AMARAL, J. B. (2001). Composição Físico-Química e Produção do Leite de Búfalas da Raça Mediterrâneo no Oeste do Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Zootecnia* , 1084-1088.

MANSOUR, A., HOVERSTEN, M., TAYLOR, L., & WATSON, S. (1995). The cloned μ , and receptors and their endogenous ligands: Evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain Research* , 89-98.

MELLO, O., LEMOS, R., & al, e. (1996). Levantamento de uma série de solos do Centro Agrônomo. *Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária da UFRGS* , 8 (4), 7-155.

MOREIRA, L. (2006). Estudos dos componentes nutricionais e Imunológicos na perda de peso em Camundongos com alergia alimentar. *Dissertação de Mestrado em Patologia Geral*, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

NGUYEN, D. D., SOLAH, V., JOHNSON, S., CHARROIS, J., & BUSETTI, F. (2014). Isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous identification and qualification of beta-casomorphin 7 in yoghurt. *Food Chemistry*, 345-352.

NONI, I. D. (2008). Release of beta-casomorphins 5 and 7 during simulated gastrointestinal digestion fo bovine beta-casein variants and milkbased infant formulas. *Food Chemistry*, 897-903.

NONI, I. D., & CATTANEO, S. (2010). Occurrence of beta-casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and in their digests following in vitro simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*, 560-566.

NONI, R., FIZTGERRALD, H., KORHONEN, Y., ROUX, C. L., & LIVESEY, I. (2009). Scientific Report of EFSA prepared by a Datex Workig Group on the potential health impact of beta-casomorphins and related peptides. *EFSA Science Report*, 1-107.

OLIVEIRA, V. C. (2013). Alergia à proteína do leite de vaca e intolerância à lactose: abordagem nutricional e percepções dos profissionais da área da saúde. *Dissertação ao Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora*, 104.

OTAVIANO, A. R. (2006). *Polimorfismo dos genes das caseínas e sua utilização na detecção de misturas de leite bovino e bubalino*. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Jaboticabal: São Paulo.

PENNA, ALMEIDA, & OLIVEIRA. (2009). Soro de leite: Importância biológica, comercial e industrial. (Atheneu, Ed.) *Tecnologia de Produtos Lácteos Funcionais*, 21.

PEREIRA, B. P., & SILVA, C. P. (2008). Alergia a proteína do leite de vaca em crianças: repercursão da dieta de exclusão e da dieta substitutiva sobre o estado nutricional. *Revista Pediatria*, 30 (2), 100-106.

PEREIRA, D. F., & FURLAN, S. A. (2004). Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do laboratório Dona Francisca. *Revista Saúde e Ambiente* , 5 (1), 24-30.

PEREIRA, D., SILVA, P., & CARVALHO, A. (2016). *Química, bioquímica, análise sensorial e nutrição no processamento de leite e derivados*. São Paulo: Elsevier.

REGITANO, L., & COUTINHO, L. (2001). Biologia molecular aplicada à produção animal. *EMBRAPA* , 213.

RIBADEAUS-DUMAS, B., BRIGNON, G., GROSCLAUDE, F., & MERCIER, J. (1972). Structure primaire de la casein beta bovine. *Euroupe J. Biochem* , 505-514.

SCHIMDT, G. H. (1974). Biologia de la lactación. *Cornell University* , 307.

SILVA, M., Jr. LOURENÇO, H. M., ERCHESEN, R., FONSECA, R., & MELO, J. (15 de agosto de 2003). *Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores - PRONAF*. Acesso em 21 de novembro de 2019, disponível em CPATU: www.captu.Silvaetal2003.br/bufalo

UGGIONI, P. L., & FAGUNDES, R. L. (2006). Tratamento dietético da intolerância à lactose: teor de lactose em alimentos. *Higiene Alimentar* , 140 (21), 24-29.

VERCESI, A. E. (2012). Identificação de alelos A1 e A2 para o gene da beta-caseína na raça Gir Leiteiro. *IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal* , 50-56.

VIEIRA, M. C. (2004). Guia de Diagnóstico e Tratamento de Alergia a Proteína do Leite de Vaca. *Suporte* , 24-29.

WOODFORD, P. S., KUKULJAN, K. S., & HO, S. S. (2015). Milk intolerance, beta-casein and lactose. *Nutrients* , 7 (7), 285-297.

ZOCAL, R., & GOMES, A. T. (2008). Zonemaneto da Produção de Leite no Brasil. Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.