

**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**

**CAMPUS TUXTEPEC**

---

---

**TESIS**

**Identificación de las frecuencias alélicas A1 y A2 del gen *CSN2* en bovinos de la región del Papaloapan, mediante qPCR.**

**Para obtener el título:**

**Ingeniero en Biotecnología**

**Presenta:**

**Erick de Jesús Manzano Reyes**

**Asesor**

**Dr. José Abad Zavaleta**

**TUXTEPEC OAXACA, 2017**



## DEDICATORIA

*A mi madre, quien siempre ha sido una luz, que además de iluminar mi camino, me inspira a mejorar y salir adelante pese a cualquier adversidad...*

## AGRADECIMIENTOS

A mi **familia**, que me ha apoyado en todo momento de este largo camino.

A mi asesor, el **Dr. José Abad Zavaleta**, quien no solo ha sido un gran profesor, sino un compañero y amigo durante este trayecto de mi vida.

Al Dr. **Gabriel Guillen Solís**, por el espacio y tiempo brindado para poder realizar este proyecto.

A las Dras. **Jacqueline Capataz Tafur** y **Laura P. Ramírez Coutiño**, de quienes recibí, además de grandes enseñanzas académicas, grandes consejos y uno que otro jalón de orejas que me mantuvieron en el camino.

A los mejores amigos que he encontrado durante estos años dentro y fuera de la universidad; **Abril, Michell, Uribe, Crisanto, Christopher, Walter** y especialmente a **Guadalupe**, gracias por hacer de esta una gran travesía, así como también el haberme soportado 5 años (y contando), brindarme las mejores horas de convivencias al igual que entre tantos, uno que otro buen consejo.

A los miembros del grupo de trabajo de Biotecnología Animal, por haber armado un gran equipo, aceptarme dentro de él y apoyarnos siempre en todo lo necesario.

Al comité tutorial, por las observaciones y consejos emitidos para hacer de este, un mejor trabajo.

Finalmente, agradecer por todo su esfuerzo, consejos, ayuda y guía a mi **madre**, ya que sin ti, escribir estas líneas, no sería posible.

## Contenido

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS .....	IV
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	IX
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN .....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	2
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 Producción de leche a nivel internacional y nacional. ....	3
2.1 Ganadería de doble propósito como sistema de producción en el trópico Mexicano.....	5
2.2 Características y propiedades de la leche.....	7
2.3 Las caseínas. ....	8
2.4 Beta caseína ( $\beta$ -CN). ....	9
2.5 $\beta$ -Casomorfina 7 (BCM-7). ....	12
2.6 Estudios sobre BCM-7 y sus repercusiones a la salud humana. ....	14
2.7 Leche A2. ....	16
2.8 Métodos moleculares para detectar la presencia de polimorfismos asociados a la calidad de la leche bovina. ....	16
2.9 Estudios sobre los polimorfismos A1 y A2 en el gen <i>CSN2</i> en diferentes razas de bovinos. ....	21
3 JUSTIFICACIÓN.....	23
4 HIPÓTESIS.....	24
5 OBJETIVOS.....	24
5.1 General. ....	24
5.2 Particulares. ....	24
6 METODOLOGÍA.....	25
6.1 Obtención de la muestra. ....	25
6.2 Extracción de ADN. ....	25
6.3 Diseño de controles sintéticos y oligonucleótidos. ....	25

6.4	Amplificación de controles y muestras. ....	26
6.5	Análisis HRM (High-resolution Melt Analysis). ....	28
6.6	Análisis estadístico. ....	28
7	RESULTADOS .....	29
7.1	Análisis de integridad del ADN extraído. ....	29
7.2	Análisis Bioinformático. ....	29
7.3	Amplificación por PCR. ....	33
7.4	Análisis de alta resolución de las curvas de disociación (High Resolution Melting [HRM]). ....	35
7.5	Análisis estadístico. ....	39
8	DISCUSIÓN.....	43
9	CONCLUSIONES .....	46
10	PERSPECTIVAS .....	47
11	ANEXOS .....	48
11.1	Anexo 1: Protocolo de extracción de ADN. ....	48
11.2	Anexo 2: Secuencias utilizadas para el diseño de controles y oligonucleótidos .....	49
11.2.1	Secuencia del exón 7 del gen <i>CSN2</i> de <i>Bos indicus</i> . ....	49
11.2.2	CDS parcial del alelo A1 del gen <i>CSN2</i> de <i>Bos indicus</i> . ....	49
11.2.3	CDS parcial del alelo A2 del gen <i>CSN2</i> de <i>Bos indicus</i> . ....	50
11.2.4	Secuencia del exón 7 del gen <i>CSN2</i> de <i>Bos taurus</i> . ....	50
11.2.5	CDS parcial del alelo A1 del gen <i>CSN2</i> de <i>Bos taurus</i> . ....	50
11.2.6	CDS parcial del alelo A2 del gen <i>CSN2</i> de <i>Bos taurus</i> . ....	51
11.3	Anexo 3: Gráficas HRM y Gráficas diferenciales HRM. ....	52
12	REFERENCIAS .....	58

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Producción de leche anual a nivel nacional y por estado .....	4
Tabla 2: Sistemas de producción de leche en México. ....	6
Tabla 3: Variantes alélicas de $\beta$ -CN y su posición en la cadena polipeptídica .....	11
Tabla 4: Frecuencias alélicas en diferentes razas de ganado lechero. ....	22
Tabla 5: Mezcla de reacción para PCR.....	27
Tabla 6: Condiciones de PCR. ....	27
Tabla 7: Controles sintéticos. ....	31
Tabla 8: Diseño de oligonucleótidos.....	31
Tabla 9: Numero de animales genotipados.....	39
Tabla 10: Frecuencias genotípicas de la población analizada. ....	39
Tabla 11: Frecuencias alélicas detectadas en la población analizada. ....	40
Tabla 12: Diagrama de Punnet de los progenitores teóricos de la población analizada.....	40
Tabla 13: Comparación de valores estimados y valores esperados .....	41
Tabla 14: Valores de $X^2$ .....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Precio de venta promedio del litro de leche, durante el periodo 2010-2014 a nivel nacional nacional (SIAP, 2014).....	5
Figura 2: Composición estructural del locus CN y cada uno de los 4 genes que codifican a las caseínas. ....	9
Figura 3: Generación de BCM-7.....	13
Figura 4: Análisis HRM para genotipar a través de la identificación de SNP's.....	20
Figura 5: Análisis de integridad de ADN.....	29
Figura 6: Alineamiento de las secuencias del exón 7 del gen CSN2 de Bos indicus y Bos taurus. ....	30
Figura 7: Alineamiento de controles sintéticos con los oligonucleótidos diseñados. ....	32
Figura 8: Alineamiento de secuencias con los controles sintéticos y oligonucleótidos diseñados.....	32

Figura 9: Producto de PCR corrido en electroforesis. ....	33
Figura 10: Amplificados de PCR .....	34
Figura 11: Diferenciación y disminución de fluorescencia de los controles sintéticos respecto al aumento de temperatura.....	35
Figura 12: Gráfica diferencial de los controles. ....	36
Figura 13: Gráfica HRM. Patrón de curvas normalizadas en el rango de temperatura seleccionado para la diferenciación de los 3 controles y sus genotipos.....	37
Figura 14: Gráfica diferencial. Agrupamiento de las muestras con respecto a los 3 controles sintéticos.....	37
Figura 15: Gráfica HRM. Diferenciación de las muestras durante la caída de fluorescencia al aumentar la temperatura. ....	38
Figura 16: Gráfica HRM normalizada. ....	38

## GLOSARIO DE TÉRMINOS.

**Alelo:** Cada una de las formas alternativas que puede tener un gen.

**Caseína:** Proteínas insolubles de la leche.

**Cebú:** Adjetivo con el que se nombra a ganado del genero *Bos indicus*.

**Clúster:** (en genética) Conjunto o grupo de genes correlacionados que comparten un loci.

**Cromosoma:** Estructuras altamente organizadas, compuestas por ADN y proteínas, que contiene información genética y se encuentra en el núcleo de la célula, solo pueden visualizarse durante la división celular.

**Doble propósito (ganadería):** Hatos destinados para la producción de carne y leche en regiones del trópico, generalmente, son el resultado de cruza animales del genero *Bos indicus* x *Bos taurus*.

**Fenotipo:** Conjunto de caracteres visibles que un individuo presenta como resultado de la interacción entre su genotipo y el medio

**Fluoróforo:** Moléculas que absorben energía en una longitud de onda específica, y que emiten energía en otra longitud de onda determinada.

**Genotipo:** Conjunto de genes característicos de cada especie.

**Hatos:** Conjunto o grupo de animales de ganado bovino.

**Loci:** Plural de locus.

**Locus:** Posición específica dentro de un cromosoma.

**Opioide:** Agente endógeno o exógeno que se une a receptores opioides situados principalmente en el sistema nervioso central y en el tracto gastrointestinal.

**Péptidos:** Conjunto de 2 o más aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

**Polimorfismo:** variaciones en la secuencia de ADN entre organismos de una misma especie, normalmente expresados como diferentes fenotipos, estos se manifiestan en al menos 1% de la población.

## ABREVIATURAS

**a.a:** Aminoácidos.

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**BCM:** Beta Casomorfina.

**CCT:** Codón codificante de Prolina

**CAT:** Codon codificante de Histidina

**CSN2:** Gen de la  $\beta$ -Caseína.

**CDS:** Secuencia codificante (Coding sequence).

**DM1:** Diabetes Mellitus tipo 1.

**DP** (Ganadería): Doble propósito.

**DPPIV:** Dipeptidil Peptidasa IV.

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization of de United Nations).

**HRM:** Curvas de disociación de alta resolución (High Resolution Melt).

**kb:** kilo base (1000 bases o nucleótidos).

**NCBI:** Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information).

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction).

**qPCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (Quantitative Polimerase Chain Reaction).

**RFU:** Unidades Relativas de Fluorescencia (Relative Fluorescence Units)

**SNP:** Polimorfismo de Nucleótido Simple (Single Nucleotide Polimorfism).

**$\alpha$ 1-CN:** alfa S1 caseína o  $\alpha$ 1-caseína.

**$\alpha$ 2-CN:** alfaS2 caseína o  $\alpha$ 2-caseína.

**$\beta$ -CN:** beta caseína o  $\beta$ -caseína..

**$\kappa$ -CN:** kappa caseína o  $\kappa$ -casína.

## RESUMEN

En el presente estudio, se identificaron los alelos A1 y A2 del gen *CSN2*, responsable de la producción de  $\beta$ -CN, en hembras bovinas, en estado lactante, de doble propósito de la región del Papaloapan. Se analizaron muestras sanguíneas provenientes de 142 animales a las cuales se extrajo el ADN, este fue cuantificado y se obtuvieron alícuotas a una concentración de 5 ng/ $\mu$ L. Mediante un análisis bioinformático, se identificó la secuencia donde se encuentra el polimorfismo de la posición 8108 del gen *CSN2* y se diseñaron oligonucleótidos específicos para su amplificación mediante qPCR, así como controles sintéticos con el cambio de base perteneciente a cada alelo a identificar. Se realizó la amplificación por qPCR en el equipo PikoReal24™ y el análisis de curvas de disociación de alta resolución mediante el PikoReal Software 2.2 y la herramienta HRM. Las frecuencias genotípicas obtenidas fueron de 0.317, 0.282 y 0.401 para los homocigotos A1A1, A2A2 y el heterocigoto A1A2 respectivamente. Las frecuencias alélicas calculadas fueron de 0.5176 y 0.4824 para los alelos A1 y A2 respectivamente. Mediante el estadístico de  $\chi^2$  se obtuvo un valor de 5.4787 con 1 un grado de libertad y un  $\alpha=0.05$ , determinando que la población no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

**Palabras claves:** Bovinos de doble propósito, qPCR,  $\beta$ -CN, Alelos.

# 1 INTRODUCCIÓN

La selección del ganado bovino se ha basado mayormente en rasgos cuantitativos tales como rendimiento de grasa, proteína y leche, los cuales se asume que están controlados por múltiples *loci*, la mejora genética de estos rasgos es relativamente lenta, pues los caracteres productivos solamente pueden ser medidos en un sexo, ya que son regulados por múltiples genes, y los factores ambientales ejercen una influencia importante en su expresión (Cervantes *et al.*, 2007).

La producción de leche bovina en México juega un papel fundamental dentro de la economía del sector primario e industrial. En el país, la producción de leche se realiza en cuatro sistemas: el especializado (razas especializadas en producción lechera y alto nivel de tecnología implementada), semiespecializado (razas especializadas con nivel medio o bajo de tecnología), de doble propósito (razas no especializadas y destinadas a la producción de carne y leche) y familiar o sistema tras patio (pocos animales y para consumo personal) (Cortés López *et al.*, 2012). De los cuales el de doble propósito es el más empleado en el estado de Oaxaca y principalmente en la Cuenca del Papaloapan.

En los últimos 30 años, investigadores de diferentes países, han indicado la posible asociación entre ciertas variantes genéticas de las proteínas de la leche con las características de producción, la composición de la misma y en general sus propiedades (Çardak, 2005). Así mismo, se ha encontrado relación de algunas variantes de la leche con el desarrollo de síntomas y patologías humanas (Elliott *et al.*, 1999; C. N. McLachlan, 2001; Wada *and* Lönnnerdal, 2014).

Una de estas variantes alélicas, es el alelo A1 del gen *CSN2*, que codifica la proteína  $\beta$ -Caseína, dicha variante de esta proteína, ha sido asociada a diversos trastornos metabólicos y patologías humanas en poblaciones que consumen leche con este tipo de proteínas, debido a la generación de péptidos opiáceos, en particular, la  $\beta$ -Casomorfina 7, que afectan tanto al sistema nervioso, como también al metabolismo de humanos que ingieren este tipo de leche (Kamiński *et al.*, 2007).

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Producción de leche a nivel internacional y nacional.

La leche bovina, representa el 83% de la producción total de lácteos en todo el mundo, en el 2013 se registró un crecimiento del 0.9% en su producción, manteniendo un promedio del 2.3% en los últimos años (Bulletin of the International Dairy Federation, 2014). A nivel mundial, los países con mayor producción de leche son Estados Unidos, seguido por India y China, en base a sistemas de producción especializada. Con valores intermedios de producción se encuentran Brasil, Rusia y Alemania. Contrario a esto, las naciones con mayor consumo de este alimento (litros per cápita) son: Finlandia, Australia, Reino Unido e Islandia. En los niveles más bajos de consumo, se encuentran Nueva Zelanda, Noruega y Suecia (International Dairy Federation and Statistics Canada 2013).

Por otro lado, de acuerdo a información de la Organización para la Agricultura y los Alimentos de las Naciones Unidas (FAO), México, es el quinto mayor productor de leche en América Latina y el Caribe (Duifhuis-Rivera *et al.*, 2014). En nuestro país los principales centros de producción especializada se encuentran en la zona del norte, y en el estado de Jalisco, según datos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en el año 2015 los estados con mayor producción lechera fueron: Jalisco, Coahuila y Durango, mientras que el estado de Oaxaca se ubica en el décimo sexto puesto con un aporte apenas del 1.3% (Tabla 1). La región de la laguna, ubicada en los estados de Coahuila y Durango representan en conjunto el 21.46% de la producción nacional.

**Tabla 1. Producción de leche anual a nivel nacional y por estado**

<b>Estado</b>	<b>Producción (miles de litros)</b>	<b>Aportación (%)</b>	<b>Ranking estatal</b>
Jalisco	2,088,776	18.4	1°
Coahuila	1,384,018	12.2	2°
Laguna Coahuila	1,354,550	11.94	
Durango	1,165,388	10.3	3°
Laguna Durango	1,077,242	9.52	
Chihuahua	1,027,856	9.1	4°
Guanajuato	760,187	6.7	5°
Veracruz	708,008	6.2	6°
Baja california	165,831	1.5	15°
Oaxaca	148,091	1.3	16°
San Luis potosí	132,639	1.2	17°
Distrito federal	13,489	N.S.	30°
Quintana roo	4,900	N.S.	31°
Yucatán	3,535	N.S.	32°
Región lagunera	2,431,792	21.46	
<b>Total nacional</b>	<b>11,341,840</b>	<b>100</b>	

N.S. Datos no significativos

Adaptado del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2014), con información de las Delegaciones de la SAGARPA.

La ganadería bovina es la principal actividad pecuaria en el país, y la producción de leche se encuentra en promedio cercana a los 11 mil millones de litros anuales, con lo cual, se han generado ingresos aproximadamente 60 mil millones de pesos en los últimos años (SIAP, 2014). Sin embargo, para los productores, el precio de venta por litro de leche es relativamente bajo (comparado con productos de origen animal como carne y queso), al responder a efectos de oferta y demanda de leche a nivel nacional. En la Figura 1 se muestra, el precio de venta del litro de leche dentro del periodo que va del 2010 al 2014 (precio medio en el territorio nacional), se observa

que el aumento es gradual y poco variable, puesto que en 5 años, solo aumenta aproximadamente 2 pesos (SIAP, 2014).

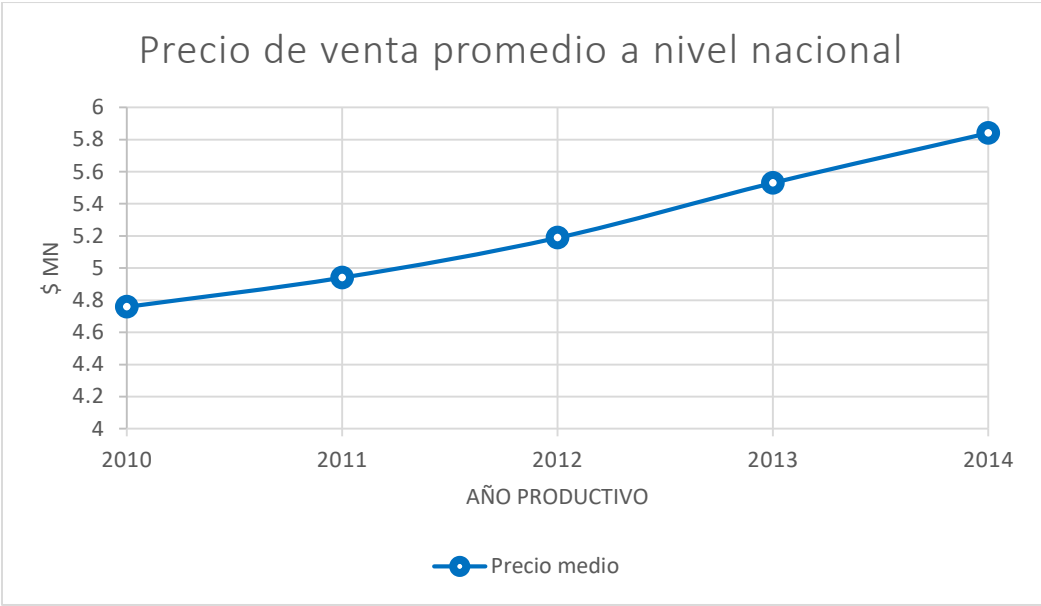


Figura 1: Precio de venta promedio del litro de leche, durante el periodo 2010-2014 a nivel nacional (SIAP, 2014).

### 2.1 Ganadería de doble propósito como sistema de producción en el trópico Mexicano.

El sistema de ganadería de doble propósito (DP) es un término que se usa para describir el sistema de producción de leche y carne en las tierras tropicales. En este sistema, el ganado, producto de cruces entre razas Cebuinas como Brahaman, Indubrasil, Guzarat, Sardo negro, etc., europeas como las razas Angus, Hereford, Charolais, Pardo Suizo, Simmental, Holstein, etc., y Criollo, son utilizadas para la producción de leche y carne en áreas tropicales. Para esto se combina la ordeña con el amamantamiento de las crías hasta el destete, requiriendo bajos insumos con escaso uso de la tecnología (Ortega and Ward, 2005; Santos Flores *et al.*, 2002). La Tabla 2 hace una breve descripción y se muestran algunas características de los sistemas de producción utilizados en México.

**Tabla 2: Sistemas de producción de leche en México.**

<b>Sistema</b>	<b>Raza</b>	<b>Tecnología</b>	<b>Manejo</b>	<b>Alimentación</b>
<b>Especializado</b>	Holstein, Jersey, Pardo suizo americano.	Ordeña mecanizada.	Estabulado	Forrajes de corte. Alimentos balanceados.
<b>Semiespecializado</b>	Holstein, Jersey, Pardo suizo americano.	La ordeña se realiza de forma manual con ordeñas individuales o de pocas unidades.	Semi-estabulado y en pequeñas extensiones de terreno.	Forrajes de corte. Alimentos balanceados.
<b>Doble propósito</b>	Razas cebuinas y cruza con razas europeas.	La ordeña se realiza de forma manual, con ordeñas individuales.	Extensiva y en pequeñas extensiones de terreno.	Pastoreo con un mínimo de suplementación alimenticia. Uso ocasional de subproductos agrícolas.
<b>Familiar o traspatio</b>	Holstein, Suizo americano, Cruzas cebuinas.	Ordeña manual	Cerca de la vivienda y extensiones pequeñas.	Pastoreo y suministros de desechos agrícolas.

La productividad de los sistemas ganaderos de doble propósito, ha sido muy cuestionada como consecuencia de los bajos valores que este sistema manifiesta cuando se le compara con los sistemas de producción especializados de carne y leche. No obstante, existen modalidades de producción tecnificadas en hatos de DP que han mostrado resultados, que si bien no alcanzan los rendimientos de los sistemas de producción especializados, resultan ser competitivos y adaptados ecológicamente a las condiciones tropicales (Fuenmayor *et al.*, 2009).

En las regiones tropicales de América Latina, el sistema de producción bovina de DP se desarrolla principalmente bajo el sistema de manejo de pastoreo extensivo (Orantes-Zebadúa *et al.*, 2014). En México, este sistema cobra especial importancia ya que el área tropical abarca 51.3 millones de ha., equivalentes al 26.2% del territorio nacional. De esta superficie, 19 millones de ha., se dedican a la producción pecuaria, donde pastorean aproximadamente 12 millones de bovinos (40% del inventario nacional), que producen el 19.5 y 40-50% de la leche y carne, respectivamente, que se consumen en México anualmente. Este tipo de ganadería se realiza principalmente en sistemas de pastoreo y la producción láctea se utiliza en la elaboración de quesos, para venta directa al consumidor o a empresas (Rojo-Rubio *et al.*, 2009).

## **2.2 Características y propiedades de la leche.**

La leche es un alimento indispensable para los mamíferos jóvenes, así como una fuente común de proteínas además de microelementos esenciales como calcio, fósforo y magnesio para las personas adultas (Kamiński *et al.*, 2007). Es un fluido biológico complejo, cuya función es asegurar el desarrollo adecuado de los mamíferos en su primera etapa de vida, siendo el alimento de mayor importancia en esta fase (Cortés López *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2009).

La leche contiene carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas, elementos inorgánicos y agua. Tiene diferentes funciones fisiológicas como proporcionar nutrientes a las crías de los mamíferos, proteger el tracto gastrointestinal de estas contra patógenos, toxinas e inflamación y contribuye a la salud metabólica

regulando los procesos de obtención de energía (Formaggioni *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2009), además de que la composición y contenido de proteínas en la leche bovina, son un factor importante para la rentabilidad de la industria láctea (Bobe *et al.*, 1999; Formaggioni *et al.*, 1999).

### **2.3 Las caseínas.**

Las proteínas de la leche pueden ser separadas en dos fracciones, soluble e insoluble, esta última corresponde a las caseínas totales:  $\alpha$ -s1 caseína ( $\alpha$ s1-CN),  $\alpha$ -s2 caseína ( $\alpha$ s2-CN),  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN),  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CN) (Cortés López *et al.*, 2012). Las caseínas totales ocupan cerca del 80% de las proteínas presentes en la leche bovina (Givens *et al.*, 2013; Hanusová *et al.*, 2010).

Las caseínas son las proteínas más importantes para la preparación de quesos (Gustavsson *et al.*, 2014), un aumento en la proporción de estas, en particular de  $\alpha$ s-CN y  $\beta$ -CN, incrementa el rendimiento en la producción de quesos (Bobe, *et al.*, 1999). están presentes en la cuajada para la elaboración del queso, debido a que no se pierden después de una precipitación a pH 4.6. Las principales características de estas proteínas son su termolabilidad lo que permite la esterilización de productos lácteos a altas temperaturas 100-140°C y con ello una buena pasteurización, además de coagulabilidad para la producción de quesos (Thompson *et al.*, 2009). Su valor nutritivo no solo se encuentra determinado por su contenido de aminoácidos, sino también por los péptidos que se producen de estas proteínas (Cieślińska *et al.*, 2012).

Las caseínas se encuentran codificadas en el genoma bovino por 4 genes distintos, los cuales son *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2*, y *CSN3* para  $\alpha$ S1-CN,  $\beta$ -CN,  $\alpha$ s2-CN, y  $\kappa$ -CN, respectivamente, y se encuentran estrechamente vinculados en un clúster de 250 kb de longitud aproximadamente, mapeados en el cromosoma 6 como se muestra en la Figura 2. Este grupo de genes también se conoce como el locus CN o súper locus (Caroli *et al.*, 2009).

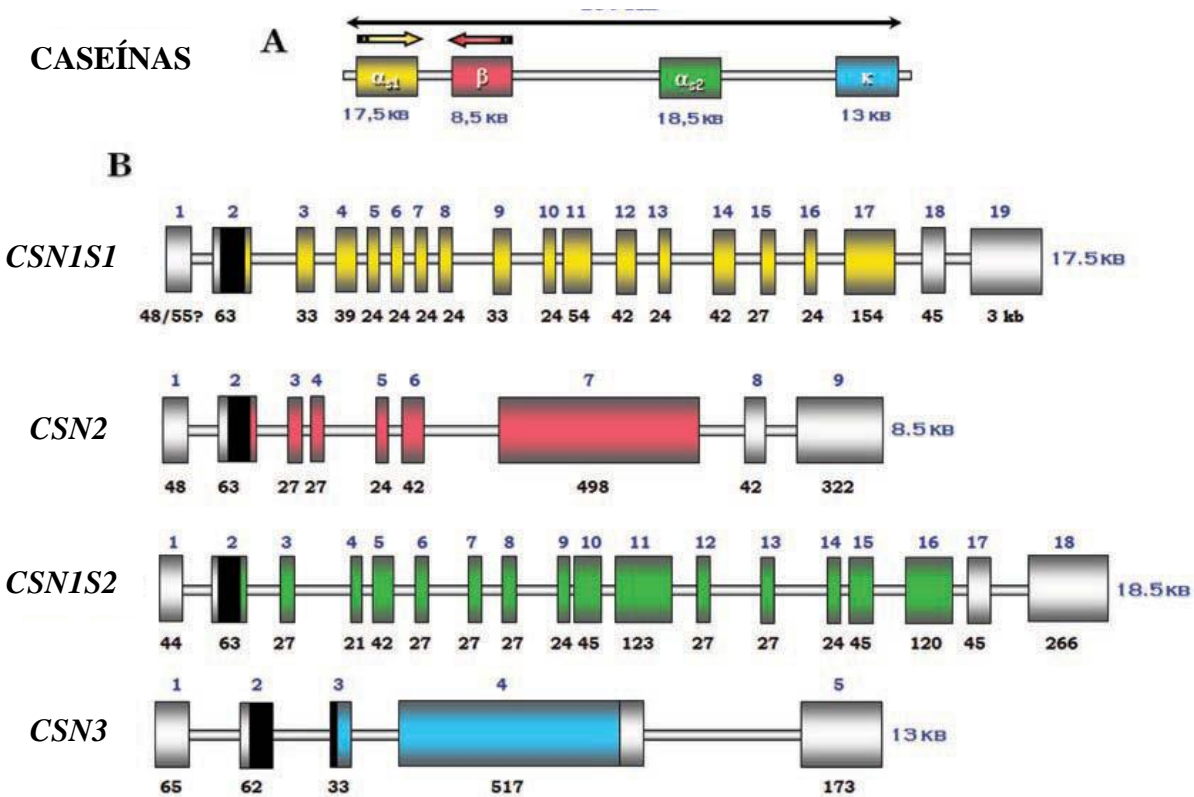


Figura 2. Composición estructural del locus CN y cada uno de los 4 genes que codifican a las caseínas. Modificada de Caroli *et al.*, 2009.

## 2.4 Beta caseína ( $\beta$ -CN).

La  $\beta$ -CN es una proteína de 209 residuos aminoácidos y un peso molecular de 23,983 Da (Han *et al.*, 2000), se encuentra en la leche de todos los mamíferos, aunque diversos investigadores difieren en el porcentaje que ocupa dentro de las caseínas totales, unos proponen por arriba del 45% (Miluchová *et al.*, 2013), otros dicen que está en un rango del 25-35% (Formaggioni *et al.*, 1999; Kamiński *et al.*, 2007). Sin embargo, todos concluyen que es la segunda más abundante. La  $\beta$ -CN guarda ciertas características similares a  $\alpha$ S1-CN como, el peso molecular es similar, no tienen cisteínas y las prolinas son abundantes, tiene un marcado carácter hidrófobo y a temperatura ambiente muestra sensibilidad a los iones de calcio (Formaggioni *et al.*, 1999). Esta proteína es codificada por el gen *CSN2* ubicado en el cromosoma 6 en la posición 6q31, como se observa en la figura 2(A) se encuentra en la cadena antisentido, su tamaño es de 6.721 kb, y está dividido en 9 exones (Figura 2B). Según la información del NCBI (National Center for Biotechnology

Information), el gen *CSN2* (con número de acceso 281099), es un gen conservado que comparte homología entre humanos, ratones, chimpancés, ratas y perros, mientras que para bovinos y 82 organismos más tienen pequeños cambios en su estructura y tamaño respecto a los humanos (NCBI, 2016).

Desde el descubrimiento de la estructura primaria de  $\beta$ -CN (Han *et al.*, 2000; Ribadeau Dumas *et al.*, 1972), muchos estudios han sido realizados con la intención de averiguar las características y propiedades que tiene esta proteína, mediante los cuales se han identificado a las proteínas de la leche como potenciales precursoras de péptidos bioactivos (Keating *et al.*, 2008; Miluchová *et al.*, 2009).

Uno de los primeros en descubrir la presencia de variantes genotípicas en la  $\beta$ -CN fue Aschaffenburg (1961), cuando mediante una electroforesis en papel a pH alcalino, descubrió tres bandas pertenecientes a la misma proteína, y se les denominó A, B y C, (Aschaffenburg 1961). Años más tarde, los investigadores Peterson, Kopfler y Kiddy (1966), descubrieron a través de electroforesis en geles de poliacrilamida a pH ácido, que la banda A, descrita anteriormente, no pertenecía a una sola variante, sino a 3 diferentes llamadas A1, A2 y A3 (Formaggioni *et al.*, 1999). En la actualidad son conocidas 14 variantes alélicas determinadas por el cambio de un residuo aminoácido (a.a) en la secuencia peptídica de  $\beta$ -Cn: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G como se muestra en la tabla 3 (Kamiński *et al.*, 2007).

**Tabla 3: Variantes alélicas de  $\beta$ -CN y su posición en la cadena polipeptídica**

Variantes de $\beta$ -CN	Cambios en la cadena polipeptídica											
	18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	122	138
<b>A2</b>	Ser-p	Arg	Ser-p	Glu	Glu	<b>Pro</b>	Glu	Leu	Gln	His	Ser	Pro
<b>A1</b>						<b>His</b>						
<b>A3</b>										Gln		
<b>B</b>						His					Arg	
<b>C</b>			Ser		Lys	His						
<b>D</b>	Lys											
<b>E</b>				Lys								
<b>F</b>						His						Leu
<b>G</b>						His					Leu	
<b>H1</b>		Cys						Ile				
<b>H2</b>							Glu		Leu			Glu
<b>I</b>									Leu			

Tomada de Kamiński *et al.*, 2007.

Entre las variedades mencionadas, A1 y A2 han sido de las más estudiadas, debido a las evidencias que se han encontrado con la liberación de un grupo de péptidos conocidos como  $\beta$ -Casomorfina y su relación con trastornos metabólicos y otro tipo de enfermedades (Kamiński *et al.*, 2007; Keating *et al.*, 2008; McLachlan and Olsson, 2003; Miluchová *et al.*, 2013), y a la distribución homogénea que presenta el alelo A2 en organismos del género *Bos* en todas sus razas, mientras que el alelo A1 es más común en razas de *Bos taurus* y *Bos indicus* (Caroli *et al.*, 2009). La proteína de referencia la A2 (Thompson *et al.*, 2009), sin embargo, el cambio en la posición 67 en la cadena de a.a, confiere a la proteína un cambio en la estructura secundaria de la  $\beta$ -CN (Elliott *et al.*, 1999; Kamiński *et al.*, 2007), provocando un mayor diámetro al momento de agruparse en micelas en la variedad A1 e incrementándole una mayor actividad chaperona a la  $\beta$ -CN A2 (Raynes *et al.*, 2015),

siendo este, hasta el momento, el único en el que se ha observado un cambio conformacional, funcional o estructural en la proteína.

## 2.5 $\beta$ -Casomorfina 7 (BCM-7).

Las proteínas de la leche ejercen una amplia gama de actividades biológicas a través de los péptidos que son liberados durante la digestión *in vivo* (tracto digestivo) y por procesos tecnológicos durante su procesamiento (Fiedorowicz *et al.*, 2014; Ul Haq *et al.*, 2015).

Entre estos péptidos, se encuentran las  $\beta$ -casomorfinas (BCM's), que son péptidos liberados por la  $\beta$ -CN, con una longitud de 4-11 a.a, todos ellos inician su secuencia con el a.a Tyr de la posición 60 de la proteína (Kamiński *et al.*, 2007). Entre estos péptidos se pueden encontrar,  $\beta$ -casomorfina 7 y 4 (BCM-7 y BCM-4 respectivamente), los cuales fueron los primeros en ser caracterizados e identificados con actividad opioide (Brantl *et al.*, 1979; Pihlanto-Leppälä *et al.*, 1994). La característica principal de este tipo de péptidos con actividad opioide, es que en su estructura contiene una de estas 2 secuencias de aminoácidos: Tyr-X-Phe o Tyr-X1-X2-Phe donde X = cualquier residuo a.a (Pihlanto-Leppälä *et al.*, 1994).

La BCM-7 es un heptapéptido conformado por la secuencia de los siguientes a.a Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile, que corresponden a la posición 60-66 de  $\beta$ -CN bovina y 51-57 en  $\beta$ -CN humana, entre las cuales no se han encontrado diferencias (Cieślińska *et al.*, 2012; Kamiński *et al.*, 2007; Olenski *et al.*, 2010).

Las variantes alélicas responsables de la producción de BCM-7 en los bovinos son A1, B, C, F y G (Tabla 3) debido al cambio de histidina por prolina en la posición número 67, gracias a un cambio de base, mejor conocido como polimorfismo de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés), dado de forma natural en el gen CSN2 de la  $\beta$ -CN, donde se cambia una base, citosina CCT (Prolina), en las variantes A2, A3, D, E, H1, H2 e I, por una adenina CAT (Histidina), en las variantes A1, B, C, F, y G, ubicado en la posición 8101 de la secuencia del gen (Caroli *et al.*, 2009; Kamiński *et al.*, 2007). Sin embargo, solo el alelo A1 y en menor medida B, tienen

una distribución homogénea en los hatos de *Bos taurus*, y el alelo A1 en hatos de *Bos indicus* (Caroli *et al.*, 2009).

Para la liberación del péptido BCM-7 en el organismo, es necesaria la actividad proteolítica de ciertas enzimas del tracto digestivo (Cieslinska *et al.*, 2007; Kamiński *et al.*, 2007). Cuando el organismo ingiere  $\beta$ -CN A1, las enzimas pepsina, elastasa pancreática y/o leucina aminopeptidasa, cortan la unión entre los aminoácidos valina-tirosina (V-Y) en la posición 60 de la cadena polipeptídica, liberando la fracción amino terminal del heptapéptido. Mientras que en la posición 66, donde se unen isoleucina con histidina, la enzima que efectúa el corte es la elastasa (Jinsmaa and Yoshikawa, 1999; Kamiński *et al.*, 2007). Este último corte, no sucede cuando se consume leche con  $\beta$ -CN A2, debido a que el a.a encontrado en la posición 67 y unido a la isoleucina, es una prolina y por tanto la enzima no reconoce un sitio de corte y el péptido no se libera (Figura 3).

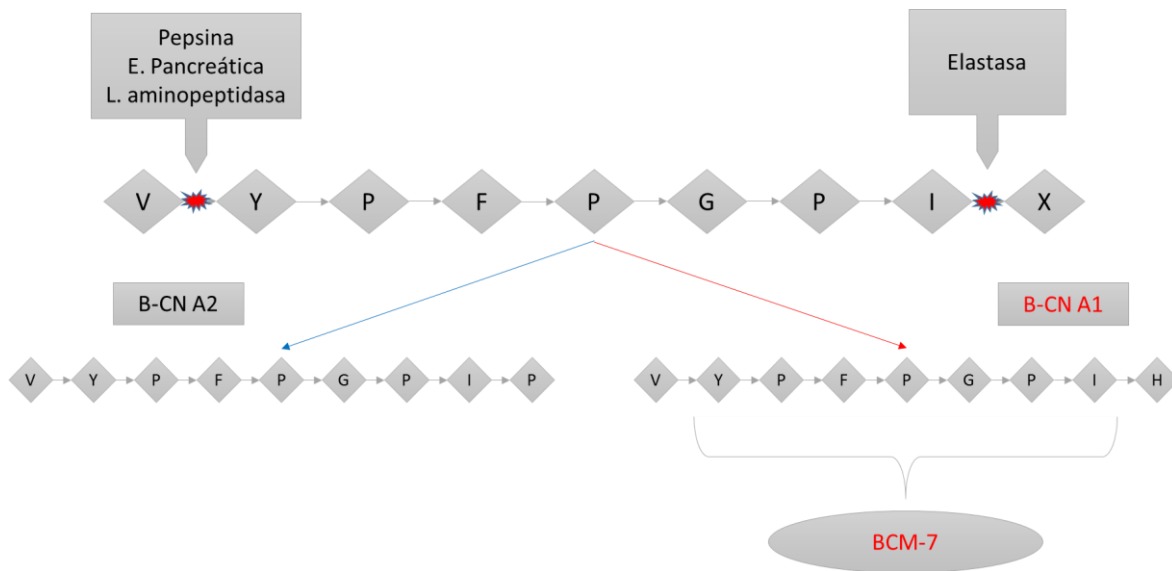


Figura 3: Generación de BCM-7 (Kaminski *et al.*, 2007).

Estudios reportan una mayor presencia de BCM-7 en leche sometida a hidrólisis, en una proporción de 4:1 en leche tipo A1 respecto a A2 (Cieslinska *et al.*, 2007). Puede ser encontrada en bajas concentraciones en productos lácteos fermentados, sin embargo también pueden degradarse mientras se están formando. En el caso de

los quesos, la presencia de este péptido depende de las enzimas proteolíticas del cultivo iniciador para su fermentación, así como del pH y sales (Muehlenkamp *and* Warthesen, 1996). En general las BCM's son muy resistentes a la degradación enzimática, sin embargo son el sustrato de la dipeptidil-peptidasa IV, la cual es una proteasa de superficie celular perteneciente a la familia de las prolil-oligopeptidasa, y se expresa en células de mamíferos (Kamiński *et al.*, 2007).

## **2.6 Estudios sobre BCM-7 y sus repercusiones a la salud humana.**

Los péptidos con actividad opioide, son aquellos que ejercen una actividad similar a la morfina y otros compuestos opiáceos (derivados de la adormidera), al unirse a los receptores opioides localizados en el sistema nervioso central y en el tracto gastrointestinal (Brantl *et al.*, 1979).

A partir del aislamiento de BCM-7 por Brantl (1979), surgieron diversos estudios para observar y evaluar las implicaciones que traía el consumir este péptido. Una de estas investigaciones, encontró que existía una relación de péptidos derivados de encefalinas y  $\beta$ -casomorfina, con efectos cardiovasculares como la bradicardia, en la cual, la administración de estos péptidos, en el sistema circulatorio de ratones, les ocasionaban este fenómeno (Wei *et al.*, 1980). Más tarde, se observó también que la fracción de las BCM's compuesta por el residuo tirosina, puede causar el fenómeno de hiperlocomoción (Rüthrich *et al.*, 1993), el cual es una conducta relacionada a los síntomas de la esquizofrenia.

Por otra parte, investigadores en la década de los 90's, buscaron la relación entre el consumo de leche tipo A1 y B (que liberan a BCM-7) y la incidencia de diabetes mellitus tipo 1 (DM1), para esto, emplearon el análisis estadístico de datos ya estandarizados sobre la incidencia de DM1 y el consumo de leche tipo A1 y B de algunos países. Y concluyeron, que existe una relación significativa entre el consumo de leche de estos tipos, con el desarrollo de esta enfermedad en pacientes de 0 a 14 años de edad, al igual que en poblaciones donde el consumo de leche tipo A1 y B es bajo y el de tipo A2 alto, los niveles de incidencia de este padecimiento

son relativamente bajos (Dahl-Jorgensen *et al.*, 1991; Elliott *et al.*, 1999; Thorsdottir *et al.*, 2000; Merriman, 2009).

Otro padecimiento con la que han sido relacionadas las BCM's es el síndrome de muerte súbita del lactante, el cual, es una de las principales causas de muerte de bebés entre el primer mes y primer año de vida (Kamiński *et al.*, 2007). Estudios sugieren que el mecanismo de acción de las BCM's, siendo similar al de la morfina, afecta directamente a las estructuras quimio sensibles del tronco cerebral y los cuerpos carotideos, con lo cual, la concentración aumentada de estos péptidos en plasma y líquido cefalorraquídeo se han encontrado en infantes con patrones respiratorios y apneas (característicos de este síndrome), asociándolos como un causante más de este síndrome (Sun *et al.*, 2003).

Como ya se mencionó anteriormente, las BCM's son sustrato para la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), que de forma natural se produce en el organismo, sin embargo, se encontró correlación con el aumento de la actividad en suero de la DPPIV y la presencia de BCM-5 y BCM-7 en la leche materna con la que fueron alimentados un grupo de niños con alergia atópica (dermatitis), esta relación no se encontró en los niños sanos lo cual sugiere que el fenómeno de la alergia está asociado a la presencia de estos péptidos, ocasionando el aumento de DPPIV para contrarrestar sus efectos (Fiedorowicz *et al.*, 2014; Jarmołowska *et al.*, 2007).

Investigaciones sugieren la correlación entre el consumo de leche con  $\beta$ -CN A1 productora de BCM-7, con la incidencia de cardiopatía isquémica en diferentes países, donde se sigue un patrón similar, al ya mencionado, con la DM1, donde se observa que en países con alto consumo per cápita de leche con el tipo  $\beta$ -CN A1 se incrementan los niveles de incidencia de este padecimiento (McLachlan, 2001; McLachlan *and* Olsson, 2003).

Recientemente, se ha encontrado que la presencia del péptido BCM-7 a altas concentraciones en fluidos biológicos de niños con autismo, pudiendo contribuir a la patogénesis de esta enfermedad (Kost *et al.*, 2009; Sokolov *et al.*, 2014).

## **2.7 Leche A2.**

En el año 2003, surge en Nueva Zelanda, una empresa llamada A2 Corporation (ahora "The A2 Milk Company"), dedicada a la comercialización de leche y productos derivados, como quesos, yogures y cremas, libres del alelo A1 de  $\beta$ -CN, causando un fuerte impacto en el mercado de leche en ese país, y acaparando casi 10% del mercado de leche fresca en Australia con un producto que se vende a unos 2.80 dólares australianos por litro (cerca de 2 dólares estadounidenses el cuarto), más del doble del precio de la leche normal de marca propia. En la actualidad, dicha empresa se dedica a la comercialización de este tipo de leche en Nueva Zelanda, Australia, China, Reino Unido y recientemente en Estados Unidos (El financiero, 2017).

Debido al creciente mercado, empresas como Alta Genetics y SEMEX® dedicadas a la comercialización de semen a nivel internacional, para programas reproductivos e inseminación artificial, ya incluyen en sus catálogos, el genotipo A2A2 como característica de interés productivo y valor agregado para sus animales, sin embargo, advierten de los riesgos que pueden ocurrir al llevar a cabo una homogeneización masiva de los rebaños, tales como bajas en la producción (Meyer, 2016; Baez, 2016).

## **2.8 Métodos moleculares para detectar la presencia de polimorfismos asociados a la calidad de la leche bovina.**

Uno de los aspectos buscados en la mejora genética del ganado lechero es incrementar la calidad de la leche, para elaborar productos de mayor calidad y valor nutritivo. Para ello, históricamente, el hombre se ha basado mediante la observación y selección de animales superiores, para realizar cruces y obtener animales con las características deseadas (Andrade *et al.*, 2009; Fuenmayor *et al.*, 2009).

En la actualidad existe una abundante gama de técnicas moleculares modernas y marcadores genéticos usados para evaluar directa o indirectamente variaciones en la información genética de individuos y poblaciones, tales como: polimorfismos de

la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD), número variable de repeticiones en tándem (VNTR) o minisatélites, simple repeticiones en tándem o microsatélites (STR) y polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (Bedoya *et al.*, 2001).

Los SNP's son cambios en una sola base en la secuencia nucleotídica, por ejemplo sustituciones, deleciones o inserciones de un solo nucleótido y que se presentan por arriba del 1% de la población. La mayoría de este tipo de polimorfismo presenta sólo dos tipos de alelos (bialélica), y por ello son referidas algunas veces como marcadores bialélicos. Aunque muchos de los SNP's se localizan en regiones no codificantes, un número importante de estos cambios de base cae dentro de genes (codificantes), lo que conduce a una diferente expresión fenotípica (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005), como ya se mencionó, tal es el caso del gen *CSN2* y sus variantes alélicas que corresponden a un SNP por cada variante (Kamiński *et al.*, 2007).

Para la detección de este tipo de marcadores moleculares una de las técnicas más utilizadas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que consiste en la amplificación de fragmentos de ADN específicos, flanqueados por dos oligonucleótidos (primers o cebadores) para el aislamiento de dicho fragmento, con lo cual se pueden identificar específicamente secuencias de ADN con características específicas de interés (Fahmy, 1999). Sin embargo, hoy en día, el desarrollo de nuevas tecnologías, en materia de análisis molecular, nos ha proporcionado herramientas como la PCR en tiempo real, para realizar este tipo de pruebas de una forma rápida, económica y eficiente (Heid *et al.*, 1996).

La PCR en tiempo real (qPCR) es una variante de la PCR original, en la que se busca amplificar y al mismo tiempo cuantificar el ADN producto de la amplificación, para ello, se utilizan los mismos reactivos de reacción de una PCR convencional (dNTP's, cebadores, solución tampón, ADN Polimerasa), junto a un fluoróforo o fluorocromo, que mediante detectores de fluorescencia se mide la intensidad de la luz emitida, la cual es proporcional a la tasa de amplificación del producto de la PCR (la nueva cadena de ADN). Con esta técnica se pueden generar amplicones muy

pequeños (desde 60 pb), lo que la hace ideal para la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares. (Ponchel *et al.*, 2003; Vinueza, 2009).

Según el tipo de fluoróforo a utilizar, la reacción se puede clasificar de dos formas: basada en el uso de fluoróforos inespecíficos que se intercalan al ADN y detecta la generación exponencial de esta molécula, y la técnica basada en el uso de sondas específicas que utilizan al menos un cebador fluorescente (sondas Taqman). Uno de los fluoróforos más utilizados es el SYBR Green, se alcanzan resultados tan precisos, como con el uso de sondas Taqman, y a un bajo costo (Ponchel *et al.*, 2003; Zipper *et al.*, 2004).

Una de las principales características que proporciona el uso de SYBR Green como fluoróforo para esta reacción, es que si se vigila la fluorescencia continuamente durante todo un ciclo de temperatura, la desnaturalización del producto o separación de la doble cadena de ADN, se puede observar la rápida pérdida de fluorescencia cerca de la temperatura de desnaturalización. Debido a que la temperatura de disociación media ( $T_m$ ), depende del contenido de GC y la secuencia del amplificado, los productos de PCR pueden diferenciarse por sus curvas de disociación (Ririe *et al.*, 1997).

El análisis de disociación de ADN en combinación con PCR en tiempo real se introdujo por primera vez en 1997 con los LightCyclers. Varios años después el análisis de curvas de disociación de alta resolución (HRM: High Resolution Melt) apareció como un método rápido para genotipar variantes conocidas e identificar variantes desconocidas de genes (Wittwer, 2009), ya que permite la detección de cambios de bases, puesto que las secuencias tienen variaciones de en su  $T_m$ , lo que permite comparar las curvas de disociación de las cadenas de ADN para la detección de polimorfismos (Kovanda *and* Poljak, 2011).

Los estudios de ADN mediante HRM, en la actualidad tienen muchas aplicaciones dentro de los diagnósticos moleculares, se utiliza típicamente para el análisis de mutaciones debido a su capacidad para distinguir entre diferencias de nucleótidos

individuales (Thermo Scientific, 2013). También son útiles para la detección de mutaciones puntuales, identificación de SNP's, sitios de metilación, entre otras aplicaciones (Vossen, *et al.*, 2009; Wittwer, 2009).

El genotipado mediante esta herramienta puede darse sin el uso de sondas marcadas incluso cuando el cambio de secuencia es de un solo nucleótido. Al generarse pequeños amplicones donde se fije la zona del polimorfismo o mutación, se pueden distinguir fácilmente los 3 genotipos, por ejemplo, un homocigoto A/A, otro C/C y el heterocigoto C/A, debido a que las curvas de los homocigotos, guardan un patrón similar, con la diferencia de 1 °C en la T<sub>m</sub> de C/C respecto a la del genotipo A/A, sin embargo La curva de fusión del heterocigoto A/C difiere en forma de la de los homocigotos con una transición más gradual en un rango de temperatura más grande (Reed *et al.*, 2007).

Un patrón de estas curvas, típico para la identificación de genotipos por identificación de SNP's, se muestra en la Figura 4, en el cual, dentro de la gráfica HRM (Figura 4A), se observa el rango de temperatura donde se da el punto de inflexión (T<sub>m</sub>) y la caída de fluorescencia, mientras que en la gráfica diferencial (Figura 4B), las muestras analizadas se agrupan respecto a los alelos identificados mediante un algoritmo de agrupación automática y de sensibilidad predeterminada para el caso de los análisis realizados en equipos PikoReal™ (Thermo Scientific, 2013).

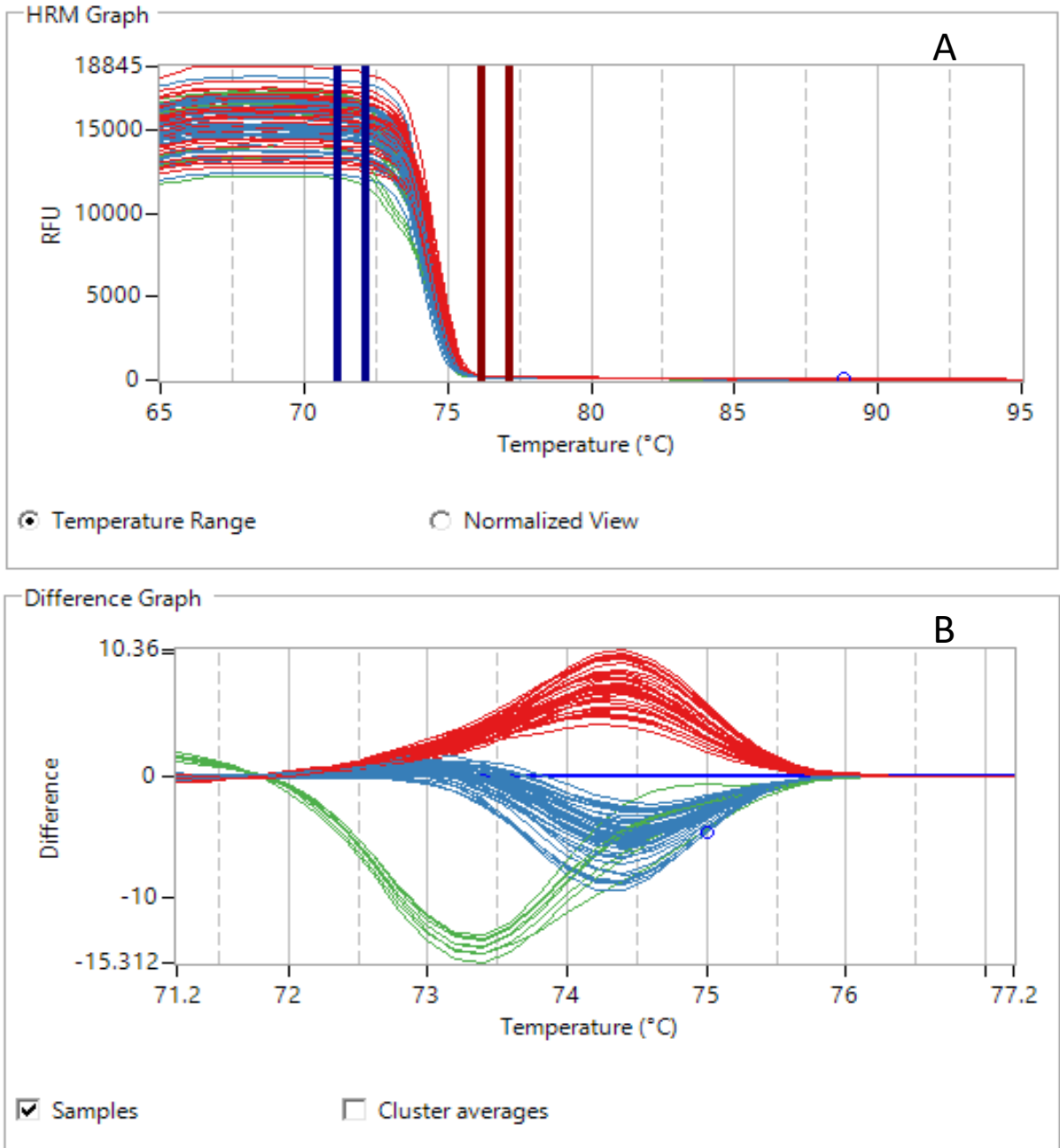


Figura 4: Análisis HRM para genotipar a través de la identificación de SNP's. Tomada de Thermo Scientific (2013).

## 2.9 Estudios sobre los polimorfismos A1 y A2 en el gen *CSN2* en diferentes razas de bovinos.

Como se mencionó, la principal característica del ganado de doble propósito, es ser el resultado de la cruce entre razas de las especies *Bos indicus* y *Bos taurus*. Particularmente, en las regiones del trópico mexicano, se encuentran las siguientes cruces: Cebú x Holandés (Holstein), Cebú x Suizo (Pardo Suizo) y Cebú x Simmental (Orantes-Zebadúa *et al.*, 2014). Las razas suizas y Holstein, han sido de las más estudiadas en la calidad de leche producida y los diversos polimorfismos en sus proteínas. Dentro de los estudios recientes que evaluaron la frecuencia de los alelos A1 y A2 de  $\beta$ -CN se encuentran los siguientes (Tabla 4), así como los resultados de otras razas locales del este de Europa.

Al igual que los estudios de Pons-Fita (2005; tabla 4), Duifhuis-Rivera *et al.* (2014) investigó la relación que existe entre las variantes alélicas A1 y A2 de  $\beta$ -CN, adjunto a las variantes alélicas de  $\kappa$ -CN, concluyendo que no hay relación directa entre los genotipos identificados de ambas proteínas, con respecto al rendimiento de producción de leche en los animales observados, sin embargo, los estudios realizados por Gustavsson *et al.* (2014), propone que la combinación de los genotipos BB para  $\alpha$ S1-CN, A1A2 de  $\beta$ -CN y AB para  $\kappa$ -CN, puede tener un efecto positivo sobre la procesabilidad de la leche de razas Holstein danés, Jersey danés y Rojo suizo, para la obtención productos lácteos como el queso.

**Tabla 4: Frecuencias alélicas en diferentes razas de ganado lechero.**

Raza	País	Frecuencia de los alelos		Referencia
		A1	A2	
<b>Holstein</b>	Estonia	0.429	0.548	Värv <i>et al.</i> , 2009
	Eslovaquia	0.54	0.46	Hanusová <i>et al.</i> , 2010
	Polonia	0.322	0.678	Cieślińska <i>et al.</i> , 2012
	Turquía	0.295	0.667	Çardak, 2005
	Italia	0.3	0.53	Jann <i>et al.</i> , 2002
	Polonia	0.35	0.65	Olenski <i>et al.</i> , 2010
	México	0.32	0.63	Pons Fita, 2015
	EUA	0.310–0.490	0.490–0.620	Kamiński <i>et al.</i> , 2007
<b>Pardo suizo</b>	Alemania	0.108	0.705	
	EUA	0.14	0.66	
<b>Simmental</b>	Alemania	0.343	0.566	
	Turquía	0.387	0.463	Çardak, 2005
<b>Rojo</b>	Dinamarca	0.71	0.23	Kamiński <i>et al.</i> , 2007
	Polonia	0.5	0.43	Jann <i>et al.</i> , 2002
	Italia	0.18	0.5	
<b>Pinzgau Eslovaco</b>	Estonia	0.663	0.313	Värv <i>et al.</i> , 2009
	Eslovaquia	0.5618	0.4382	Miluchová <i>et al.</i> , 2009
<b>Jersey Danés</b>	Dinamarca	0.081	0.634	Gustavsson <i>et al.</i> , 2014
<b>Holstein Danés</b>	Dinamarca	0.266	0.614	
<b>Suizo Rojo</b>	Dinamarca	0.482	0.509	

Como se observa en la Tabla 4, en las poblaciones de ganado de raza Holstein, el alelo A1 se encuentra con una frecuencia de 0.3 a 0.5, mientras que el alelo A2 es el que está en mayor proporción (arriba de 0.6), para razas Suiza y Simmental el comportamiento en la distribución alélica es similar ( $A2 > A1$ ), mientras que para razas europeas locales como Rojo y Pinzgau la distribución alélica se invierte. Investigaciones que comparan resultados recientes con los de años atrás, demuestran que hay una tendencia hacia el incremento de la frecuencia del alelo A2 en hatos lecheros (Pons Fita, 2015). Sin embargo, la información sobre la distribución alélica del gen *CSN2* en nuestro país es escasa (Duifhuis-Rivera *et al.*, 2014; Pons Fita, 2015), y menor aún en el ganado de doble propósito del trópico.

### 3 JUSTIFICACIÓN

El ganado de doble propósito representa la principal fuente de producción de leche en la región, y de este, depende cerca del 20% de la producción anual total del país. Sin embargo, no existen estudios sobre los polimorfismos del gen *CSN2* de la  $\beta$ -Caseína, distribuidos en el ganado lechero de la región. Debido a los antecedentes que existen sobre la implicación del alelo A1 del gen *CSN2*, responsable de la liberación de BCM-7, implicado en el desarrollo algunas enfermedades y trastornos que afectan al ser humano como diabetes tipo 1, y la prevalencia de estas en la zona, se vuelve imprescindible, conocer la calidad y características de la leche que se produce y consume en la región. Para ello, se propone la detección de la frecuencia de este alelo mediante el uso de herramientas moleculares aplicadas a la biotecnología animal, con la intención de generar hatos libres del alelo A1 del gen *CSN2*.

## 4 HIPÓTESIS

En el ganado de Doble Proposito de la región del Papaloapan, predomina el alelo A2 del gen *CSN2*, libre del polimorfismo responsable de la liberación del péptido BCM-7.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 General.

Identificar mediante el análisis HRM las frecuencias genotípicas y alélicas del gen *CSN2* en bovinos de doble propósito de la región del Papaloapan.

### 5.2 Particulares.

- Evaluar por HRM la presencia del polimorfismo SNP de la posición 8101 en el gen *CSN2*.
- Identificar las frecuencias genotípicas del gen *CSN2* respecto a los alelos A1 y A2.
- Calcular las frecuencias alélicas de la población analizada.
- Determinar si la población analizada se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg.

## 6 METODOLOGÍA

### 6.1 Obtención de la muestra.

Se utilizaron 142 muestras sanguíneas provenientes de hembras bovinas en estado de lactación con características fenotípicas de cruzas *Bos taurus* x *Bos indicus*, obtenidas de distintos ranchos de la región del Papaloapan.

Las muestras se extrajeron de la vena caudal (5-7 ml) y se depositaron en tubos Vacciutainer® con EDTA como anticoagulante. Estas muestras fueron transportadas al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Papaloapan y almacenadas en refrigeración a – 20 °C hasta su procesamiento.

### 6.2 Extracción de ADN.

Se utilizó el kit de extracción de Quick-gDNA™ MiniPrep de la marca ZYMO RESEARCH. La extracción de ADN genómico de cada muestra, se realizó de acuerdo al protocolo de extracción proporcionado por el kit (Anexo 1).

El ADN fue cuantificado en un equipo Nanodrop 2000™, a partir de las concentraciones detectadas, se homogeneizaron todas las muestras a una misma concentración de 5 ng/μL, para poder obtener amplificadores de una fluorescencia homogénea en todas las muestras, y así evitar irregularidades en el análisis de curvas de disociación y HRM.

### 6.3 Diseño de controles sintéticos y oligonucleótidos.

Se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI para localizar el genoma de *Bos taurus* (ID: 82) y *Bos Indicus* (ID: 3418), en ambos, se obtuvieron las secuencias del cromosoma 6 (AC\_000163.1 y CM003026.1 respectivamente) a partir de los cuales se localizó el SNP de la posición 8101 ubicado en el exón 7 del gen CSN2. Mediante el programa MEGA7 y el software de uso libre Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) se obtuvo el alineamiento para comprobar la homología en las secuencias (Anexo 2) y determinar el segmento del

gen para el diseño de oligonucleótidos y controles sintéticos., con ello se diseñaron las secuencias control para cada variante alélica (con y sin el polimorfismo).

Se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia que contiene al polimorfismo ubicado en la posición 8101 del gen *CSN2*. Las condiciones que se tomaron en cuenta para el diseño de oligonucleótidos fueron: porcentaje de Guanina-Citosina 40-60%, tamaño de oligonucleótidos entre 20-25 bases, temperatura de alineamiento 63-67 °C y un tamaño de amplificado 66 pb, así como el que no formaran dímeros y no existiera hibridación entre ellos.

Los oligonucleótidos y los controles, fueron sintetizados por la empresa Macrogen

#### **6.4 Amplificación de controles y muestras.**

Las secuencias control, se diluyeron en agua libre de ADNasas y ARNasas, se obtuvieron alícuotas a una concentración de 10 pmol/uL. A partir de esta concentración, se preparó una dilución con factor 1:10000 para ambos controles (BCAsin1 y BCAsin2), estos se amplificaron mediante el mismo protocolo de reacción y amplificación que las muestras. Se amplificaron cada uno de los controles por separado para cada corrida de reacción, donde un pozo de reacción contenía el control BCAsinA1 que representa al genotipo A1A1, el segundo pozo contenía al control BCAsinA2, homologo al genotipo A2A2, y para el tercer pozo se realizó una mezcla a igual concentración de los controles BCA sin A1 y BCA sin A2, esto para generar el control igual al genotipo heterocigoto A1A2.

A partir de ADN genómico, previamente diluido y homogeneizado, se amplificó la región del SNP de la posición 8108 del gen *CSN2* mediante el sistema de qPCR PikoReal24™ utilizando los oligonucleótidos diseñados. La mezcla de reacción se realizó según el protocolo de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) como se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5: Mezcla de reacción para PCR.**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (µL)</b>	<b>Concentración</b>
<b>Maxima SYBR Green Master Mix</b>	7.5	(2X)
<b>Oligo Forward (BCAf)</b>	0.5	10 pmol/µL
<b>Oligo Reverse (BCAr)</b>	0.5	10 pmol/µL
<b>Muestra ADN/ Controles</b>	2	5 ng/µL
<b>H<sub>2</sub>O libre de nucleasas</b>	4.5	
<b>Vol. final</b>	15	

Mediante el siguiente protocolo (Tabla 6) se estandarizaron las condiciones de amplificación de las muestras y controles.

**Tabla 6: Condiciones de PCR.**

<b>Paso</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	10 minutos	
<b>Desnaturalización</b>	95	15 segundos	40
<b>Alineación/extensión</b>	63	30 segundos	
<b>Extensión final</b>	72	5 minutos	

Se corrieron por PCR en tiempo real las 142 muestras por triplicado, y se comprobó el tamaño del amplificado con una electroforesis en gel de agarosa al 3%, corrido a 100 Volts y 400 mAmp durante 45 minutos, con ayuda del foto documentador y el programa GeneSnap™.

## 6.5 Análisis HRM (High-resolution Melt Analysis).

Para cada uno de los amplicones se realizó una curva de disociación (Melting curve) con un incremento de temperatura de 0.04 °C por cada 3 segundos, dentro de un rango de 65 a 95 °C. El cambio de base en las secuencias amplificadas (diferencia alélica), se detectó con el software HRM del PikoReal™ software 2.2 y se utilizaron las gráficas HRM obtenidas para identificar dichas diferencias.

## 6.6 Análisis estadístico.

Se asignó el genotipo a cada animal de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis HRM. Para el cálculo de las frecuencias alélicas (A1 y A2) y genotípicas (A1A1, A1A2 y A2A2) del gen *CSN2* se realizó mediante la ecuación de equilibrio de Hardy-Weinberg:

$$p^2 + 2pq + q^2$$

Donde:

$p^2$ = alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo n.

$2pq$ =frecuencia predicha para heterocigotos.

$q^2$ = alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo m.

Mediante el estadístico de  $X^2$  (ji cuadrada), se comprobó si la población se encuentra en equilibrio.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Análisis de integridad del ADN extraído.

Como se muestra en la Figura 5, el patrón de bandeo obtenido mediante la electroforesis es característico de una extracción de ADN, las bandas representa al ADN genómico de bovino. La existencia de una sola banda por cada carril del gel, demuestra que no hay presencia de ADN degradado (bandas de menor peso molecular que generen un barrido) que pudiera interferir en los resultados de los análisis realizados.

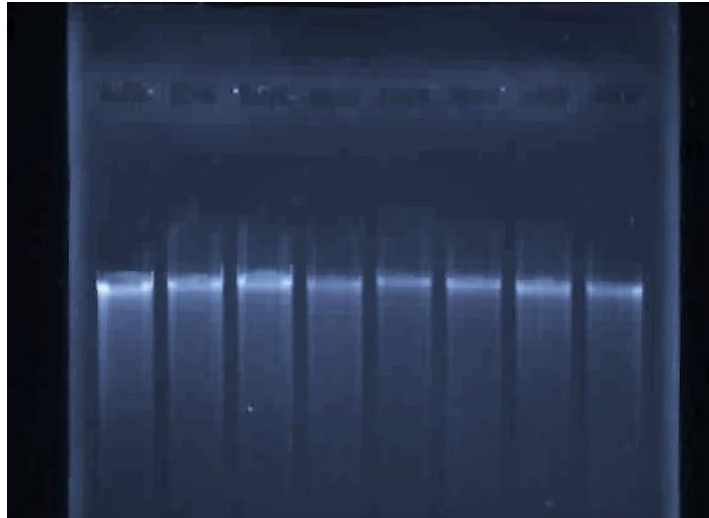


Figura 5: Análisis de integridad.

### 7.2 Análisis Bioinformático.

Se obtuvo la secuencia del gen *CSN2* de la base de datos del NCBI para *Bos taurus* y *Bos indicus*, así como la secuencia del exón 7 que contiene el polimorfismo.

Se tomaron como base la secuencia EF133460.1 y EF123100.1, pertenecientes al exón 7 de *Bos indicus* y *Bos taurus*, se alinearon con las secuencias JN051275.1, JN051275.1, gi|404385797 y gi|404385795 de las secuencias CDS parciales de los alelos A1 y A2 de *Bos indicus* y *Bos taurus* respectivamente (Figura 6).

```

JN051275.1          CTTCTTTCCAGGATGAACTCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAG
gi|404385797|gb|JX273430.1| -----GATGAACTCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAG
JN051276.1          CTTCTTTCCAGGATGAACTCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAG
gi|404385795|gb|JX273429.1| -----GATGAACTCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAG
EF133460.1          -----GATGAACTCCAGGATAAAATCC---CCCCTTTGCCAGAACAGTCTCTAG
EF123100.1          -----GATGAACTCCAGGATAAAATCC---CCCCTTTGCCAGAACAGTCTCTAG
                    ***** ** * * *****

JN051275.1          TCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCCATAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTC
gi|404385797|gb|JX273430.1| TCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCCATAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTC
JN051276.1          TCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCCCTAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTC
gi|404385795|gb|JX273429.1| TCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCCCTAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTC
EF133460.1          TCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCCCTAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTC
EF123100.1          TCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCCATAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTC
                    ***** ** * * *****

JN051275.1          AAACCCCTGTGGTGGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAGTGA
gi|404385797|gb|JX273430.1| AAACCCCTGTGGTGGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAGTGA
JN051276.1          AAACCCCTGTGGTGGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAGTGA
gi|404385795|gb|JX273429.1| AAACCCCTGTGGTGGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAGTGA
EF133460.1          AAACCCCTGTGGTGGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAGTGA
EF123100.1          AAACCCCTGTGGTGGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAGAGTGA
                    ***** *****

JN051275.1          AGGAGGCTATGGCTCCTAAGCACAAAGAAATGCCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCT
gi|404385797|gb|JX273430.1| AGGAGGCTATGGCTCCTAAGCACAAAGAAATGCCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCT
JN051276.1          AGGAGGCTATGGCTCCTAAGCACAAAGAAATGCCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCT
gi|404385795|gb|JX273429.1| AGGAGGCTATGGCTCCTAAGCACAAAGAAATGCCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCT
EF133460.1          AGGAGGCTATGGCTCCTAAGCACAAAGAAATGCCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCT
EF123100.1          AGGAGGCTATGGCTCCTAAGCACAAAGAAATGCCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCT
                    ***** *****

JN051275.1          TT-----
gi|404385797|gb|JX273430.1| TT-----
JN051276.1          TT-----
gi|404385795|gb|JX273429.1| TT-----
EF133460.1          TTACCGAAAGCCAGAGCCTGACTCTCACTGATGTTGAAAATCTGCACCTTCCTCTGCGCTC
EF123100.1          TTACTGAAAGCCAGAGCCTGACTCTCACTGATGTTGAAAATCTGCACCTTCCTCTGCGCTC
                    **

```

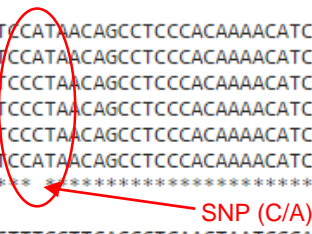


Figura 6: Alineamiento de las secuencias del exón 7 del gen *CSN2* de *Bos indicus* y *Bos taurus*.

Con base en dicho alineamiento se observó la zona que cubre la posición del polimorfismo de interés (cambio de base C/A en el segundo grupo alineado) y se diseñaron los siguientes controles sintéticos (Tabla 7) y oligonucleótidos (Tabla 8).

**Tabla 7: Controles sintéticos.**

Nombre	Secuencia	Tamaño (bases)	Tm (°C)
<b>BCASinA1</b>	TCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCCATAAC AGCCTCCCACAAAACATCCCTCCTCTTACT	66	75.8
<b>BCASinA2</b>	TCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCCCTAAC AGCCTCCCACAAAACATCCCTCCTCTTACT	66	76.5

En rojo se identifica el cambio de base, ambas secuencias se encuentran en sentido 5' a 3'.

**Tabla 8: Diseño de oligonucleótidos.**

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño (bases)	Tm (°C)	%GC
<b>BCAf</b>	TCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGG	23	64.6	52
<b>BCAr</b>	AGTAAGAGGAGGGATGTTTTGTGG	24	63.6	57

La secuencia de los oligos se encuentra en dirección 5' a 3'

Se comprobó mediante un nuevo alineamiento con los softwares Mega7 y UGENE, si el diseño de oligonucleótidos y controles sintéticos fue el adecuado.

Primero se realizó un alineamiento entre los controles sintéticos y los oligonucleótidos (Figura 7), en este alineamiento se comprobó que existe el 100% de cobertura entre los oligonucleótidos y las secuencias control ya diseñadas, por lo que al amplificar en la reacción de PCR, se obtendría un amplificado de 66 pb.

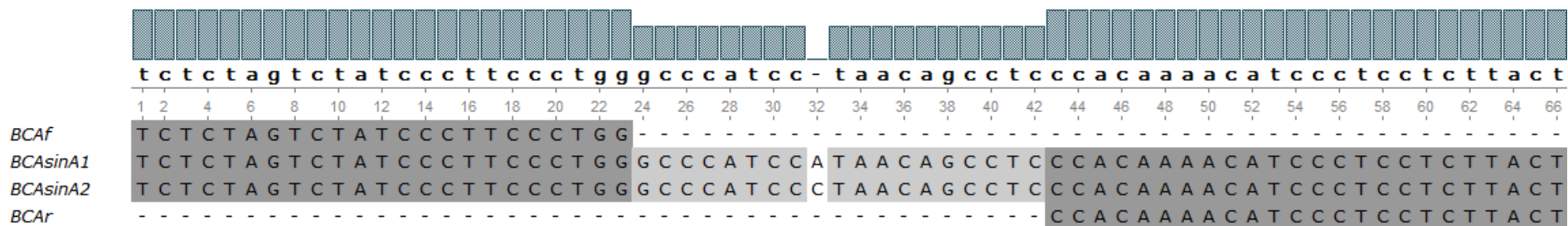


Figura 7: Alineamiento de controles sintéticos con los oligonucleótidos diseñados.

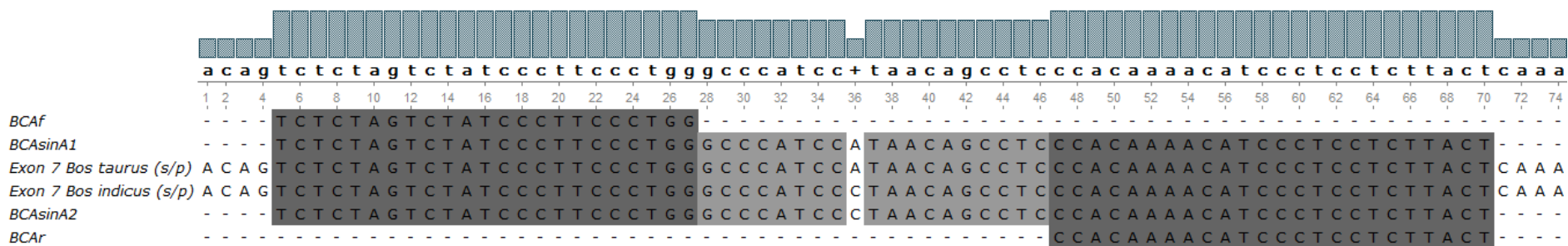


Figura 8: Alineamiento de secuencias con los controles sintéticos y oligonucleótidos diseñados.

En la Figura 8 se muestra la comprobación teórica del tamaño del amplificado que se obtuvo al correr las reacciones de PCR de cada muestra analizada, al igual que los controles sintéticos, un tamaño de 66 pb, también se comprobó el 100% de cobertura entre los oligonucleótidos con la secuencia del gen *CSN2* que se buscó amplificar.

### 7.3 Amplificación por PCR.

Se obtuvo un amplificado de 66 pb como se muestra en la Figura 9, correspondiente al tamaño de los controles diseñados y de la región flanqueada del gen *CSN2* por los oligos diseñados, como se mostró en el análisis bioinformático.

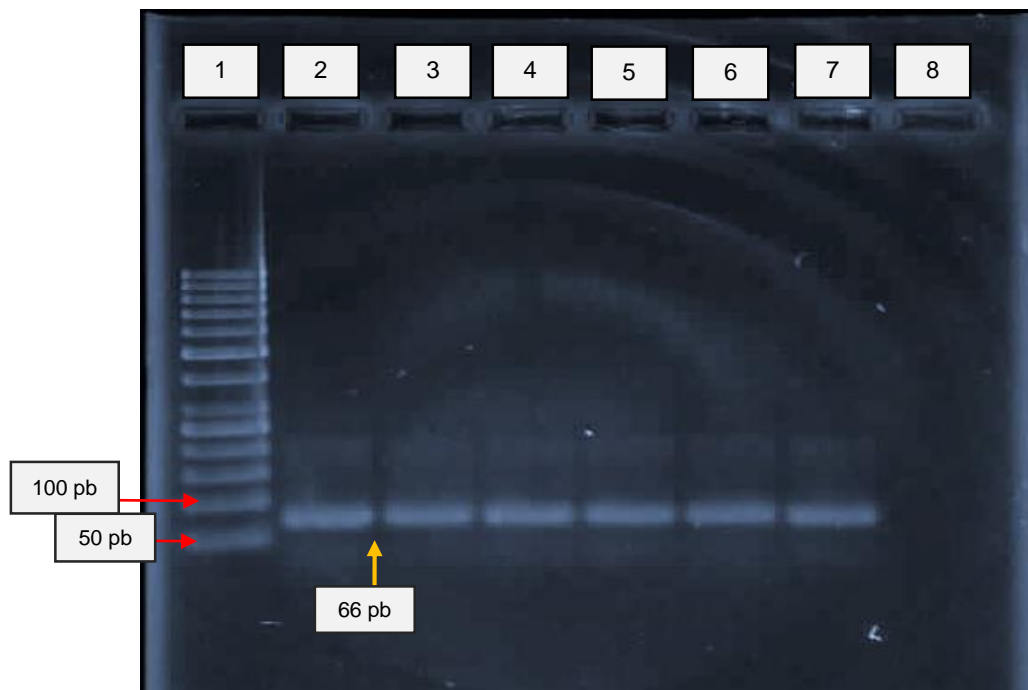


Figura 9: Producto de PCR corrido en electroforesis.

Carriles; 1: Marcador de peso molecular (50 pb), 2: Control sintético BCAsinA1, 3: Control BCAsinA2, 4: Mezcla de ambos controles, 5-7: Muestras representativas del experimento, 8: Control negativo.

En el carril 8 (Figura 9), solo se colocó la mezcla de reacción sin ADN como control negativo, al no aparecer esta banda, se comprobó que no hay formación de dímeros ni hibridación entre los oligonucleótidos diseñados para este trabajo.

En la figura 10, se muestran las curvas de los amplificadores de PCR de cada una de las muestras analizadas en este trabajo.

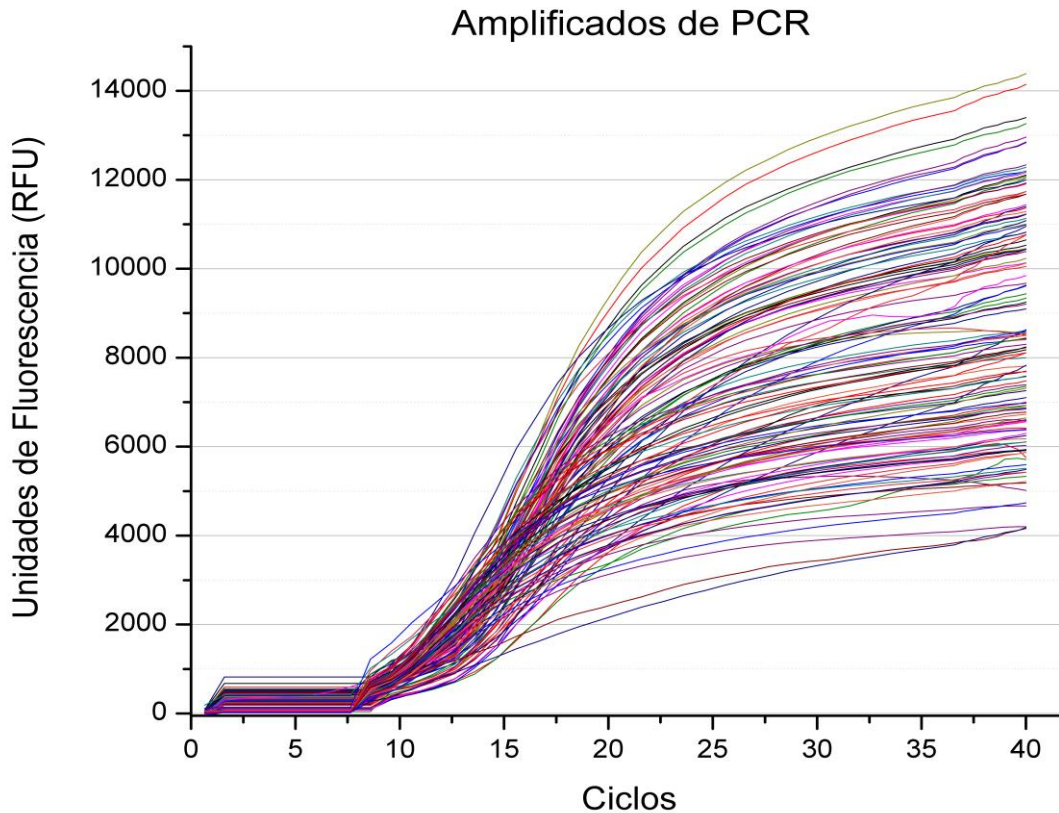


Figura 10: Amplificados de PCR

Con estos patrones de amplificación (Figura 10), se observó que la gran mayoría de las muestras inician la fase exponencial a partir del ciclo 10 y estabilizándose la reacción de síntesis de ADN aproximadamente en el ciclo 25, obedeciendo a un patrón típico de amplificado, detectado por el equipo de qPCR, con lo que se confirma que la existencia de ADN amplificado, además que el máximo nivel de fluorescencia obtenido fue poco más de 14 mil RFU's y la mínima fue de 4 mil RFU's, con estos niveles de fluorescencia es posible realizar el análisis de curvas de disociación propuesto.

#### 7.4 Análisis de alta resolución de las curvas de disociación (High Resolution Melting [HRM]).

Al realizar el análisis HRM a las curvas de disociación, se obtuvieron los patrones gráficos de los controles, con un 99% de eficiencia de llamada por el algoritmo de agrupamiento automático, es decir, el nivel de agrupamiento de los genotipos (dados por cada control), fue un 99% eficiente.

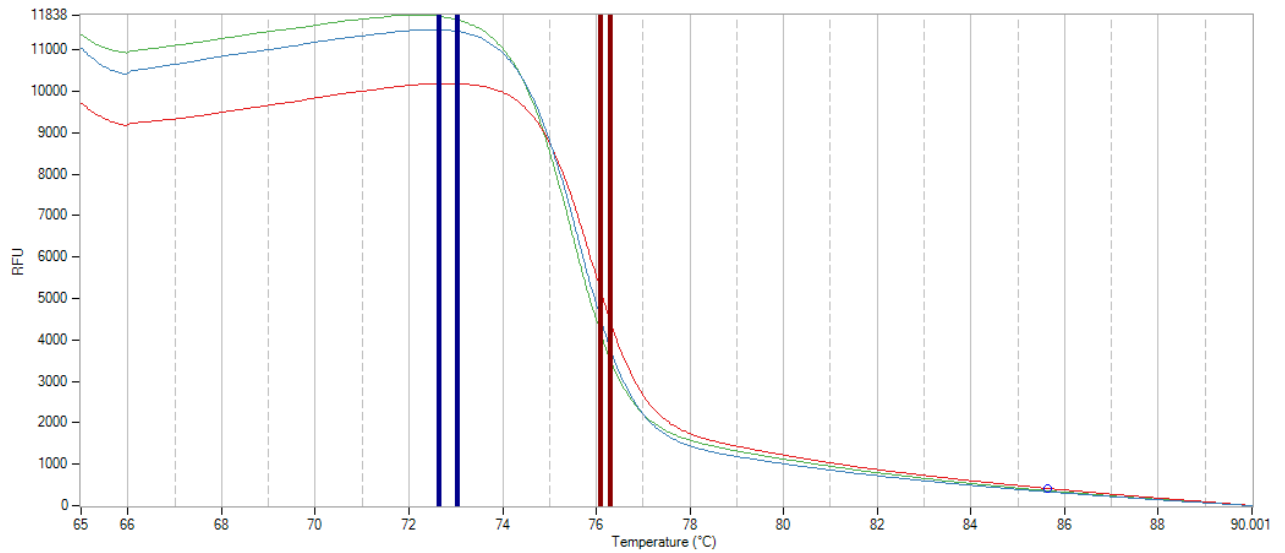


Figura 11: Diferenciación y disminución de fluorescencia de los controles sintéticos respecto al aumento de temperatura. Las barras paralelas verticales, delimitan la zona de diferenciación.



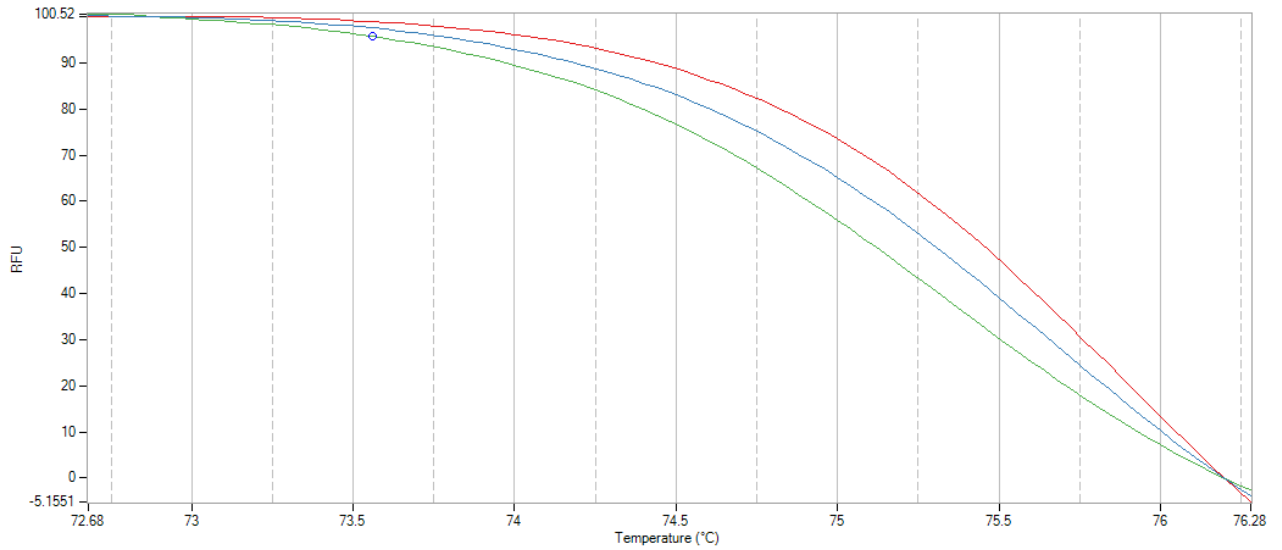


Figura 13: Gráfica HRM. Patrón de curvas normalizadas en el rango de temperatura seleccionado para la diferenciación de los 3 controles y sus genotipos.

Una vez observado el patrón de los controles sintéticos y sus agrupaciones (Figuras 11, 12 y 13), se procesaron las muestras en distintas corridas, obteniendo las siguientes curvas.

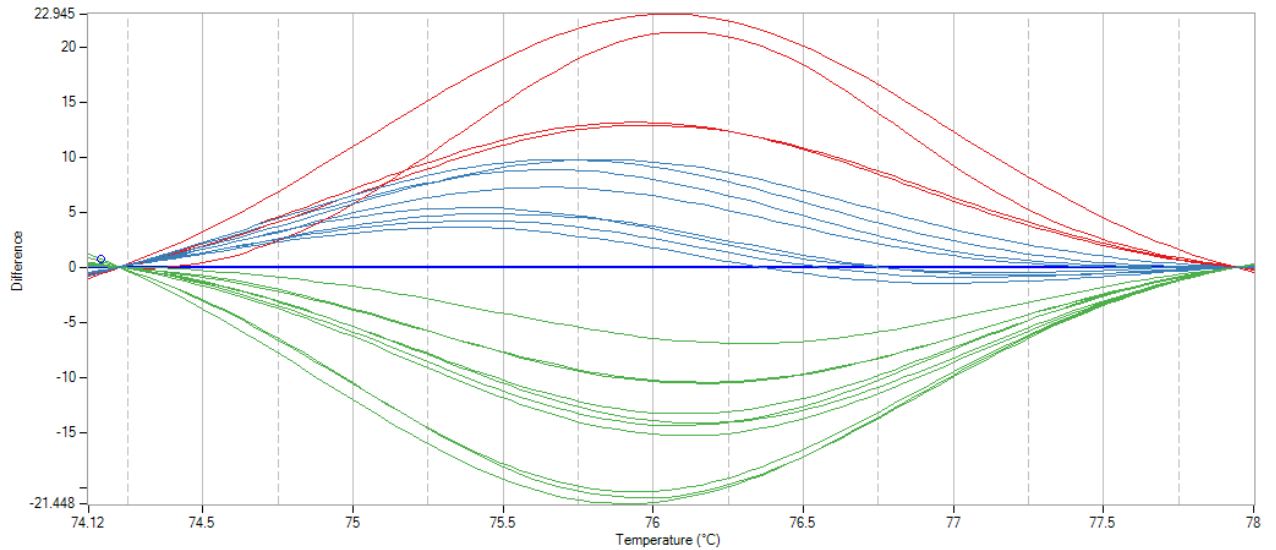


Figura 14: Gráfica diferencial. Agrupamiento de las muestras con respecto a los 3 controles sintéticos.

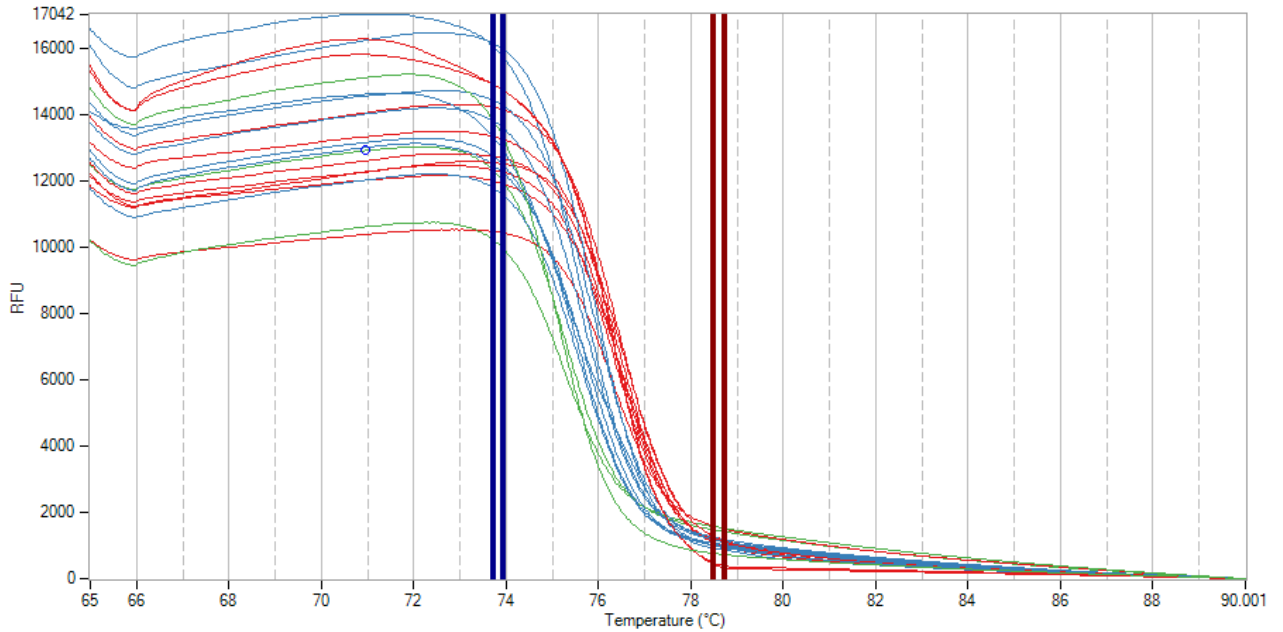


Figura 15: Gráfica HRM. Diferenciación de las muestras durante la caída de fluorescencia al aumentar la temperatura.

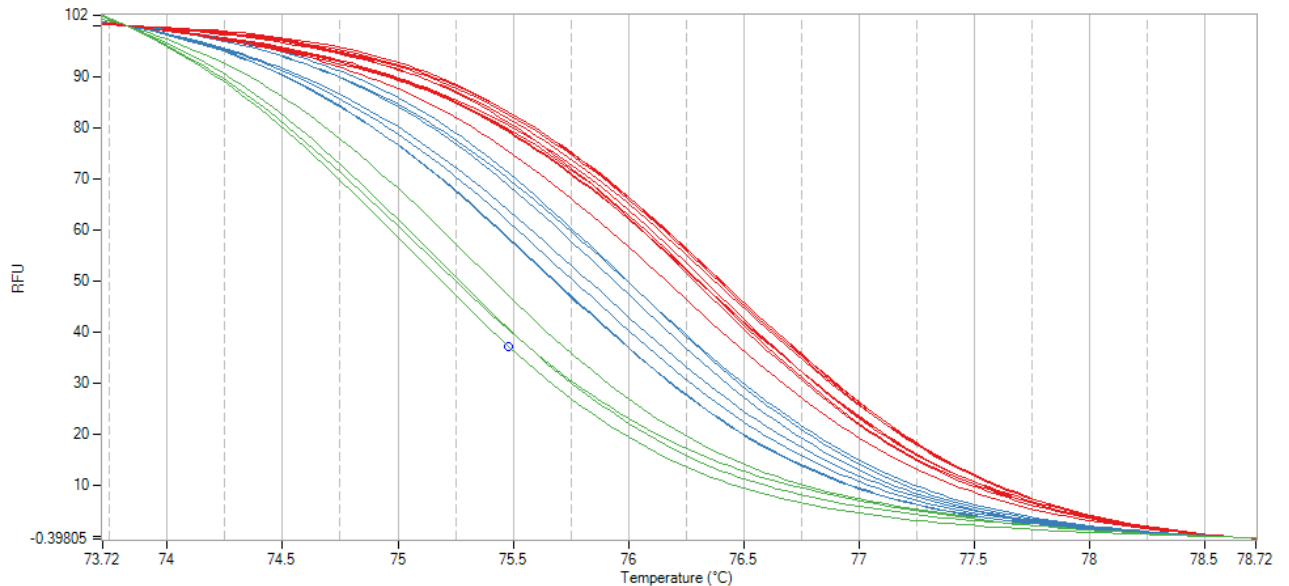


Figura 16: Gráfica HRM normalizada.

Al finalizar el análisis HRM y observar los mejores patrones de referencia entre controles y muestras (gráfica HRM y gráfica diferencial), se pudo asignar el genotipo determinado por cada control. En verde se muestran los pertenecientes al genotipo A1A1, en rojo se representan las del genotipo A2A2 y finalmente en azul, las pertenecientes al heterocigoto A1A2 (en el Anexo 3, se muestran los patrones obtenidos por HRM para cada una de las muestras analizadas en este trabajo).

## 7.5 Análisis estadístico.

Al asignar los genotipos a cada una de las muestras se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 9), en la cual se muestran la cantidad de animales que presentan los 3 genotipos encontrados, y la relación que tiene cada genotipo con la generación del péptido BCM-7.

**Tabla 9: Numero de animales genotipados.**

<b>Genotipo</b>	<b>Hembras</b>	<b>Presencia de BCM-7</b>
<b>A1A1</b>	45	Produce
<b>A1A2</b>	57	Puede producir
<b>A2A2</b>	40	No produce
<b>Total</b>	142	

Con estos resultados se pudo obtener las frecuencias genotípicas presentes en la población analizada (Tabla 10).

**Tabla 10: Frecuencias genotípicas de la población analizada.**

<b>Genotipo</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>A1A1</b>	0.317
<b>A1A2</b>	0.401
<b>A2A2</b>	0.282

A través de la ecuación de equilibrio de Hardy-Weimberg:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Donde:

$p^2$  = la frecuencia del genotipo A1A1

$2pq$  = la frecuencia del genotipo A1A2

$q^2$  = la frecuencia del genotipo A2A2

Se obtuvo la frecuencia de los alelos A1 y A2 respectivamente de la población analizada (Tabla 11).

**Tabla 11: Frecuencias alélicas detectadas en la población analizada.**

Alelos	Frecuencia
A1	0.5176
A2	0.4824

Al detectar los tres genotipos presentes en la población analizada, se debe considerar que la opción más viable, sobre el origen de los animales estudiados, es que son el resultado de cruzas entre progenitores heterocigotos. Por tanto el resultado teórico esperado de la población debería ser en relación 1:2:1 como se muestra en el siguiente cuadro de Punnett (Falconer, 1960), que muestra la conformación genotípica resultada de la cruce de organismos heterocigotos.

**Tabla 12: Diagrama de Punnet de los progenitores teóricos de la población analizada.**

Progenitores		Hembras			
		A1		A2	
<i>Machos</i>	A1	A1A1	¼	A1A2	¼
	A2	A1A2	¼	A2A2	¼

Con base en la tabla 12, se determinó que la relación genotípica de la población esperada es A1A1: 1/4, A1A2: 2/4 y A2A2: 1/4 con lo cual se cumple la relación

propuesta de 1:2:1. Con ello, se pudo obtener las frecuencias esperadas (total analizado/valor esperado), las cuales se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13: Comparación de valores estimados y valores esperados.**

<b>Genotipo</b>	<b>Valor obtenido</b>	<b>Valor esperado</b>	<b>Frecuencia obtenida</b>	<b>Frecuencia esperada</b>
<b>A1A1</b>	45	35.5	0.317	0.25
<b>A1A2</b>	57	71	0.401	0.5
<b>A2A2</b>	40	35.5	0.282	0.25

De acuerdo a la prueba de  $X^2$ :

$$X^2 = \sum (Valor observado - valor esperado)^2 / valor esperado$$

Se obtuvo cada valor de  $X^2$  y la  $X^2$  estimado.

**Tabla 14: Valores de  $X^2$ .**

<b>Genotipo</b>	<b>Valor obtenido</b>	<b>Valor esperado</b>	<b><math>X^2</math></b>
<b>A1A1</b>	45	35.5	2.5422
<b>A1A2</b>	57	71	2.7605
<b>A2A2</b>	40	35.5	0.5704
	<b><math>X^2</math> estimada</b>		<b>5.8731</b>

Con los datos obtenidos de  $X^2$ , podemos determinar si la población analizada se encuentra dentro del equilibrio de Hardey-Weimberg mediante la siguiente toma de decisión:

$$X^2_{estimado} < X^2_{tablas}$$

*La población analizada está en equilibrio*

Para la obtención de  $X^2_{tablas}$  se toman como grados de libertad a número de alelos menos uno, y un nivel de significancia de 0.05, y con estos se obtuvo el siguiente valor:

$$X^2_{(2 \text{ alelos}-1)/sig 0.05} = 3.8415$$

Comparando los valores estimados y obtenidos de tablas se tiene que:

$$X^2_{esp} = 5.8731 > X^2_{tab} 3.8415$$

Con este resultado se comprueba que la población de hembras lactantes analizada en este trabajo, no se encuentra en condiciones de equilibrio Hardy-Weimberg con respecto a los alelos A1 y A2 del gen *CSN2*.

## 8 DISCUSIÓN

Por medio del análisis HRM, se pudo identificar el polimorfismo que origina a la variante alélica A1 en el gen *CSN2* y determinar los genotipos presentes en la población analizada.

Del análisis realizado sobre 142 hembras en lactación (bovinos de DP), se obtuvo que la frecuencia del alelo A1 fue 0.5176 y para el alelo A2 de 0.4824 (Tabla 11), obteniéndose una relación aproximada de 1:1, indicando que por cada animal portador del alelo A1 existe otro que porta el alelo A2, con este resultado, rechazamos la hipótesis propuesta para este trabajo, debido a que la frecuencia del alelo A2 no es mayor que la del alelo A1. Sin embargo, al identificar los genotipos dentro de nuestra población analizada, se encontró que por cada 100 bovinos, 32 son del genotipo homocigoto A1A1, 40 heterocigotos A1A2 y 28 pertenecen al homocigoto A2A2. Resultados que si bien, no están muy alejados del teórico esperado (35.5, 71 y 35.5 respectivamente; Tabla 14), al momento de obtener el resultado estadístico de  $X^2$ , se encontró que la población está fuera del equilibrio de Hardy-Weimberg.

Analizando desde el punto de vista conceptual, la ley de Hardy-Weimberg, enuncia que “en una población panmíctica (es decir, donde los individuos se aparean al azar), de gran tamaño y donde todos los individuos son igualmente viables y fecundos, el proceso de la herencia, por sí mismo, no cambia las frecuencias alélicas ni genotípicas de un determinado locus” (Cabrerero y Camacho, 2002). Sin embargo, como mencionó Cervantes (2007), los mejoramientos en la producción de carne y leche, se basan en la selección de rasgos cuantitativos, fenotípicos y recientemente los genéticos. Con el simple hecho de darse esta selección, se evita que el apareamiento sea azaroso, perdiéndose así la segregación aleatoria de genes, sin embargo, en las poblaciones tropicales de ganado bovino, estos procesos de selección, aun no se encuentran totalmente sistematizados (Ortega and Ward, 2005), por lo que la segregación de genes, de una población a otra, sigue siendo aleatoria.

Uno de los factores que pueden afectar que la población analizada no sea homogénea o que no se encuentre en equilibrio, es la poca o nula caracterización genética que existe actualmente en la región, sobre el ganado de doble propósito, y a la cruce indiscriminada de animales con orígenes fenotípicos tendientes al incremento de producción de leche. Otro factor que puede estar involucrado en la distribución de los alelos identificados, es la deriva genética, la cual se define como, “frecuencias genéticas que se modifican por azar en una población finita” (Cabrero y Camacho, 2002), respecto a este fenómeno, se cree que la distribución alélica posiblemente se ve afectada de una generación a otra, debido al flujo constante de animales de un hato a otro, ya que como se observa en el ganado de DP, los animales al alcanzar cierto nivel de producción, sea leche o carne, pueden ser comercializados como pie de cría a otros productores o para consumo humano, sin haber sido evaluadas las características genéticas de este, y por ende, no conocer las de su descendencia. Llevando con esto, a que en generaciones futuras se pierdan estas características genéticas deseadas.

En nuestro país, estudios como los de Pons-Fita (2015), dirigido hacia la búsqueda de las frecuencias de estos dos alelos, en poblaciones de raza Holstein, encuentra una relación similar aparente, entre los alelos A1 y A2 del gen *CSN2* detectadas con las frecuencias ya reportadas en la literatura sobre dicha raza. Las frecuencias reportadas en su estudio (A1: 0.35 y 0.42; A2: 0.65 y 0.58), distan significativamente de las encontradas y reportadas en este trabajo (A1: 0.5176 y A2: 0.4124). Si comparamos los resultados de este trabajo con las frecuencias reportadas en la Tabla 3, observamos, que existe una similitud aparente con lo reportado por Jann (2002) en ganado Rojo en Polonia, donde la frecuencia del alelo A1 es dominante, y con los datos reportados por Kaminski (2007) ganado Holstein en EUA, en donde la frecuencia del alelo A1 y A2 alternan dominancia (0.35-0.49 y 0.49-0.65 respectivamente). Investigadores como Duifhuis-Rivera (2014) y Pons-Fita (2015), informaron de una tendencia marcada en el aumento de la frecuencia de genotipos con el alelo A2 en los hatos lecheros, tanto del país, así como a nivel mundial. Sin embargo, los resultados de este trabajo, difieren debido a que las frecuencias encontradas fueron muy similares, con una ligera ventaja del alelo A1.

En la región existen pocos estudios sobre el ganado local de doble propósito, sin embargo, de acuerdo a la relación encontrada por Gustavsson *et al.* (2014), pueden implementarse este tipo de análisis complementarios, como el que presentamos en este trabajo, junto al realizado por Cortés-López (2012), por ejemplo, donde se detectó las frecuencias alélicas del gen de  $\kappa$ -CN (CSN3) en ganado de doble propósito en la región del Papaloapan, y con ello, llevar a cabo series de pruebas genéticas para determinar que genotipos tiene cada animal de interés y su posible ventaja productiva frente a otros, y en este caso, se determinó que el análisis de PCR en tiempo real con HRM, es una herramienta idónea para la identificación de este y otros genotipos de interés productivo, así como la identificación de diferentes características de importancia económica (QTL's), en las diversas especies de interés zootécnico.

## 9 CONCLUSIONES

- El análisis HRM, resultó efectivo para detectar los alelos presentes en la población analizada.
- La amplificación por qPCR con el fluoróforo SybrGreen, combinado con el análisis HRM, resultaron efectivos para la detección del cambio de base C/A (polimorfismo) en las muestras de ADN de bovinos de DP (hembras lactantes) de la región del Papaloapan.
- Se detectaron hembras con los 3 genotipos esperados en una proporción 0.317, 0.401 y 0.282 para los genotipos A1A1, A1A2 y A2A2 respectivamente.
- La frecuencia obtenida de los alelos A1 y A2 fue 0.5176 y 0.4824 respectivamente, observándose una mayor frecuencia del alelo A1, contraria a la hipótesis propuesta.
- La población no se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg.

## 10 PERSPECTIVAS

- Comprobar mediante secuenciación, la eficacia del método desarrollado.
- Realizar estudios de correlación genotipo-fenotipo, sobre la composición proteica de la leche y los resultados obtenidos de la población analizada.
- Realizar programas de cruzamiento dirigido para la obtención de ganado con solo el alelo A2, para así poder obtener leche libre del alelo A1.
- Evaluar condiciones de producción y comercialización en el mercado local para la leche tipo A2 como un nuevo producto de la región de valor agregado.
- Evaluar otros polimorfismos, de las caseínas, que estén presentes en la población de bovinos de doble propósito y así generar hatos con alta calidad genética y alta productividad.

## 11 ANEXOS

### 11.1 Anexo 1: Protocolo de extracción de ADN.

El siguiente protocolo es útil para la extracción de ADN a partir de 100 y 200  $\mu\text{L}$  (como máximo) de sangre completa. Para muestras de sangre congeladas, se recomienda descongelar y llevar a temperatura ambiente previo a la extracción de ADN.

- Se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de Genomic Lysis Buffer a 200  $\mu\text{L}$  de sangre completa en un tubo de reacción, y fue mezclado mediante vortex 4-6 segundos, dejando reposar 5-10 minutos a temperatura ambiente.
- Se transfirió la mezcla a la columna Zymo-Spin™ en un tubo colector y se centrifugó a 10000 x g por un minuto. Posteriormente se desechó contenido del tubo colector.
- Se transfirió la columna a un nuevo tubo colector, y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de ADN Pre-Wash Buffer a la columna. Volviendo a centrifugar a 10000 x g por un minuto.
- Después de centrifugar, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de g-DNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó por un minuto.
- Se transfirió la columna a un microtubo limpio, y se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de DNA Elution Buffer a la columna, dejando reposar a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifugó a 16000 x g (máxima velocidad) 30 segundos.

El ADN eluido se almacenó en refrigeración a temperatura menor a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso.

## 11.2 Anexo 2: Secuencias utilizadas para el diseño de controles y oligonucleótidos

### 11.2.1 Secuencia del exón 7 del gen *CSN2* de *Bos indicus*.

>EF133460.1 *Bos indicus* beta-casein (*CSN2*) gene, exon VII and partial cds

```
GATGAACTCCAGGATAAAAATCCCCCCTTTGCCAGAACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGCC  
ATCCATAACAGCCTCCCACAAAACATCCCTCCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGTGCCGCTTTC  
CTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAGTGAAGGAGGCTATGGCTCCTAAGCACAAAGAAATG  
CCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCTTTACCGAAAGCCAGAGCCTGACTCTCACTGATGTTGAA  
AATCTGCACCTTCCCTCTGCCTCTGCTCCAGTCTTGGATGCACCAGCCTCACCAGCCTCTTCCCTCA  
ACTGTCATGTTTCCCTCCTCAGTCCGTGCTGTCCCTTTCTCAGTCCAAAGTCTGCCTGTTCCCCAG  
AAAGCAGTGCCCTATCCCCAGAGAGATATGCCATTTCAGGCCTTTCTGCTGTACCAGGAGCCTGTA  
CTCGGTCTGTCCGGGGACCCTTCCCTATTATT
```

### 11.2.2 CDS parcial del alelo A1 del gen *CSN2* de *Bos indicus*.

>JN051275.1 *Bos indicus* breed Gyr beta-casein (*CSN2*) gene, *CSN2*-A1 allele, partial cds

```
AACCAAACCAAATGGAAGATTTTCTTTCTCTCTCTTCACTGAATTATGTTTTAAAAAGAGG  
AGGATAATTCATCATGAATAACAATTATAACTGGATTATGGACTCAAAGATTTGTTTTCCCT  
TCTTTCCAGGATGAACTCCAGGATAAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCT  
ATCCCTTCCCTGGGCCCATCCATAACAGCCTCCCACAAAACATCCCTCCTTACTCAAAC  
CCCTGTGGTGGTGCCGCTTTCCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAGTGAAGGAG  
GCTATGGCTCCTAAGCACAAAGAAATGCCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCTTT
```

### 11.2.3 CDS parcial del alelo A2 del gen *CSN2* de *Bos indicus*.

>JN051276.1 *Bos indicus* breed Gyr beta-casein (*CSN2*) gene, *CSN2*-A2 allele, partial cds

AACCAAACCAAATGGAAGATTTTCTTTCTCTCTCTTCACTGAATTATGTTTTAAAAAGAGG  
AGGATAATTCATCATGAATAACAATTATAACTGGATTATGGACTCAAAGATTTGTTTTCT  
TCTTTCCAGGATGAACTCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCT  
ATCCCTTCCCTGGGCCATCCCTAACAGCCTCCCACAAAACATCCCTCCTCTTACTCAAAC  
CCCTGTGGTGGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAGTGAAGGAG  
GCTATGGCTCCTAAGCACAAAGAAATGCCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCTTT

### 11.2.4 Secuencia del exón 7 del gen *CSN2* de *Bos taurus*.

>EF123100.1 *Bos taurus* beta-casein (*CSN2*) gene, exon VII and partial cds

GATGAACTCCAGGATAAAATCCCCCTTTGCCAGAACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCCTG  
GGCCATCCATAACAGCCTCCCACAAAACATCCCTCCTCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGT  
GCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAGAGTGAAGGAGGCTATGGCTCCT  
AAGCACAAAGAAATGCCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCTTACTGAAAGCCAGAGCC  
TGACTCTCACTGATGTTGAAAATCTGCACCTTCCTCTGCCTCTGCTCCAGTCTTGGATGCA  
CCAGCCTCACCAGCCTTTCCTCCAACGTGCATGTTTTCCTCCTCAGTCCGTGCTGTCCCTT  
TCTCAGTCCAAAGTCCCTGCCTGTTCCCCAGAAAGCAGTGCCCTATCCCCAGAGAGATATGC  
CCATTCAGGCCTTCTGCTGTACCAGGAGCCTGTACTCGGTCCTGTCCGGGGACCCTTCCC  
TATTATT

### 11.2.5 CDS parcial del alelo A1 del gen *CSN2* de *Bos taurus*.

>gi|404385797|gb|JX273430.1| *Bos taurus* beta-casein (*CSN2*) gene, *CSN2*-A1 allele, exon 7 and partial cds

GATGAACTCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCC  
CTGGGCCATCCATAACAGCCTCCCACAAAACATCCCTCCTCTTACTCAAACCCCTGTGGT  
GGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAGTGAAGGAGGCTATGGCT  
CCTAAGCACAAAGAAATGCCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCTTT

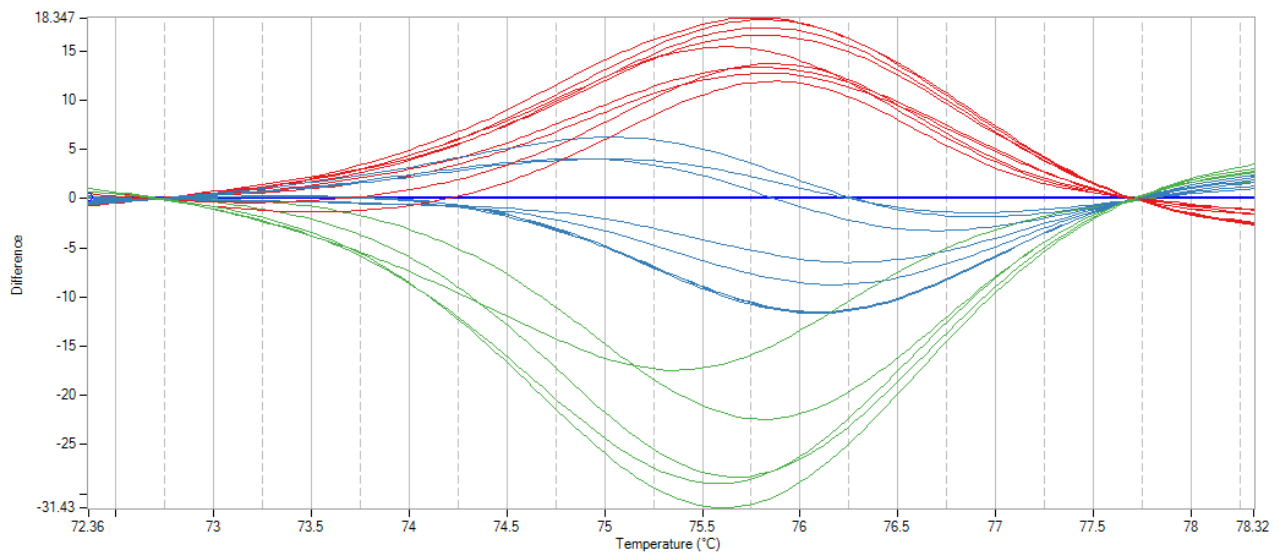
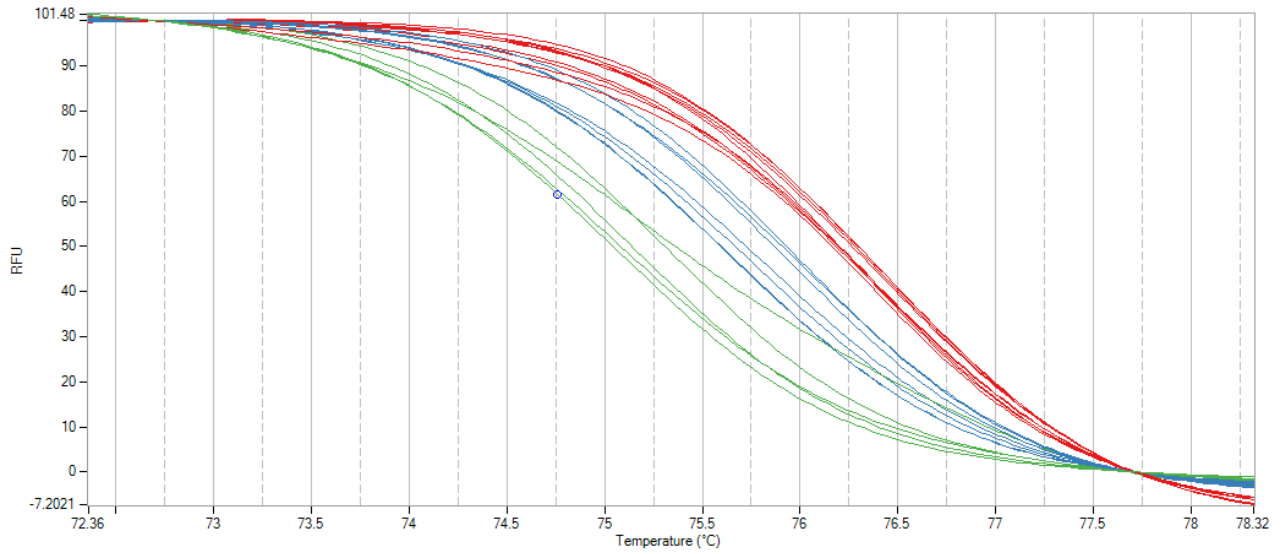
### 11.2.6 CDS parcial del alelo A2 del gen *CSN2* de *Bos taurus*.

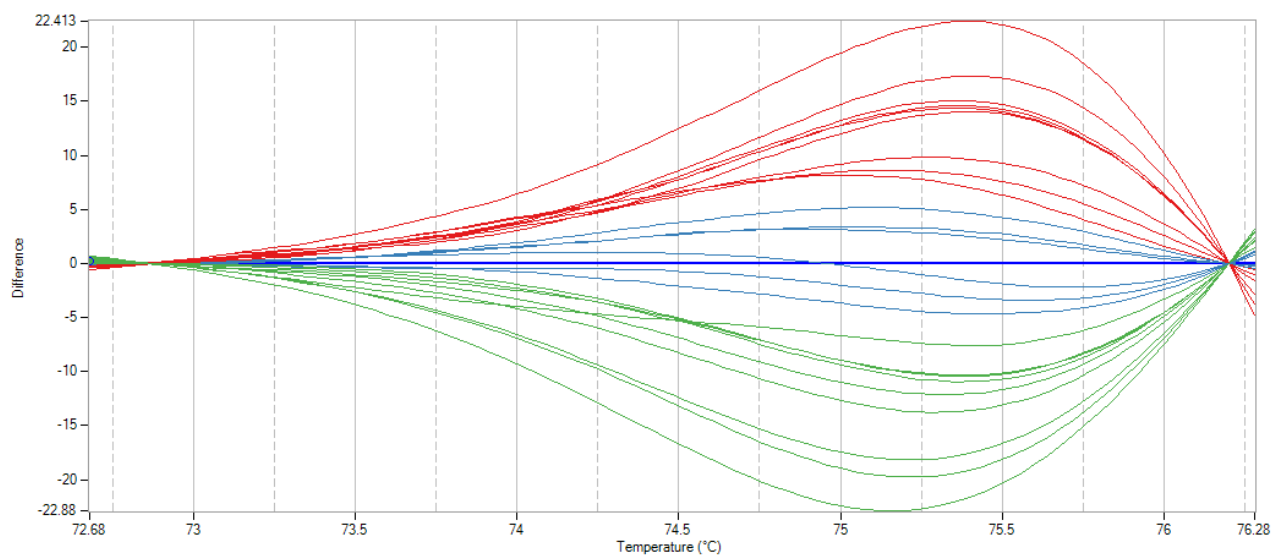
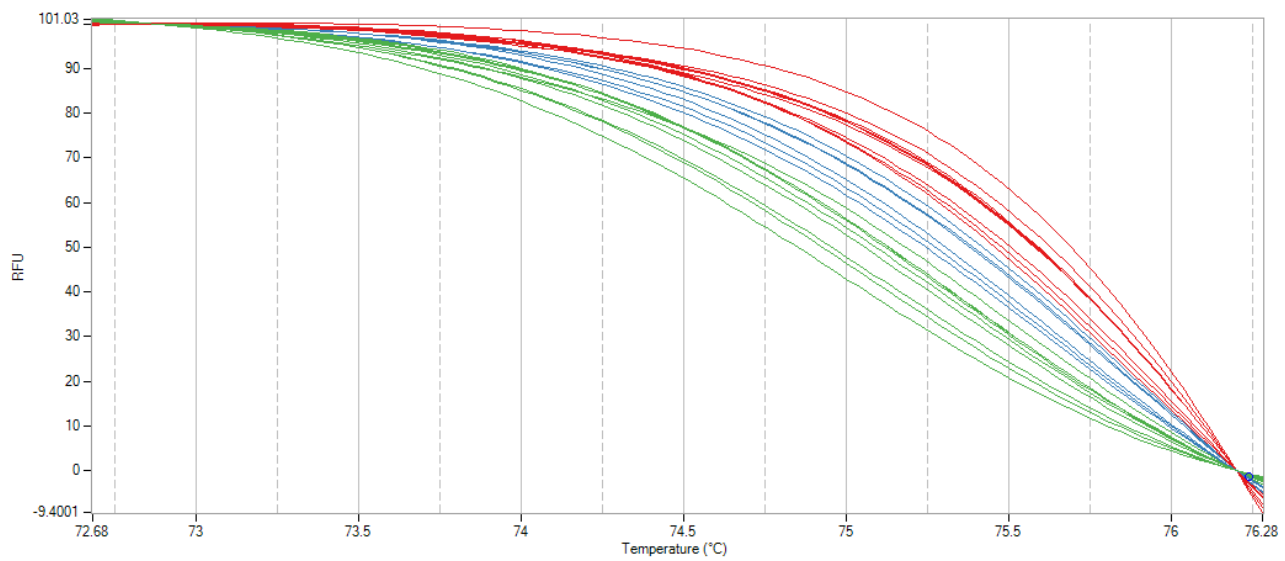
>gi|404385795|gb|JX273429.1| Bos taurus beta-casein (*CSN2*)  
gene, *CSN2*-A2 allele, exon 7 and partial cds

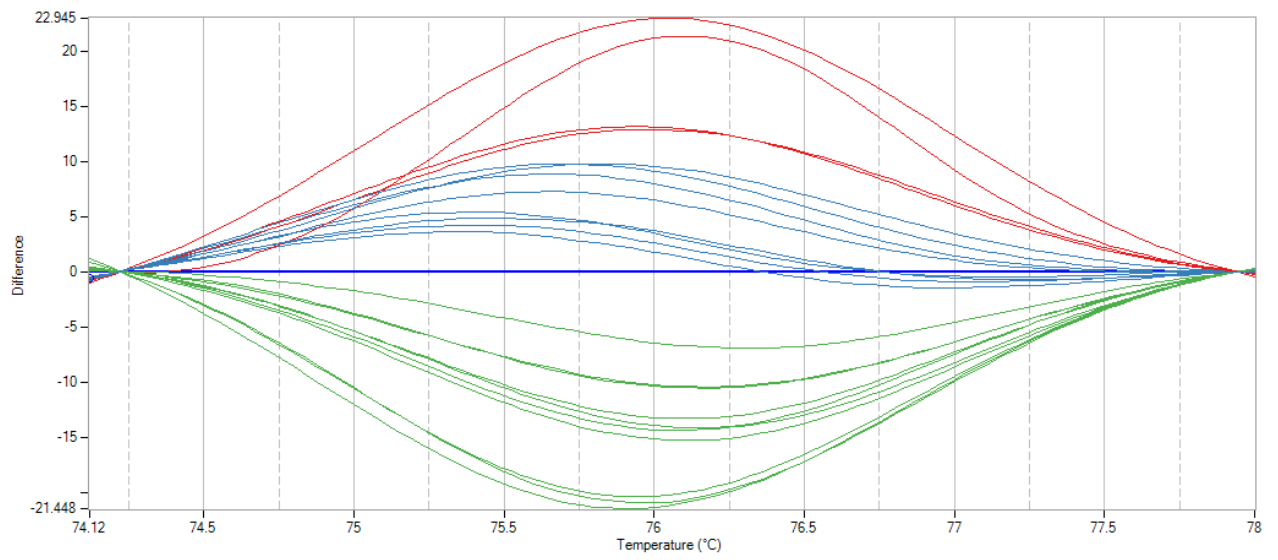
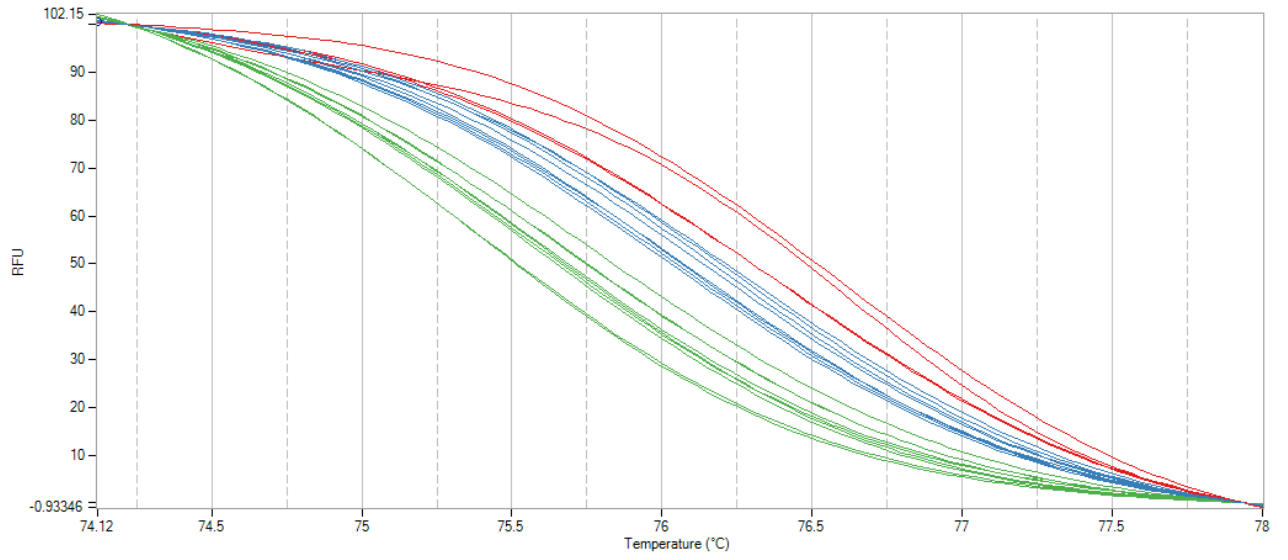
```
GATGAACTCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCC  
CTGGGCCCATCCCTAACAGCCTCCCACAAAACATCCCTCCTCTTACTCAAACCCCTGTGGT  
GGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCAAAGTGAAGGAGGCTATGGCT  
CCTAAGCACAAAGAAATGCCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCTTT
```

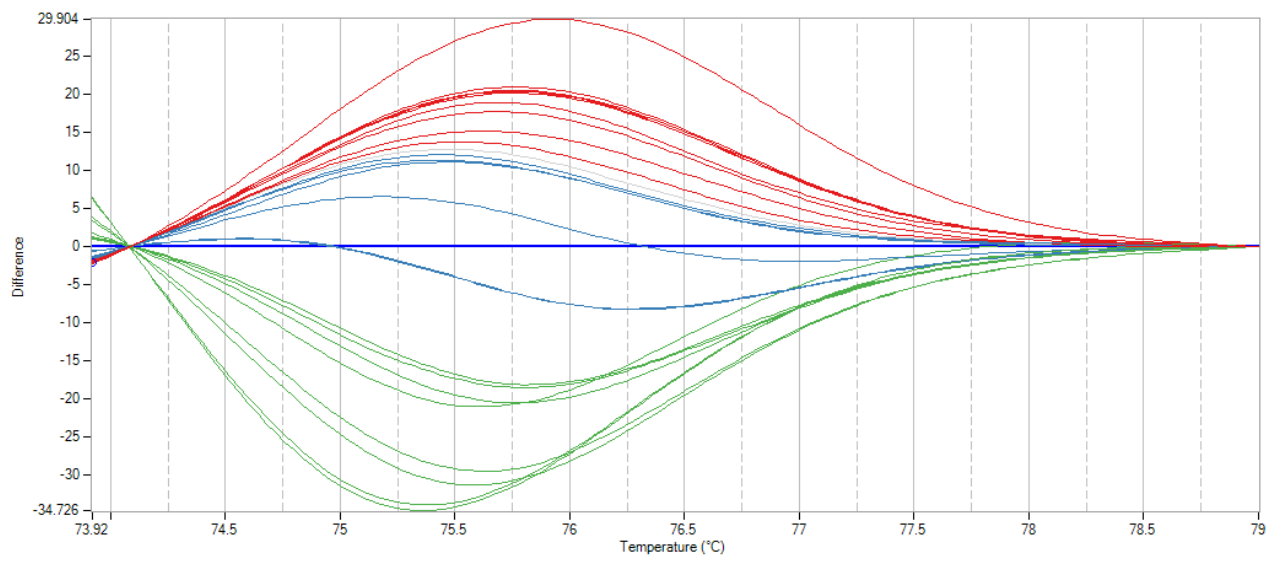
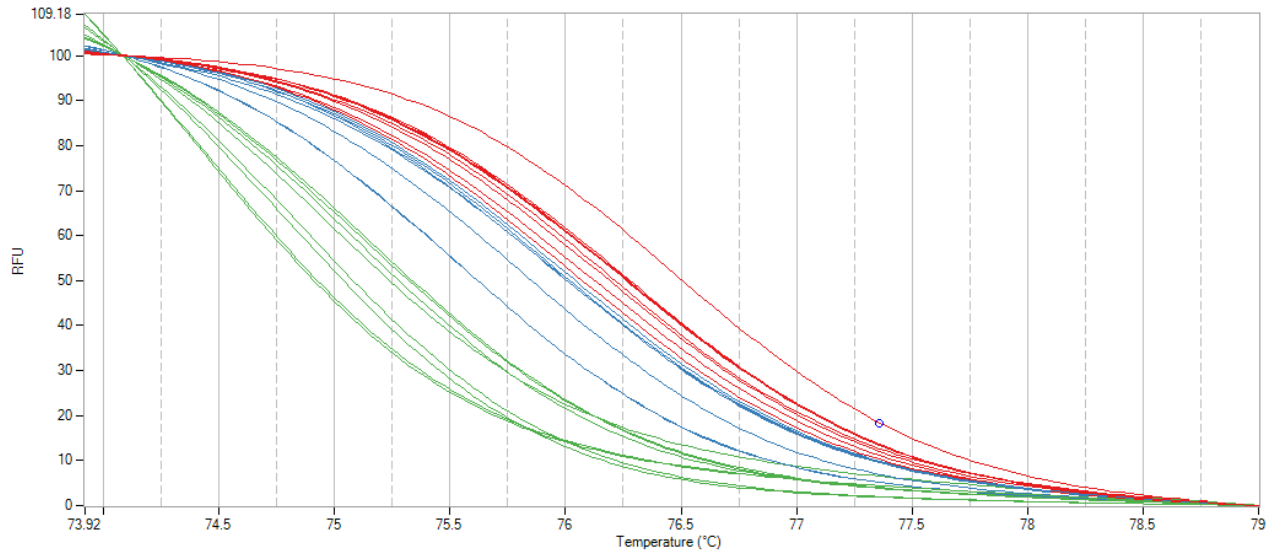
### 11.3 Anexo 3: Gráficas HRM y Gráficas diferenciales HRM.

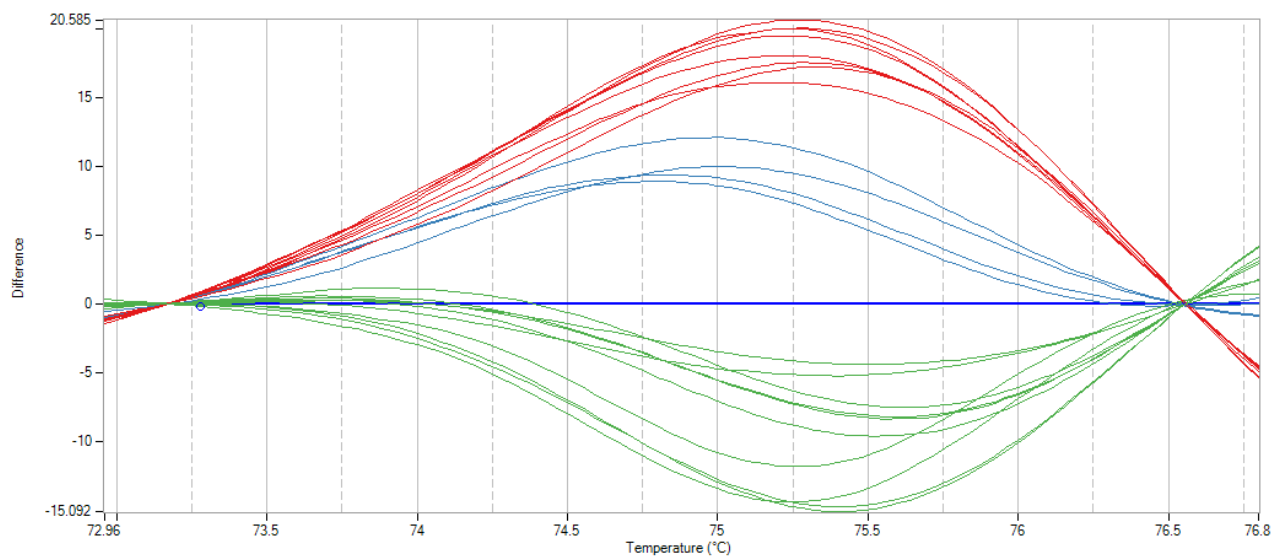
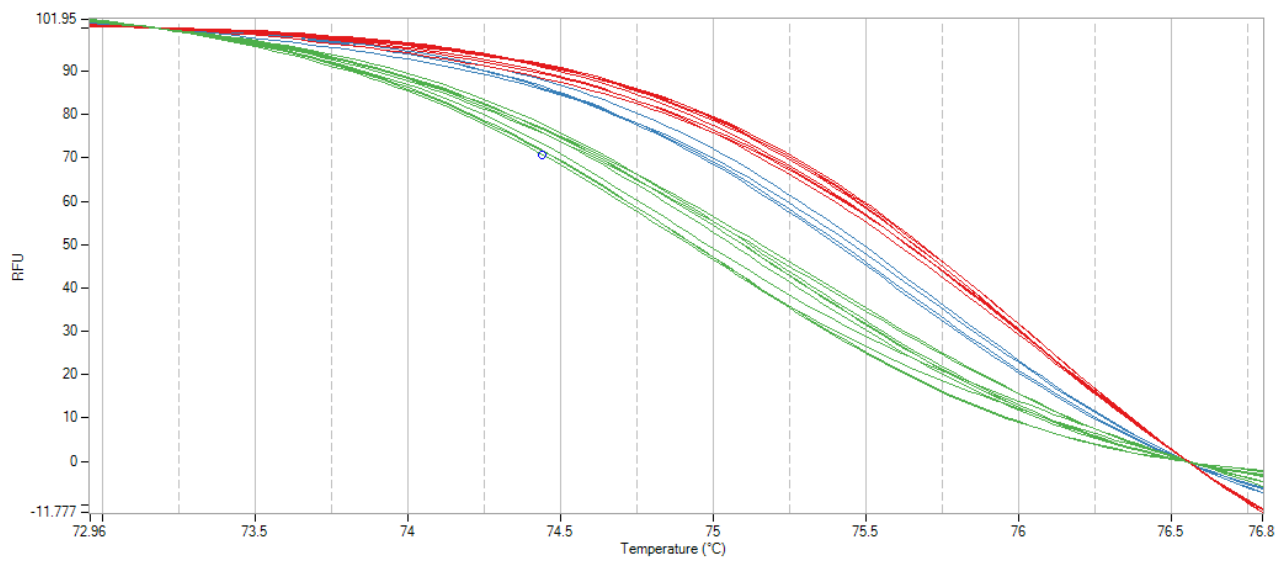
Se muestran las gráficas HRM normalizadas y su correspondiente gráfica diferencial de las pruebas realizadas. En color verde se identifica el genotipo A1A1, en Azul se observa el heterocigoto A1A2 y en rojo el homocigoto A2A2 con una eficiencia del 99% de agrupamiento.

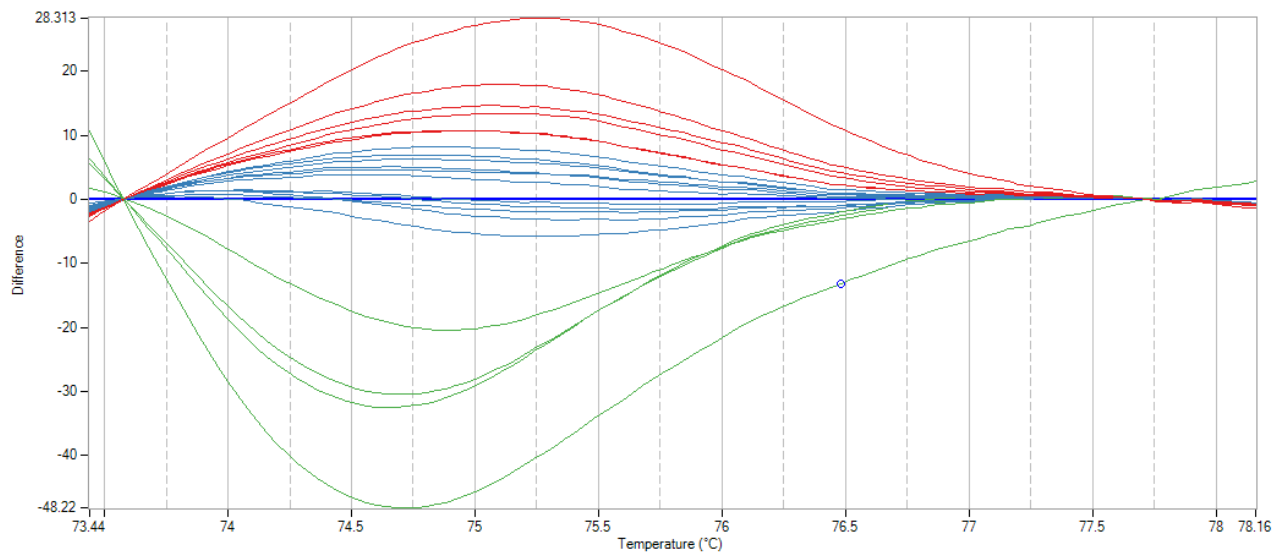
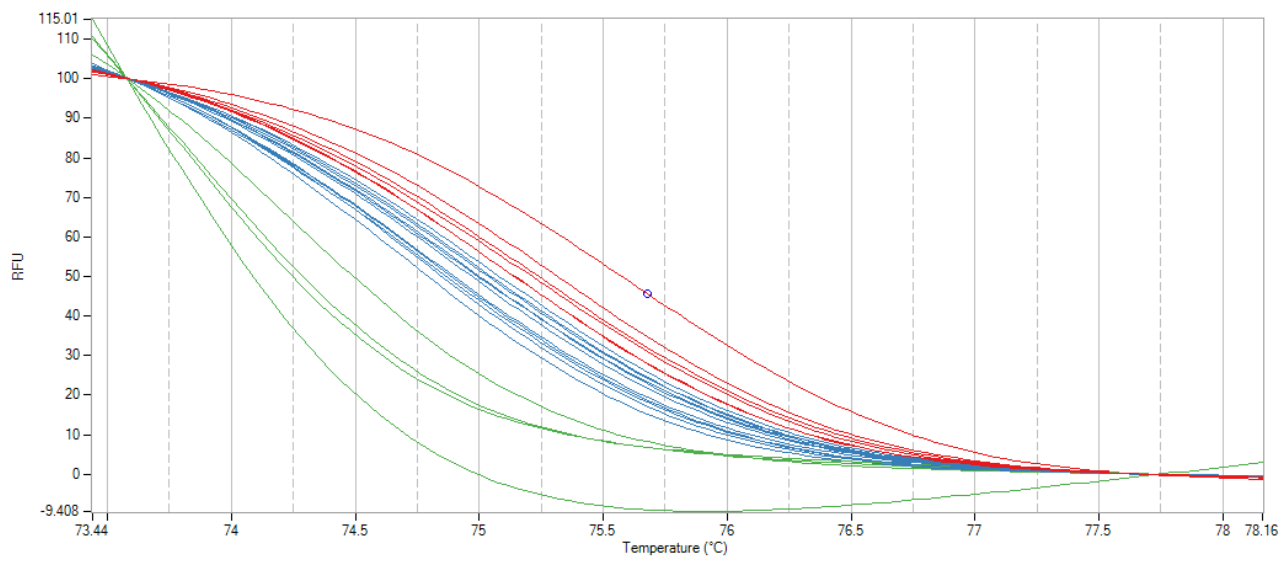












## 12 REFERENCIAS

- Andrade, L. H., Francisco, L., & Mayorga, J. (2009). *Producción de leche de bovino en el sistema de doble propósito*.
- Aranguren-Méndez, J. a, Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*, 13(1), 30–42.
- Aschaffenburg, R. (1961). Inherited casein variants in cow's milk. *Nature*, 192, 431–432.
- Bedoya, G., Carvajal, L. G., Moreno, F. L., Davies, S., Derr, J., Ossa, J. E., & Kingdom, U. (2001). Estructura molecular y poblacional del ganado criollo Colombiano (GCC), 14(24), 109–120.
- Bobe, G., Beitz, D. C., Freeman, A. E., & Lindberg, G. L. (1999). Effect of Milk Protein Genotypes on Milk Protein Composition and Its Genetic Parameter Estimates. *Journal of Dairy Science*, 82(12), 2797–2804. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75537-2](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75537-2)
- Bos indicus (ID 3418) - Genome - NCBI*. (2009). *Ncbi.nlm.nih.gov*. Accesado el 9 Agosto 2016, en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=bos+indicus>
- Bos taurus (ID 82) - Genome - NCBI*. (2006). *Ncbi.nlm.nih.gov*. Accesado el 8 Agosto 2016, en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=bos+taurus>
- Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A., & Lottspeich, F. (1979). Novel opioid peptides derived from casein ( $\beta$ -casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*, 360(9), 1211–1216. <http://doi.org/10.1515/bchm2.1979.360.2.1211>
- Cabrero, J., & Camacho, J. (2002). Fundamentos de genética de poblaciones. In M. Soler (Ed.), *EVOLUCIÓN, La base de la Biología* (pp. 83–126). Granada: Proyecto Sur de Ediciones, S.L.
- Çardak, a. D. (2005). Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition of milk from Holstein-Friesian and Simmentaler cows. *South African Journal of Animal Sciences*, 35(1), 41–47. <http://doi.org/10.4314/sajas.v35i1.4047>
- Caroli, A. M., Chessa, S., & Erhardt, G. J. (2009). Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5335–52. <http://doi.org/10.3168/jds.2009-2461>
- Cervantes, P., Luna, M., Hernández, A., Ponce, P., & Uffo, O. (2007). Polimorfismo genético en el locus de la Kappa-Caseína, en vacas de diferentes razas y cruces en el tropico mexicano. *Revista Salud Animal*, 29(2), 78–84.

- Cieslinska, A., Kaminski, S., Kostyra, E., & Sienkiewicz-Szlapka, E. (2007). Beta-casomorphin 7 in raw and hydrolyzed milk derived from cows of alternative  $\beta$ -casein genotypes. *Milchwissenschaft*, *62*(2), 125–127.
- Cieślińska, A., Kostyra, E., Kostyra, H., Oleński, K., Fiedorowicz, E., & Kamiński, S. (2012). Milk from cows of different  $\beta$ -casein genotypes as a source of  $\beta$ -casomorphin-7. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *63*(4), 426–430. <http://doi.org/10.3109/09637486.2011.634785>
- Cortés López, N. G., del Moral, S., Abad Zavaleta, J., Rueda, J. A., Luna Palomera, C., & Meza Herrera, C. A. (2012). Allelic and genotypic frequency of Kappa casein gene in double purpose cattle. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *15*(1), 47–54.
- Dahl-Jorgensen, K., Joner, G., & Hanssen, K. F. (1991). Relationship Between Cows' Milk Consumption and Incidence of IDDM in Childhood. *Diabetes Care*, *14*(11), 1081–1083. <http://doi.org/10.2337/diacare.14.11.1081>
- Duifhuis-Rivera, T., Lemus-Flores, C., Ayala-Valdovinos, M., Sánchez-Chiprés, D. R., Galindo-García, J., Mejía-Martínez, K., & González-Covarrubias, E. (2014). Polymorphisms in beta and kappa-casein are not associated with milk production in two highly technified populations of holstein cattle in Mexico. *Journal of Animal and Plant Sciences*, *24*(5), 1316–1321.
- Elliott, R. B., Harris, D. P., Hill, J. P., Bibby, N. J., & Wasmuth, H. E. (1999). Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: Casein variant consumption. *Diabetologia*, *42*(3), 292–296. <http://doi.org/10.1007/s001250051153>
- Fahmy, M. H. (1999). Aspects of Major Genes in Sheep Production. *The Shepherd*, (June 1999), 16–25.
- Falconer, D. S. S. (1960). *Introduction to Quantitative Genetics*. New York: Ronald Press Co. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Fiedorowicz, E., Kaczmarek, M., Cieślińska, A., Sienkiewicz-Szlapka, E., Jarmołowska, B., Chwała, B., & Kostyra, E. (2014).  $\beta$ -casomorphin-7 alters  $\mu$ -opioid receptor and dipeptidyl peptidase IV genes expression in children with atopic dermatitis. *Peptides*, *62*, 144–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.020>
- Formaggioni, P., A. Summer, M. Malacarne, & Mariani, P. (1999). Milk protein polymorphism: Detection and diffusion of the genetic variants in Bos genus. *Universita` Di Parma*, *19*, 127–165.
- Fuenmayor, J. V., Soto, L. O., & Urdaneta, F. (2009). Relationship Between Level of Technology and Productivity Indices of Dual-Purpose. *Revista Científica*, *XIX*(1), 84–92.
- Givens, I., Aikman, P., Gibson, T., & Brown, R. (2013). Proportions of A1, A2, B and

- C  $\beta$ -casein protein variants in retail milk in the UK. *Food Chemistry*, 139(1–4), 549–52. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.115>
- Gustavsson, F., Buitenhuis, A. J., Johansson, M., Bertelsen, H. P., Glantz, M., Poulsen, N. A., ... Andrén, A. (2014). Effects of breed and casein genetic variants on protein profile in milk from Swedish Red, Danish Holstein, and Danish Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3866–77. <http://doi.org/10.3168/jds.2013-7312>
- Han, S. K., Shin, Y. C., & Byun, H. D. (2000a). Biochemical, molecular and physiological characterization of a new beta-casein variant detected in Korean Cattle. *Animal Genetics*, 31(1), 49–51. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2000.00582.x>
- Han, S. K., Shin, Y. C., & Byun, H. D. (2000b). Biochemical, molecular and physiological characterization of a new beta-casein variant detected in Korean cattle. *Animal Genetics*, 31(1), 49–51.
- Hanusová, E., Huba, J., Oravciva, M., Polák, P., & Vrtkova, I. (2010). Genetic variants of beta-casein in Holstein dairy cattle in Slovakia. *Slovak J. Anim. Sci.*, 43(2), 63–66.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986–994. <http://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Jarmołowska, B., Bielikowicz, K., Iwan, M., Sidor, K., Kostyra, E., & Kaczmarek, M. (2007). Serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV; EC 3.4.14.5) in breast-fed infants with symptoms of allergy. *Peptides*, 28(3), 678–82. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.11.014>
- Jinsmaa, Y., & Yoshikawa, M. (1999). Enzymatic release of neocasomorphin and  $\beta$ -casomorphin from bovine  $\beta$ -casein. *Peptides*, 20(8), 957–962. [http://doi.org/10.1016/S0196-9781\(99\)00088-1](http://doi.org/10.1016/S0196-9781(99)00088-1)
- Kamiński, S., Cieslińska, A., & Kostyra, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics*, 48(3), 189–198. <http://doi.org/10.1007/BF03195213>
- Keating, A., Smith, T., Ross, R., & Cairns, M. (2008). A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to  $\beta$ -casomorphin. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 47, 99–104.
- Kost, N. V., Sokolov, O. Y., Kurasova, O. B., Dmitriev, A. D., Tarakanova, J. N., Gabaeva, M. V., ... Zozulya, A. A. (2009). Beta-casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. *Peptides*, 30(10), 1854–60. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.06.025>
- Kovanda, A., & Poljak, M. (2011). Real-time polymerase chain reaction assay based on high-resolution melting analysis for the determination of the rs12979860 polymorphism involved in hepatitis C treatment response. *Journal of Virological*

- Methods*, 175(1), 125–8. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.04.018>
- McLachlan, C. N. (2001). beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Medical Hypotheses*, 56(2), 262–72. <http://doi.org/10.1054/mehy.2000.1265>
- McLachlan, C., & Olsson, F. (2003). Setting the record straight: A1 beta-casein, heart disease and diabetes. *New Zealand Medical Journal*, 116(1170), U375.
- Miluchová, M., Gábor, M., & Trakovická, A. (2013). Analysis of Slovak Spotted breed for bovine beta casein A1 variant as risk factor for human health. *Acta Biochimica Polonica*, 60(4), 799–801.
- Miluchová, M., Trakovická, A., & Gábor, M. (2009). Analysis of Polymorphism of Beta Casein of Slovak Pinzgau Cattle By Pcr-Rflp for Allels a1 and a2, 42(2), 288–292.
- Muehlenkamp, M. R., & Warthesen, J. J. (1996). Beta-casomorphins: analysis in cheese and susceptibility to proteolytic enzymes from *Lactococcus lactis* ssp. cremoris. *Journal of Dairy Science*, 79(1), 20–6. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76329-4](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76329-4)
- Olenski, K., Kamiński, S., Szyda, J., & Cieslinska, A. (2010). Polymorphism of the beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein-Friesian bulls. *Livestock Science*, 131(1), 137–140. <http://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.02.023>
- Orantes-zebadúa, Á., Platas-rosado, D., Córdova-avalos, V., Los, M. C. De, & Córdova-avalos, A. (2014). Caracterización de la ganadería de doble proposito en una region de Chiapas, México. *Ecosistemas Y Recursos Agropecuarios*, 1(1), 49–57.
- Ortega, L., & Ward, R. (2005). *El Sistema de Ganadería de Doble Propósito: Un sistema eficiente. Facultad de agronomía*. Maracaibo-Venezuela.
- Pihlanto-Leppälä, A., Antila, P., Mäntsälä, P., & Hellman, J. (1994). Opioid peptides produced by in-vitro proteolysis of bovine caseins. *International Dairy Journal*, 4(4), 291–301. [http://doi.org/10.1016/0958-6946\(94\)90028-0](http://doi.org/10.1016/0958-6946(94)90028-0)
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., ... Markham, A. F. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*, 3, 18. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>
- Pons Fita, A. (2015). *Determinación de la frecuencia del alelo A2 de la beta-caseína (CSN2) en pajillas de toros lecheros de la raza Holstein*. Universidad de Girona.
- Raynes, J. K., Day, L., Augustin, M. A., & Carver, J. A. (2015). Structural differences between bovine A(1) and A(2)  $\beta$ -casein alter micelle self-assembly and

- influence molecular chaperone activity. *Journal of Dairy Science*, 98(4), 2172–82. <http://doi.org/10.3168/jds.2014-8800>
- Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6), 597–608. <http://doi.org/10.2217/14622416.8.6.597>
- Ribadeau Dumas, B., Ghislaine, B., Grosclaude, F., & Mercier, J.-C. (1972). Structure primaire de la caséine B bovine. Sequence complete. *European Journal Biochemistry*, 25, 505–514.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, 245(2), 154–160. <http://doi.org/10.1006/abio.1996.9916>
- Rojo-Rubio, R., Vázquez-Armijo, J. F., Pérez-Hernández, P., Mendoza-Martínez, G. D., Salem, A. Z. M., Albarrán-Portillo, B., ... Gutierrez-Cedillo, J. G. (2009). Dual purpose cattle production in Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 41(5), 715–721. <http://doi.org/10.1007/s11250-008-9249-8>
- Rüthrich, H.-L., Grecksch, G., & Matthies, H. (1993). Influence of  $\beta$ -casomorphins on apomorphine-induced hyperlocomotion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44(1), 227–231. [http://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90302-A](http://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90302-A)
- Santos Flores, J., Pech Martínez, V., & Montes Pérez, R. (2002). Production function of dual purpose cattle in the eastern zone of the state of Yucatan , Mexico. *Técnoología Pecuaria México*, 40(2), 187–192.
- Sokolov, O., Kost, N., Andreeva, O., Korneeva, E., Meshavkin, V., Tarakanova, Y., ... Zozulya, A. (2014). Autistic children display elevated urine levels of bovine casomorphin-7 immunoreactivity. *Peptides*, 56, 68–71. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.03.007>
- Sun, Z., Zhang, Z., Wang, X., Cade, R., Elmir, Z., & Fregly, M. (2003). Relation of  $\beta$ -casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides*, 24(6), 937–943. [http://doi.org/10.1016/S0196-9781\(03\)00156-6](http://doi.org/10.1016/S0196-9781(03)00156-6)
- The International Dairy Federation,. (2014). *The World Dairy Situation 2014* (pp. 4-11). Brussels: Adriaan Krijger.
- Thermo Scientific. (2013). *Thermo Scientific PikoReal Software 2. 1 (2.2). Users Manual*.
- Thompson, A., Boland, M., & Sigh, H. (2009). *Milk Proteins: From expression to food*. (A. Thompson, M. Boland, & H. Sigh, Eds.) (Food Scien). New Zeland: Elsevier.
- Thorsdottir, I., Birgisdottir, B. E., Johannsdottir, I. M., Harris, D. P., Hill, J., Steingrimsdottir, L., & Thorsson, A. V. (2000). Explain Low Incidence of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Iceland. *Pediatrics*, 106(4), 719–724.

- Ul Haq, M. R., Kapila, R., & Kapila, S. (2015). Release of  $\beta$ -casomorphin-7/5 during simulated gastrointestinal digestion of milk  $\beta$ -casein variants from Indian crossbred cattle (Karan Fries). *Food Chemistry*, 168, 70–9. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.024>
- Vinueza, C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *Redvet*, 10(2), 1–13.
- Vossen, R. H. A. M., Aten, E., Roos, A., & Den Dunnen, J. T. (2009). High-resolution melting analysis (HRMA) - More than just sequence variant screening. *Human Mutation*, 30(6), 860–866. <http://doi.org/10.1002/humu.21019>
- Wada, Y., & Lönnerdal, B. (2014). Bioactive peptides derived from human milk proteins--mechanisms of action. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(5), 503–14. <http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.012>
- Wei, E. T., Lee, A., & Chang, J. K. (1980). Cardiovascular effects of peptides related to the enkephalins and  $\beta$ -casomorphin. *Life Sciences*, 26(18), 1517–1522. [http://doi.org/10.1016/0024-3205\(80\)90275-1](http://doi.org/10.1016/0024-3205(80)90275-1)
- Wittwer, C. T. (2009). High-resolution DNA melting analysis: Advancements and limitations. *Human Mutation*, 30(6), 857–859. <http://doi.org/10.1002/humu.20951>
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 32(12). <http://doi.org/10.1093/nar/gnh101>