

Estimativa da Frequência do Alelo O do Gene da Alpha_{s1}-Caseína em Caprinos da Raça Saanen

Vickeline Namba¹, Maria Amélia Menck Soares^{2*}, Marcelo Teixeira Rodrigues³, Renan Baratto de Souza¹, Ana Carolina de Sousa¹, Luciana Paula Grégio D'Arce² e Eliane Gasparino³

Introdução

O leite é um fluido biológico, sendo caracterizado como um alimento fonte de cálcio e muito nutritivo. As caseínas (alpha_{s1}, beta, alpha_{s2} e kappa) formam a principal fração de proteínas em leite de ruminantes, representando 80% do total das proteínas. São codificados por únicas cópias de genes contidas em um segmento de aproximadamente 200 Kb no cromossomo 6 de caprinos (*Capra hircus*) [1].

O gene da alpha_{s1}-caseína (*CSN1S1*) é bastante polimórfico, possuindo mais de 18 alelos, os quais estão associados a níveis de expressão variados (de 0 à 3,5 g/L). Dentre eles temos os alelos A, B e C com expressão alta (3,5g/L), o alelo E (1,6g/L) considerado alelo intermediário, alelo F, de baixa expressão (0,6g/L) e o alelo O, de nula expressão desta proteína no leite [2].

A alpha_{s1}-caseína é uma das proteínas que desencadeia o processo alérgico em humano. As pessoas sensíveis a esta proteína, têm como sintomas: urticária; rinoconjuntivite; asma; vômito; diarreia e, na maioria dos casos graves, choque anafilático e morte. Por isso, pesquisas utilizando o alelo que tenha expressão nula são necessárias [3].

A mutação que caracteriza o alelo O do gene *CSN1S1* é a deleção de sete éxons, que começa no 181º nucleotídeo do 12º intron deste gene [4]. Dessa forma, com a interrupção da seqüência gênica, a proteína resultante é truncada, perdendo a função e deixando de ativar o sistema imunológico, não produzindo Ig E, a qual é a responsável pela reação alérgica [5].

Com este trabalho objetivou-se identificar o alelo O do gene *CSN1S1* em um rebanho de animais caprinos (*Capra hircus*) pertencentes a Universidade Federal de Viçosa e estimar a frequência deste na população em estudo.

Material e métodos

Foram utilizados 62 animais caprinos da raça Saanen, alojados no setor de caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa os quais foram identificados quanto aos alelos mais frequentes do gene *CSN1S1* (alta, média e baixa expressão).

Primeiramente, foi feita a extração de DNA a partir de leucócitos do sangue de caprinos, utilizando-se o reagente hexadeciltrimetilamônio (CTAB). O DNA obtido foi armazenado em tubos de 1,5 mL diluídos em água ultra-pura e estéril à uma temperatura de 4°C.

Para a amplificação do fragmento que contém a mutação do alelo O, através do método de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), foram utilizados oligonucleotídeos que flanqueiam a região entre o nucleotídeo 12089 e 12636 da seqüência disponível no *GenBank* (AJ AJ504710); *Taq* DNA polimerase; MgCl₂; dNTPs e tampão 10X (tris-HCl). Cada um dos tubos continha um volume final de 20 µL, os quais foram colocados em um termociclador, onde a temperatura oscilava de acordo com o tempo, realizando os seguintes passos: desnaturação à 94°C por 1 minuto; anelamento dos oligonucleotídeos à 62°C durante 45 segundos e alongação da fita de DNA à 72°C por 1 minuto. Ao final de 35 ciclos a reação estava concluída.

A análise dos fragmentos amplificados por PCR foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5%; revelado com nitrato de prata. Foram avaliados os tamanhos dos fragmentos para verificar se a região estudada apresentava ou não a deleção.

A determinação da frequência alélica foi obtida por contagem direta, assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Resultados e Discussão

Devido a existência de 18 alelos, sendo que os mais frequentes na nossa população são os alelos E e F, os animais avaliados neste estudo já haviam sido excluído da possibilidade de serem portadores dos alelos mais frequentes, sendo fortes candidatos a apresentarem alelos raros.

Nos géis de poliacrilamida foram observados dois fragmentos: um menor, com 305 pares de base (pb), que foi identificado como sendo o alelo O e outro maior, de 548 pb, identificado como sendo qualquer outro dos 17 alelos restantes (Figura 1). O fragmento do alelo O (DNA com a deleção a partir do 12º intron), apresentou-se menor que o fragmento que identifica os demais alelos em razão das distâncias entre os oligonucleotídeos desenhados, amplificando um fragmento menor quando a deleção está presente e um fragmento maior quando o gene não está deletado.

Embora as amostras de DNA estivessem íntegras, para algumas amostras as amplificações não eram eficientes. Ao confrontar todas as demais análises, notou-se que isto acontecia para o DNA proveniente dos animais portadores do genótipo EE do referido gene, sugerindo que possa estar havendo alguma alteração na região do intron 12 quando a mutação que caracteriza o alelo E

1. Acadêmica de Ciências Biológicas. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

2. Professor Adjunto. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. R Universitária, 2069, Cascavel, PR, CEP 85819-110.

3. Professor Adjunto. Universidade Federal de Viçosa.

* Autor para contato: E-mail: masoares@certto.com.br

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

também existe, o que pode estar dificultando o anelamento dos oligonucleotídeos para amplificar a região correspondente ao alelo O.

Neste estudo, não foi observada a ocorrência de animal homocigoto para o alelo O do gene *CSN1S1*. Os animais heterocigotos apresentaram os genótipos OE e OF.

Através de contagem direta e assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, a frequência do alelo O do gene *CSN1S1* foi de 0,02 na população caprina da raça Saanen da Universidade Federal de Viçosa. Comparando com as frequências relatadas em estudos na França, de 0,03 [6] e pesquisas realizadas no Brasil, onde a frequência, estimada a partir de teores de caseína no leite, foi de 0,05 [7], a frequência encontrada no rebanho do presente estudo foi inferior aos descritos na literatura. Ressalta-se que a frequência do alelo O no Brasil relatada por estes autores não foi baseada em análise do DNA como no presente estudo, sendo uma estimativa realizada com base nos teores de caseína no leite caprino.

Mediante o conhecimento da existência de animais portadores do alelo O, há a possibilidade de exploração comercial, pela produção de leite isento de α_{s1} -caseína, voltado para pessoas alérgicas ao leite de vaca.

Agradecimentos

À coordenação local do GENOPAR pela disponibilidade dos equipamentos. À Fundação de

Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] BEVILACQUA, C.; FERRANTI, P.; GARRO, G. 2002. Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new α_{s1} -casein variant found in the goat species. *European journal of biochemistry* 269: 1293 – 1303.
- [2] RAMUNNO, L.; COSENZA, G.; PAPPALARDO, M. 2000. Identification of the goat *CSN1S1F* allele by means of PCR – RFLP method. *Animal Genetics* 31: 333 – 346.
- [3] LARA-VILLOSLADA, F.; OLIVARES, M.; XAUS, J. 2005. The Balance Between Caseins and Whey Proteins in Cow's Milk Determines its Allergenicity. *Journal of Dairy Science* 88: 1654–1660.
- [4] COSENZA, G.; ILLARIO, R.; RANDO, A. 2003. Molecular characterization of the goat *CSN1S1^{oi}* allele. *Journal of Dairy Research* 70: 237 – 240.
- [5] WAL, J. 2001. Structure and function of milk allergens. *Allergy* 67: 35–38.
- [6] GROSCLAUDE, F.; MAHÉ, M.F.; BRIGNON, G.; DISTASIO, L.; JEUNET, R. 1987. A mendelian polymorphism underlying qualitative variations of goat α_{s1} -casein. *Génétique Sélection Evolution* 19(4), p.399-412.
- [7] LA GIOIA, D.R.L.; GONÇALVES, H.C.; WECHSLER, F.S.; RAMOS, P.R.R. 1998. Identificação dos alelos da α_{s1} -caseína em caprinos leiteiros. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Viçosa: 246-248.

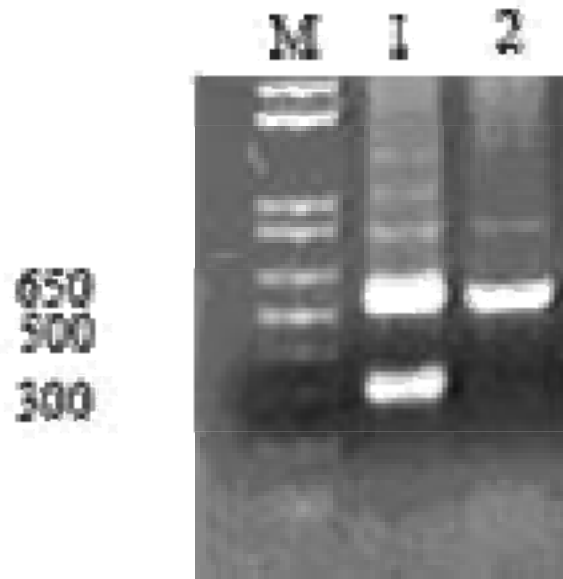


Figura 1. Padrão eletroforético em gel de agarose 1%, corado por brometo de etídeo. M, marcador 1KB (*Invitrogen*); canaleta 1, animal heterozigoto para o alelo O; canaleta 2, animal homozigoto sem a deleção no gene *CSN1S1*.