

Treball Final de Màster

Realitzat i defensat en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara (nom universitat) de Mèxic (país)

Màster: BIOTECNOLOGIA ALIMENTÀRIA

Títol: DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DEL ALELO A2 DE LA BETA-CASEÍNA (CSN2) EN PAJILLAS DE TOROS LECHEROS DE LA RAZA HOLSTEIN

Document: Treball Final de Màster

Alumne: Alèssia Pons Fita

Director/Tutor: Dr. Dolors Parés

Departament: Eng. Química, Agrària i Tecn. Agroalimentària

Convocatòria (mes/any): Setembre de 2015

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

TESIS FINAL DE MÁSTER

DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DEL ALELO A2 DE LA BETA-CASEÍNA
(CSN2) EN PAJILLAS DE TOROS LECHEROS DE LA RAZA HOLSTEIN

ALÈSSIA PONS FITA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MIGUEL ÁNGEL AYALA VALDOVINOS

ASESOR:

M.C. THEODOR DUIFHUIS RIVERA

Tesis de iniciación a la investigación realizada en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, requisito para la obtención del Máster en Biotecnología Alimentaria de la Universidad de Girona (UdG).



Jalisco, Guadalajara; Septiembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sus aportaciones y consejos, apasionados de la docencia, me enseñaron de una forma muy humana, cercana y motivadora. Gracias por regalarme su valioso tiempo, Mtro. Theodoro Duifhuis y Dr. Miguel Ángel Ayala.

Al Dr. David Román Sánchez, por recibirme, darme la oportunidad de integrarme a un equipo investigador y ofrecerme todo su apoyo.

A la Dra. M^a Dolors Parés, por su esfuerzo, paciencia e implicación en el desarrollo de la Tesis.

A mi pareja, por involucrarse en mis ideas, desenredarme de mis frustraciones y darme la mano para alcanzar mis aspiraciones.

Sobre todo a mi papá, por apoyarme en esta aventura y confiar siempre en mí.

“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo, involúcrame y lo aprendo”. Benjamín Franklin (1706-1790) Estadístico y científico estadounidense

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Perspectiva de la producción y el consumo de leche en diferentes países	2
1.2. La variante A1 de la beta-caseína	2
1.3. Problemática asociada al péptido del alelo A1	3
1.4. La BCM7 en productos lácteos	6
1.5. Péptidos bioactivos extraídos de la leche	7
1.6. Evolución del pago de los componentes de la leche	11
1.7. Rendimiento lechero de la raza Holstein	12
1.8. Técnicas moleculares para el estudio de genes relacionados con el rendimiento lechero	14
1.8.1. Características, ventajas e inconvenientes de las técnicas moléculas	15
1.9. La importancia del genotipo de las proteínas lácteas para el mejoramiento genético del ganado lechero	18
1.10. Efectos de los polimorfismos de CSN2 y otras caseínas sobre rasgos económicamente importantes	20
2. OBJETIVO	23
2.1. Objetivos específicos	23
2.2. Justificación del Proyecto	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Obtención de ADN y Genotipificación	24
3.2. Cálculo de frecuencias genotípicas y génicas	26
3.3. Análisis de frecuencias y Equilibrio de Hardy-Weinberg	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5. CONCLUSIONES	34
6. BIBLIOGRAFIA	35

RESUMEN

El presente estudio identificó por la técnica de PCR-RFLP las variantes A1 y A2 en los genotipos de la beta-caseína (CSN2) y determinó sus frecuencias. Se analizaron 60 pajillas de semen de toros lecheros Holstein, procedentes de dos empresas transnacionales (grupo A, n=39 y B, n=7) y de explotaciones nacionales (grupo C, n=14), para la inseminación artificial de ganado lechero mexicano. Las frecuencias alélicas generales que se obtuvieron fueron 0.63 y 0.37 para el alelo A2 y A1, respectivamente. El genotipo predominante en el grupo A y B fue A1A2, con valores de frecuencia de 0.51 y 0.57, y en cambio en el grupo C fue el A2A2 con una frecuencia de 0.50. Sin embargo, no se encontró diferencia en la distribución de las frecuencias entre grupos y los genotipos se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. No se ha evidenciado una estrategia para la selección de una determinada variante del gen CSN2 en sistemas de producción de ganado vacuno lechero.

Palabras clave: PCR-RFLP, toros Holstein, beta-caseína, semen congelado, polimorfismos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Perspectiva de la producción y el consumo de leche en diferentes países

La leche y otros productos lácteos, procedentes de vacas lecheras, proporcionan una alta calidad de proteínas, grasas y micronutrientes esenciales como el calcio, el magnesio y el fósforo en una amplia población humana. Los países que producen más cantidad de leche (toneladas/año) son principalmente Estados Unidos, seguido de India y China. Con valores intermedios aparecen Brasil, Rusia y Alemania (FAO 2011-12). En cambio, los países más consumidores de leche (litros por cápita) son Finlandia, luego Australia, Reino Unido e Islandia. Con valores de consumo relativamente más bajos hay Nueva Zelanda, Noruega y Suecia. Posteriormente, aparece un amplio abanico de países con cantidades muy similares, como Dinamarca, España, Canadá, Austria y Estados Unidos (International Dairy Federation and Statistics Canada 2011-13). Es interesante observar que países asiáticos como China y la India son grandes productores de leche de vaca pero su consumo es considerablemente bajo. Básicamente toda la leche que se produce se exporta en países principalmente del norte y del este de Europa, donde el consumo de leche excede significativamente su producción nacional. El abastamiento de leche, en estos u otros países con poco carácter productivo, también es suplido por los Estados Unidos.

1.2. La variante A1 de la beta-caseína

La leche de vaca contiene principalmente seis proteínas: cuatro caseínas (α -s₁, α -s₂, β - y κ -) y dos proteínas o lactoglobulinas (α - y β -) del suero. Las caseínas de la leche representan un 80% de proteínas en la leche de vaca. La beta-caseína (β -CN) representa un 30% del total de proteína en la leche (Fox & McSweeney, 2003; Kamiński, *et al.*, 2007; Gálik *et al.*, 2011).

Durante décadas, se tiene conocimiento que buena parte de las proteínas de la leche presentan diferentes variantes génicas o polimorfismos. Las variantes génicas A1 y A2 del gen de la beta-caseína (CSN2) son las más comunes. El alelo A2 representa el gen original, que codifica por la β -CN y se encuentra presente en leche de muchos mamíferos como: humanos, ovinos, caprinos y bovinos (*Bos taurus*) (Lonnerdal *et al.*, 1990; Ng-Kwa-Hang & Grosclaude, 2002; GenBank: X55739.1 *Homo sapiens*, X79703.1 *Ovis aries*, AJ011019.3 *Capra aegagrus hircus*). El alelo A1 es una mutación exclusiva en poblaciones de bovinos europeos (*Bos taurus*) (GenBank: X14711) (Ng-Kwa-Hang & Grosclaude, 2002).

La diferencia entre los alelos A1 y A2 de la β -CN se basa en un cambio de nucleótido, que causa un cambio de aminoácido. El codón original CCT que forma el aminoácido prolina, en la variante A2, se modifica a CAT y forma la histidina, en la variante A1, en la posición 67 de la cadena polipeptídica de la β -CN (Bâlteanu *et al.*, 2010; Oleński *et al.*, 2012). La diferencia estructural entre las dos variantes de la β -CN (A1 y A2) conduce a distintas propiedades que se ven reflejadas en el proceso de digestión. La variante A1 de la β -CN es más fácilmente hidrolizable, debido a la débil unión entre histidina e isoleucina, por las enzimas gastrointestinales, dando como resultado la liberación de un péptido llamado beta-casomorfina-7 (BCM7) (Jinsmaa & Yoshikawa, 1999; De Noni, 2008).

1.3. Problemática asociada al péptido del alelo A1

A la BCM7, este péptido de siete aminoácidos liberado por la mutación A1, se le atribuye propiedades opiodes que lo vinculan a una mayor probabilidad de padecer enfermedades crónicas como diabetes tipo 1, problemas cardiovasculares, desórdenes en el sistema digestivo (Elliot *et al.*, 1999; McLachlan, 2001; Beales *et al.*, 2002; Laugesen & Elliott, 2003; Kaminski *et al.*, 2007; Cieślińska *et al.*, 2012) y con trastornos de la conducta, como autismo infantil (Sun *et al.*, 2003; Whiteley *et al.*, 2010) y esquizofrenia (Severance *et al.*, 2010).

Las beta-casomorfina (BCMs) son sustancias opioides exógenas, como la morfina y otras drogas, que tienen la capacidad de atravesar el sistema digestivo, pasar por el torrente sanguíneo y si llegan al cerebro, afectar el funcionamiento normal de las células nerviosas (Fiat *et al.*, 1993; Kamiński *et al.*, 2006a). Las BCM7 se pueden unir o acoplarse a receptores mu (μ)-opioides que se encuentran principalmente en la superficie de células nerviosas y las del músculo liso del intestino. El problema es que se unen en el mismo sitio receptor de los péptidos endógenos (como las endorfinas), generando el mismo efecto de retardo en el tránsito intestinal, de inhibición del dolor y del estrés, adormecimiento y lentitud (Jarmolowska *et al.*, 2007; Wang & Teichtahl, 2007; Barnett *et al.*, 2014).

Bebés y personas con intestinos permeables y que tienen una baja actividad de la enzima dipeptidil peptinasa IV (DDP4) son los más susceptibles a la llegada de BCM7 al cerebro (Cade *et al.*, 2000).

Desde el año 2000, en los supermercados de Australia y Nueva Zelanda, se puede comprar leche exclusivamente A2, como un producto *Premium* o de alta calidad, fabricada por la empresa neozelandesa A2 Milk Company. En el año 2006, la empresa ya comercializó su leche A2 en Asia y en el mercado de Estados Unidos (Kamiński *et al.*, 2006a).

A pesar de la profunda literatura científica que existe en relación a los efectos negativos de la variante A1 de la β -CN, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria o EFSA (por sus siglas en inglés: European Food Safety Authority) en 2009, argumentó que no habían evidencias sólidas que pudieran vincular el consumo de leche A1 con un mayor riesgo en contraer dichas enfermedades.

En realidad, actualmente aún existe una gran incertidumbre y controversia acerca de los beneficios y perjuicios entre estas dos variantes génicas de la β -CN.

Estudios recientes con animales muestran que, roedores alimentados con leche que contenía la variante A1 de la β -CN incrementaba los niveles de colesterol en suero (Tailford Ka *et al.*, 2003) además de un retardo e inflamación considerable en el tracto intestinal (Trompette *et al.*, 2003; Haq *et al.*, 2013; Barnett *et al.*, 2014; Haq *et al.*, 2014). Barnett y colaboradores (2014) confirmaron que el tratamiento con naloxona, administrada en un grupo de ratas macho Wistar que se alimentaban de leche A1, mejoraba su función gastrointestinal. Este fármaco permitió revertir los efectos opiodes de las BCMs, bloqueando la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), enzima que se encuentra en el colón y se usa como marcador inflamatorio, sin afectar la actividad DPP4.

En contraparte, Kamiński y sus colaboradores (2012) reportaron que el suplemento de leche A1 o A2 en cerdas jóvenes hermanas no provocaba cambios significativos en su perfil lipídico ni tampoco trastornos gastrointestinal. Sin embargo, el no posible efecto de la variante A1 se atribuyó a la gran cantidad de enzimas DPP4 activas.

En dos estudios piloto realizados en humanos encontraron en el grupo de individuos que consumían leche A1 valores altos de calprotectina en sus heces, un marcador inflamatorio intestinal, que se correlacionaba además con medidas subjetivas de incomodidad digestiva. Los pacientes que tomaban leche A2 reportaron menos problemas digestivos y heces más firmes (Boutrou *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2014).

Asimismo, en infantes lactantes alimentados con fórmulas a base de leche no caracterizada se detectó BCM7 en su sangre. Estos resultados son esperables, dada la permeabilidad de su sistema digestivo. Sin embargo, se ha demostrado que algunos infantes sí consiguen eliminar el péptido, a causa de una mayor actividad de la enzima DPP4. No obstante, cabe resaltar, que otros infantes retienen la BCM7 en el torrente sanguíneo, ocasionando un retraso en su desarrollo psicomotriz (Kost *et al.*, 2009; Wasilewska *et al.*, 2011).

En resumen, aún no se ha establecido una validación auténtica, fomentaba con muchos más estudios, de los efectos *in vivo* del consumo de la leche A1.

Se aconseja de más investigación sobre todo en aquellos grupos de riesgo, infantes y personas con intestinos permeables y con conocida intolerancia al alelo A1 (Barnett *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2014; Ho *et al.*, 2014).

1.4. La BCM7 en productos lácteos

La estabilidad de la BCM7 se ve alternada en la elaboración de productos lácteos (Kamau *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2014). La formación, transformación o degradación de la BCM7 o péptidos relacionados, en distintas variedades de quesos y yogures, puede verse influenciada por el tratamiento térmico y/o la actividad proteolítica de las enzimas de los cultivos iniciadores (Meltretter *et al.*, 2008; Sienkiewicz-Szlapka *et al.*, 2009; Poliwoda & Wieczorek, 2009; De Noni & Cattaneo, 2010). Se ha identificado y cuantificado BCM7 en algunos quesos pero no en yogures comerciales (Schieber & Brückner, 2000; Sienkiewicz-Szlapka *et al.*, 2009; De Noni & Cattaneo, 2010).

En realidad, la presencia de BCM7 en el queso no se origina a partir de la leche cruda porque los péptidos derivados de la leche se eliminan de la cuajada durante el drenaje del suero de la leche (Jarmolowska *et al.*, 1999, Nguyen *et al.*, 2014). Las responsables de digerir parcialmente las caseínas y en consecuencia, favorecer o no la formación de BCM7 son las enzimas que derivan de los cultivos iniciadores seleccionados, ya sean hongos (moho) y/o bacterias del ácido láctico (BAL).

En la práctica, se obtuvieron mayores niveles de BCM7 en queso Brie, queso de pasta blanda, y Rokpol, queso azul o roquefort, que en quesos semi curados (Gouda, Edamski, Kasztelan). La

supuesta razón se debe a la elección de los cultivos, determinadas BAL y mohos (hongos), para la elaboración de la variedad Brie y Rokpol (Sienkiewicz-Szypka *et al.*, 2009; De Noni & Cattaneo, 2010).

Por otro lado, se pueden formar nuevos péptidos, no presentes en la leche cruda, por simple calentamiento (120°C durante 30 min). En el transcurso del tratamiento térmico, las enzimas se inactivan y el pH de la leche se mantiene. Por lo tanto, la formación de péptidos por enzimas intrínsecas o de BAL se puede descartar. De modo que, los nuevos péptidos se forman a razón de la reacción de Maillard, reacción que se produce entre azúcares reductores (lactosa) con aminoácidos. Se desencadena la liberación de radicales que pueden atacar y separar los enlaces peptídicos en la proteína y generar nuevos péptidos (Gaucheron *et al.*, 1999, Gaucher *et al.*, 2008; Meltretter *et al.*, 2008).

También en este punto, se requiere de más investigación para estudiar los precursores y factores que intervienen en el comportamiento de las BCMs en productos lácteos fermentados (Nguyen *et al.*, 2014).

1.5. Péptidos bioactivos extraídos de la leche

La leche también contiene componentes nutritivos y funcionales, son los péptidos bioactivos, moléculas con una secuencia de aminoácidos, unidos entre sí por enlaces peptídicos. Dentro de las proteínas lácteas (caseínas, proteínas séricas, lactoferrina, lactoglobulina, entre otras) se encuentran estos péptidos de forma inactiva (Clare & Swaisgood, 2000). Gracias a la acción hidrolítica de las proteasas, por ejemplo, durante la digestión gastrointestinal de alimentos o en el transcurso de su procesamiento (fermentación), pueden liberarse para desempeñar diversas funciones bioactivas. Intervienen en muchos procesos biológicos: funcionamiento gastrointestinal, hormonal, neurológico y nutricional. El aprovechamiento de sus funciones se

aplica de muchas maneras: en dietas como suplementos alimenticios, como fármacos y propiamente presentes en los productos lácteos fermentados (Hartmann & Meisel, 2007).

En la actualidad, en el mercado existe una amplia gama de péptidos bioactivos a razón de sus múltiples capacidades funcionales: prevención de infecciones, tratamiento de enfermedades cardíacas, diabetes, trombosis, hipertensión, etc. (Meisel, 1997; Clare & Swaisgood, 2000).

Para la liberación y producción de estos péptidos, originarios de proteínas lácteas, se puede hacer *in vitro* o *in vivo* por medio de la hidrólisis enzimática, es decir, enzimas digestivas o bien, durante la fermentación de la leche, suero de leche y caseínas, por el sistema proteolítico de microorganismos (cultivos iniciadores), especialmente bacterias del ácido lácteo (BAL) (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005; Korhonen & Pihlanto, 2006).

De hecho, han demostrado en numerosos trabajos científicos que el consumo de leche fermentada y quesos genera efectos ventajosos para la salud, que van más allá del valor nutricional, atribuidos a los numerosos péptidos contenidos y liberados en el procesado de la leche. Se confirmó una reducción del colesterol y de la hipertensión (Parra *et al.*, 2004; Rachid *et al.*, 2006; Foltz *et al.*, 2007).

Existen varios péptidos bioactivos liberados de caseínas por medio de distintas enzimas especializadas: quimosina (renina), tripsina o péptido sintético y por otro lado, a través de proteasas bacterianas (Korhonen & Pihlanto, 2006). En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos indicando su función fisiológica.

Tabla 1: Péptidos biológicamente activos extraídos de las caseínas de la leche.

Péptido	Proteína portadora	Proteasa liberadora	Actividad	Autores
Caseidina	α_{s1} - CN y K- CN	Quimosina	Antimicrobiana	Lahov & Regelson 1996
Casocidina-I	α_{s2} - CN	Péptido sintético	Antimicrobiana	Somkuti & Paul 2010
Isracidina	α_{s1} - CN	Quimosina	Antimicrobiana y antifúngica	Lahov & Regelson, 1996
β- Casokinina-7	β -CN	Tripsina	Inhibidor de ACE	Gobbetti <i>et al.</i> , 2004
β- Casokinina-10	β -CN	Péptido sintético	Inhibidor de ACE y inmunomodulador	Meisel, 1998
VPIPP	β -CN y K- CN	Procedente de <i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Sacharomyces cerevisiae</i> . ¹	Inhibidor de ACE	FitzGerald <i>et al.</i> , 2004
KVLPVLQ	β -CN	Procedente de <i>Lactobacillus helveticus</i> CP90	Inhibidor ACE	Maeno <i>et al.</i> , 1996
Varios fragmentos	β -CN y K- CN	Procedente de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> SS1, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> FT4	Inhibidor ACE	Hernández-Ledesma <i>et al.</i> , 2005
ARHPHPLSFM	K- CN	Procedente de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> IFO13953	Antioxidante	Pihlanto, 2006
SKVYP	β -CN	Procedente de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Inhibidor ACE	Korhonen & Pihlanto, 2006

¹ Con menos uso el *Streptococcus thermophilus* + *L. lactis* subsp. *Lactis* biovar. *diacetylactis*

La caseidina, péptido derivado de α_{s1} -CN y K-CN, ha demostrado tener actividad en contra varios microorganismos patógenos: *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (Lahov & Regelson, 1996; Clare y Swaisgood, 2000). La Casocidina I sólo protege de la bacteria *Staphylococcus carnosus* y *E. Coli* (Zucht *et al.*, 1995; Somkuti & Paul, 2010) Se comprobó que el péptido isracidina, con capacidad antimicrobiana y antifúngica, también salvaguarda las vacas y ovejas contra mastitis cuando se inyecta en la ubre a niveles comparables con los usados con antibióticos convencionales (Lahov & Regelson, 1996).

Los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) permiten tratar la insuficiencia cardíaca (Ong & Shah, 2008; Pihlanto, Virtanen & Korhonen, 2010). Estos relajan los vasos sanguíneos y disminuyen la presión arterial, mejorando el flujo de sangre. En leche fermentada o en quesos, se generan muchos péptidos inhibidores de ACE gracias a la gran actividad proteolítica de cultivos iniciadores como *Lactobacillus helveticus* y *Sacharomyces cerevisiae*. También se han empleado algunas variedades de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* para producir leches fermentadas que presenten péptidos inhibidores de ACE (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005).

Se han descubierto péptidos inhibidores incluso en las proteínas del suero, β -lactoglobulina α -lactoalbúmina (Mullally *et al.*, 1996; Mullally *et al.*, 1997).

La β -Casokinina-10, derivado de la hidrólisis de la β -CN, tiene una función inmunomoduladora. En otras palabras, se encarga de disminuir la proliferación de células cancerosas (Clare & Swaisgood, 2000).

Otra función, de menor importancia pero muy novedosa es la aplicación de los péptidos combinados con fosfato de calcio (caseinofosfopéptidos o CCPs). Estos, una vez liberados por proteólisis, a causa de la presencia de múltiples residuos de fosfatos los convierten en buenos agentes quelantes del calcio. Al ser unos péptidos que absorben el calcio se utilizan como

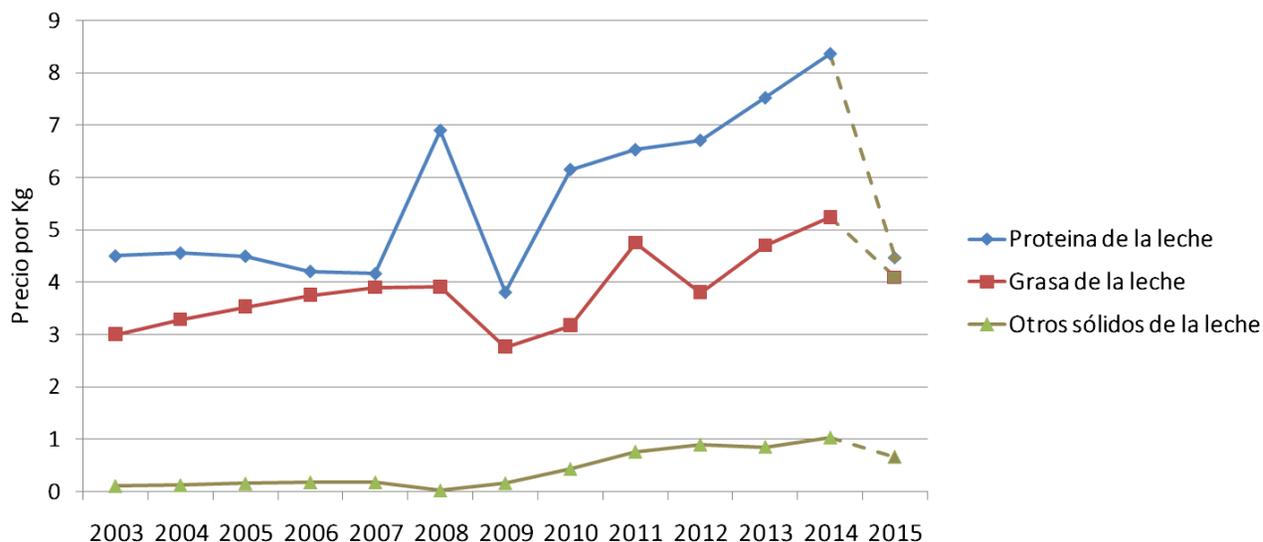
ingredientes de enjuagues bucales, pasta de dientes (Prospec MI Paste™, GC Tooth Mouse™) o gomas de mascar (Recaldent™, Trident™) para la remineralización del esmalte (Ruiz *et al.*, 2013).

1.6. Evolución del pago de los componentes de la leche

En la actualidad, el gran productor de leche en el mundo es Estados Unidos. En los últimos doce años, el pago a los productores lecheros por la cantidad de los tres componentes principales de la leche: proteína (3%), grasa (3,5%) y otros sólidos (5,7%), ha presentado muchas variaciones según los informes recogidos por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos o USDA (por sus siglas en inglés: United States Department of Agriculture) (Figura 1).

Al principio del periodo, entre 2003-2007, la proteína de la leche y la grasa de la leche tenían valores muy similares, comprendidos entre 3,00 – 4,5 \$ (USD o dólar americano) por Kg. Los otros sólidos de la leche no tenían ningún valor. Actualmente, la proteína de la leche tiene un valor dos veces superior a la grasa de la leche, alrededor de 8,4 \$ por Kg en el año 2014. También la grasa de la leche ha aumentado su valor pero de forma más paulatina. Además, a partir del año 2010, se ha dado un poco más de valor a los otros sólidos, alcanzando hasta 1 \$ por Kg.

Figura 1: Tendencia de la evolución de los precios de los componentes principales de la leche desde el 2003-2015 (Datos de USDA, Federal Milk Order).



Esta tendencia al alza de los principales componentes se atribuye a la demanda de quesos. Existe un gran consumo de quesos en Estados Unidos y más recientemente, las exportaciones de quesos también han incrementado su demanda.

Los datos de 2015 (Figura 1) son únicamente de enero a mayo. Se representan con una línea discontinua.

1.7. Rendimiento lechero de la raza Holstein

La raza Holstein predomina en la mayoría de los sistemas especializados en producción de leche. Es la más productiva de todas las razas lecheras. Este requisito se ha logrado mediante el proceso selectivo de varias generaciones, donde el objetivo de mejoramiento estaba dirigido a incrementar exclusivamente el volumen por lactancia.

Los grandes productores han podido incrementar la productividad de sus rebaños gracias a la masiva aplicación de la inseminación artificial, por medio de semen congelado de toros candidatos. De hecho, ya en el año 1950 Rendel y Roberson demostraron que la mayor parte del mejoramiento genético, concretamente un 76%, proviene de la selección de sementales.

La necesidad histórica de aumentar la productividad por vaca ha contribuido con el detrimento de otros factores, como la calidad de la leche (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986, Aleandri *et al.*, 1999; Van Raden, 2004; Cecchinato *et al.*, 2011) la fertilidad y la longevidad (Knaus, 2009, Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009). Se han desarrollado algunas estrategias para contrarrestar la degeneración de estos rasgos:

En Nueva Zelanda, el cruzamiento en el ganado lechero Holstein cada vez es más utilizado ya que permite mejorar su desempeño como unidad zootécnica y su calidad de ente biológico (Camargo, 2012; Oltenacu & Broom, 2010). También en Estados Unidos está ganando popularidad los programas de cruzamiento de Holstein con otras razas como Jersey (Heins *et al.*, 2008), Montbeliard y Rojo sueco y noruego (Oltenacu & Broom, 2010). Cuando se cruzan parentales puros, producto de un riguroso programa de selección, se obtiene un hato mestizo que goza de mejor salud, fertilidad, longevidad y produce leche más rica en sólidos totales (proteína y grasa) (Van Raden & Sanders, 2003; Oltenacu & Broom, 2010).

Otras medidas más paliativas para corregir el descenso de la fertilidad, la longevidad y la composición de la leche, en las vacas Holstein de alto rendimiento, se basan en el acortamiento del intervalo entre partos: A través del suministro de suplementos alimenticios (Maas *et al.*, 2009) y mejoras de las instalaciones y de manejo, con el uso de equipos que faciliten la implementación de programas de salud preventiva, manifestación y detección del estro (Roelofs *et al.*, 2010). De esta forma, se favorece una rápida reactivación ovárica, con lo cual reduce el tiempo de desbalance metabólico (balance energético negativo, BEN) y su impacto sobre el desempeño productivo en la lactancia subsiguiente (Watters *et al.*, 2009, Grummer *et al.*, 2010).

1.8. Técnicas moleculares para el estudio de genes relacionados con el rendimiento lechero

Para conseguir una mejora genética del hato lechero no sólo son decisivos los procesos de selección, los entrecruzamientos y la inseminación artificial sino también la implicación de análisis moleculares para estudiar los efectos de aquellos genes de interés económico (los llamados QTL, del inglés: Quantitative Trait Locus).

Hoy en día, las técnicas moléculas convencionales más aplicadas son: la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada con el análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), la PCR acoplada con el análisis de polimorfismo de conformación de ADN de cadena única (SSCP) y la PCR con el análisis de polimorfismo por medio de un sistema refractario de amplificación de mutaciones (ARMS). Estas técnicas están limitadas debido que el análisis es exclusivo para la identificación de pocos genes.

Posteriormente, con los conocimientos alcanzados con las técnicas anteriormente mencionadas se sentaron las bases técnicas y tecnológicas para el desarrollo de una nueva técnica, los microarrays o microarreglos de DNA, diseñada por Michael Eisen y Patrick Brown (1999) que podía proporcionar la secuenciación del genoma completo (miles de genes) de un organismo (Busquets & Agustí, 2001; Ramírez *et al.*, 2003).

Gracias a los avances en el Proyecto Genoma Humano (1990-2003), se construyeron las bibliotecas genómicas, dónde se pueden diseñar y obtener los microarreglos (Womack *et al.*, 1997; Napoli *et al.*, 2003). Después de la secuenciación del Genoma Humano se facilitó la tarea de secuenciación del Genoma Bovino, que se completó en 2009 (Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium *et al.*, 2009).

Poco después en 2010, la empresa Illumina empezó a comercializar un chip de alta densidad (BovineHD) con capacidad de analizar más de 777,000 SNPs, pudiendo así identificar toda la variación genética de cualquier raza bovina (Illumina, 2010).

1.8.1. Características, ventajas e inconvenientes de las técnicas moléculas

La técnica PCR-SSCP se basa en el supuesto de que los cambios sutiles del ADN afectan a la migración de sus fragmentos. Así, cuando está presente un cambio de nucleótido o un polimorfismo de un sólo nucleótido o SNP (por sus siglas en inglés: Single Nucleotid Polimorfism) en el ADN, su conformación (estructura secundaria) y su movilidad electroforética en el gel es diferente comparada con la secuencia nativa. El empleo de esta técnica resulta ser más económico respecto la RFLP, sin embargo, presenta varias dificultades para la visualización de los genotipos resultantes:

La sensibilidad y la eficiencia de la SSCP puede verse reducida por el tamaño de los fragmentos: si las secuencias son demasiado pequeñas (< 100 pares de bases) son incapaces de formar estructuras secundarias y si son de gran tamaño (>400 pares de bases) la mutación puntual puede no detectarse a través del patrón electroforético. La sensibilidad óptima se obtiene en tamaños de 150-200 pares de bases (pb) (Sheffield *et al.*, 1993).

Otro parámetro es la temperatura en la que se da la electroforesis. Existen numerosos protocolos que evalúan la reproductibilidad del análisis SSCP a través de varias temperaturas en la cámara de electroforesis 20°C, 15°C, 10°C y 4°C (Riesner *et al.*, 1989; Bastos *et al.*, 2001). Sugieren que se requiere realizar un gradiente de temperatura para cada SSCP y en consecuencia, ajustar el gel a la mejor temperatura para el visualizado del genotipo.

Otras investigaciones intentan favorecer la sensibilidad de la técnica añadiendo ciertos aditivos. En particular, el glicerol incrementaba la resolución de las bandas en el gel. No obstante, los geles con glicerol retrasan el tiempo de la electroforesis. Además, el buffer TBE² puede ser incompatible con el glicerol y otros alcoholes. En tal caso, sugieren que se tendría que optar por otros buffer menos corrientes para realizar la electroforesis (Barroso *et al.*, 1999; Bastos *et al.*, 2001).

² Disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA, de uso frecuente en electroforesis con gel de agarosa para separar ácidos nucleicos.

Una última variable a tener en consideración es la proporción de acrilamida:bisacrilamida para la elaboración de los geles. Existen ensayos con ratios muy diversos de 19:1 hasta 100:1 (Barroso *et al.*, 1999). El más usual y recomendable está en una razón de acrilamida:bisacrilamida de 49:1 (Segev 1990; Ellison *et al.*, 1993; Taylor 1997) con porcentajes altos de 12-17% (Eggerding, 1994; Taylor 1997) pero que depende en función del tamaño de la secuencia.

Debido a todos estos puntos a revisar la SSCP requiere de mucho más tiempo, más de siete horas, a diferencia de RFLP. Además las bandas de SSCP, de los alelos específicos, sobre el gel de poliacrilamida necesitan ser confirmadas por secuenciación para puntualizar qué mutación es y dónde se encuentra. La ventaja que puede tener esta técnica sería para la detección de polimorfismos aún desconocidos.

Otra técnica tradicional, PCR-ARMS se basa en el uso de cebadores específicos para la secuencia normal y la secuencia mutada. De modo que se requieren de dos reacciones de PCR diferentes. Las dos reacciones comparten un cebador y el otro es el cebador específico para cada alelo. Por lo tanto, un cebador amplifica el alelo normal y el otro el mutado. De manera que en cada PCR se amplifica la variante presente y así se comprueba el determinado alelo. Se necesita un total de cuatro cebadores. Un par de ellos son cebadores control que amplifican otra región del gen problemático, cercano a la mutación, actuando así como control interno y evitar falsos negativos (Newton *et al.*, 1989; Medrano & de Oliveira, 2014).

También, para la determinación del genotipado, se utiliza la técnica RFLP. Nuevamente, el primer paso, es la amplificación del fragmento de ADN que contiene la variación o SNP. El fragmento amplificado se digiere con la enzima o endonucleasa de restricción apropiada, que corta en un lugar específico en una de las dos variantes para su diferenciación. Los diferentes fragmentos generados, de longitud conocida, se separan a través de electroforesis. Los resultados de la genotipificación se pueden visualizar directamente con un transiluminador UV, sin necesidad de usar un secuenciador.

En relación a las otras técnicas, PCR-SSCP y PCR-ARMS, no requiere tanto tiempo, ni tanta cantidad de muestra, tiene mayor facilidad operativa y mejor sensibilidad para la identificación de polimorfismos (Medina *et al.*, 2009; Solarte *et al.*, 2012).

En consideración al desarrollo de técnicas más modernas, los microarreglos son un chip donde, sobre una matriz inerte o plataforma, se depositan miles de cadenas sencillas de DNA, de modo que sobre ellas pueden hibridar las secuencias complementarias correspondientes a la muestra biológica a analizar. La hibridación se produce en las secuencias diana de los genes de estudio. De modo que la técnica permite analizar simultáneamente mucha cantidad de genes. Ciertamente, los chips modernos pueden contener alrededor de 80,000 genes por cm^2 , lo que hace posible que en un único chip se pueda estudiar casi todo el genoma de una especie, en plataformas de 1 a 2 cm^2 (Barrett & Kawasaki, 2003; Hornshøj *et al.*, 2007).

Chessa y colaboradores (2007) evaluaron diferentes técnicas moleculares para el estudio de polimorfismos de α_{s1} -CN, β -CN y κ -CN, debido a sus efectos conocidos sobre la composición de la leche y la producción de queso. Compararon una técnica de microarreglos de ADN basada en la reacción de detección de ligación o LDR (por las siglas en inglés: Ligase Detection Reaction) y un arreglo universal o AU (en inglés: Universal Array) con técnicas moleculares clásicas (PCR-RFLP y PCR-SSCP). Demostraron que ambas técnicas, modernas y clásicas, eran igual de válidas ya que encontraron los mismos genotipos. Sin embargo, la tecnología de los microarreglos o especialmente la técnica LDR-UA proporcionaba más precisión en el genotipado y hubo una variante de la κ -CN que no fue identificada por medio de las técnicas clásicas.

1.9. La importancia del genotipo de las proteínas lácteas para el mejoramiento genético del ganado lechero

Aunque existe esta tendencia en pagar más la concentración de proteína y grasa de la leche (Figura 1) no se ha hecho suficiente hincapié en el tipo de proteína que se encuentra en la leche, ya que no todas son iguales y no tienen las mismas funciones o características nutricionales. La presencia de variaciones o polimorfismos en los genes que codifican dichas principales proteínas de la leche influyen especialmente en la composición y producción lechera (Hallén *et al.*, 2008; Molee *et al.*, 2011; Poulsen *et al.*, 2013; Miluchová *et al.*, 2014).

Aunque existen muchos polimorfismos identificados en las proteínas lácteas (Caroli *et al.*, 2009), en la β -CN son principalmente la A1 y A2 (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1987; Alexander *et al.*, 1989; Kamiński *et al.*, 2007), seguidas por la variante B (Caroli *et al.*, 2009). En otras proteínas, como la κ -CN y la β -lactoglobulina (BLG) las variantes más frecuentes en la raza Holstein son la A y la B (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1987; Alexander *et al.*, 1989).

De modo que, estas variantes génicas o alelos codifican por caseínas y proteínas del suero, levemente diferenciadas por el cambio de algunos aminoácidos en su estructura primaria (Tabla 1).

Tabla 1: Variantes alélicas más comunes para β -, κ - CN y BLG dónde se indica el cambio en el ADN, la posición y el cambio de aminoácido producido en función de la variante.

Proteína	Variante genética	Substitución de nucleótido	Posición aminoácido	Cambio en la proteína	Autores
β - CN	A2 \rightarrow A1	C \rightarrow A	67	Pro \rightarrow His	Swaigood, 1992
κ - CN	A \rightarrow B	A \rightarrow C	148	Asp \rightarrow Ala	Lin <i>et al.</i> , 1992
BLG	A \rightarrow B	T \rightarrow C	118	Val \rightarrow Ala	Alexander <i>et al.</i> , 1989

A parte de su influencia en la producción y características de la leche, las variantes génicas de las caseínas y proteínas del suero también afectan a las propiedades de la leche para la fabricación de otros productos lácteos (Wedholm *et al.*, 2006; Poulsen *et al.*, 2013).

De modo que, el conocimiento del genotipo de las proteínas lácteas no sólo es efectivo en base a la producción o calidad de la leche sino también permite orientar a la industria lechera hacia mejores funcionalidades o usos derivados de la leche (Wedholm *et al.*, 2006; Poulsen *et al.*, 2013).

La extensa investigación ha demostrado que las variantes génicas (A1A1, A1A2 y A2A2) de la β -CN pueden usarse como marcadores para predecir el rendimiento y según su composición en proteínas, caseínas y contenido en grasas, derivar la leche para un determinado producto lácteo (diferentes quesos, cremas, yogures) (Hallén *et al.*, 2007; Bonfatti *et al.*, 2010b).

Actualmente, de forma general, las estrategias de producción en los programas de cría han sido orientadas hacia a un cambio en las frecuencias genotípicas, incrementando la selección por genotipos A2A2 de β -CN AA de κ -CN (Heck, 2009; Vallas *et al.*, 2012; Molee, A. *et al.*, 2011; Poulsen *et al.*, 2013; Gustavsson *et al.*, 2014).

Como ya se ha mencionado, por medio de la cría selectiva se puede modificar el genotipo de la descendencia a fin de incrementar la producción de leche, mejorar la cantidad de sólidos de la leche, etc. Sin embargo, existen otros rasgos de importancia económica como la fertilidad.

En las últimas décadas, se ha observado que en los sistemas de producción de leche que utilizan vacas seleccionadas, manejadas y alimentadas para mantener los niveles de producción de leche altos tienen un decaimiento en la fertilidad (Lucy, 2001; Evans *et al.*, 2002; Norman *et al.*, 2009). Esta correlación genética negativa entre los rasgos de producción de leche y la fertilidad en el ganado lechero Holstein está ampliamente aceptada (Veerkamp & Beerda, 2007; Khatib *et al.*, 2009).

1.10. Efecto de los polimorfismos de CSN2 y otras caseínas sobre rasgos económicamente importantes

Los efectos de las variantes génicas de las caseínas en la producción, composición y funcionalidad de la leche está muy documentada (Hallén *et al.*, 2008; Heck *et al.*, 2009; G. Bittante *et al.*, 2012; N.A. Poulsen *et al.*, 2013; Gustavsson *et al.*, 2014).

Algunos estudios no mostraron diferencias o dominancia entre las diferentes variantes génicas de la β -CN con mayor producción de leche (Cardak *et al.*, 2005; Manga *et al.*, 2006; Hanusová *et al.*, 2010; Molee *et al.*, 2011; Vallas *et al.*, 2012; Duifhuis-Rivera *et al.*, 2014). En cambio, otros estudios sí que estaban de acuerdo que la variante A2 se asociaba a un incremento en la producción de leche y proteína (Comin *et al.*, 2008; Oleński *et al.*, 2012; Miluchová *et al.*, 2014, Bugeac *et al.*, 2015) mientras que el alelo A1 o el genotipo A1A1 proporcionaba mayor porcentaje de grasa en la leche (Miluchová *et al.*, 2014).

Por otro lado, el efecto de las variantes génicas de las caseínas sobre la composición de proteína y las propiedades de coagulación de la leche sí que estaba estrechamente correlacionado (Heck *et al.*, 2009; Vallas *et al.*, 2012; Molee, A. *et al.*, 2011; Poulsen *et al.*, 2013; Gustavsson *et al.*, 2014).

Determinar la composición y el contenido de caseínas en la leche es importante para la elaboración de una amplia variedad de productos lácteos, especialmente quesos (Walstra *et al.*, 2006). Desafortunadamente, los genotipos de las caseínas más frecuentes (A2A2 para β -CN y AA para κ -CN) son desfavorables para la elaboración de quesos. Existe una significativa relación entre la variante A2 de la β -CN y una pobre coagulación (Poulsen *et al.*, 2013; Gustavsson *et al.*, 2014). Además la formación del gel o coágulo se ve condicionada por las otras variantes génicas de las otras caseínas, la α -CN y κ -CN (Poulsen *et al.*, 2013; Gustavsson *et al.*, 2014).

La variante B, tanto por β -CN, K-CN y β -lactoglobulina, parece ser la más indicada para la elaboración de quesos ya que posee las mejores propiedades de coagulación de la leche. Se sugiere que proporciona mayor rendimiento de proteínas, concentración de κ -CN, un tamaño de micelas más reducido y mayores niveles de calcio (Kucerová *et al.*, 2004; Micinski & Klupczynski, 2006; Hallén *et al.*, 2007; Heck *et al.*, 2009; Hallén *et al.*, 2010; Jensen *et al.*, 2012b). Los parámetros que tuvieron en cuenta en estos estudios fueron: la tasa de firmeza de la cuajada (CFR) y el tiempo de coagulación de la renina en la leche (RCT).

Otra variante poco común, es el alelo A3 que aunque se asoció a una mayor producción de leche no se recomendó para la elaboración de quesos debido a sus bajos niveles de proteínas y caseínas (Micinski & Klupczynski, 2006).

Visker y sus colaboradores (2011) detectaron otro polimorfismo, anteriormente discriminado o no descrito, el alelo I de β -CN, en poblaciones Holstein holandesas. Dicha variante I se asoció positivamente con un mayor porcentaje y producción de proteína. Sin embargo, tampoco era eficaz para la producción de quesos porque presentaba una ínfima coagulación, similar a la variante A2.

Recientemente, el estudio de Poulsen y sus colaboradores (2013) encontraron que la variante I era más común, en vacas danesas Holstein, que la variante B.

Los rasgos de fertilidad también se han relacionado con la composición de proteína y las variantes génicas de las proteínas de la leche. Estudios recientes, no avistaron ninguna correspondencia significativa entre la fertilidad de la vaca y las variantes génicas de las proteínas (Ruottinen *et al.*, 2004; Demeter *et al.*, 2010). Como caso particular, Peñagaricano y Katib (2012) encontraron un vínculo significativo entre diferentes polimorfismos de los genes de las proteínas del suero, β -lactoglobulina (LGB) y α -lactoalbumina (LALBA), con el éxito en la fertilización y la tasa de blastocito, en embriones bovinos. El genotipo GG, referenciado en el 62 SNP, de la LALBA mostraba una tasa de fertilización de 67% en comparación del 58.7% del genotipo GC. También, el genotipo GG, referenciado en el 61 SNP, de la LGB era más favorable para incrementar la fertilidad que el GA. Otro SNP (49) encontrado en LGB, mostró que vacas

con genotipo GA presentaban una tasa de blastocito mayor en comparación con vacas con genotipo GG.

De todos modos, el estudio sugirió la necesidad de mayor investigación, ya que todavía no está confirmada esta participación directa de los genes del suero con el proceso de fertilización y el desarrollo embrionario temprano.

La raza es otro factor intrínseco que causa también una variación en el perfil proteico y diferentes capacidades de coagulación (Heck *et al.*, 2009; Frederiksen *et al.*, 2011b; Jensen *et al.*, 2012b; Poulsen *et al.*, 2013). Para ejemplificar, el estudio Gustavsson y colaboradores (2014) revelaron que vacas Jersey poseían mejores propiedades de coagulación en su leche respecto vacas Holstein y Red suecas. Asimismo, la raza Jersey suele ser más propensa a presentar frecuencias superiores de la variante B.

Por otra parte, mediante ingeniería genética, con el fin de incrementar el porcentaje de grasa y proteínas en la leche Brophy y colaboradores (2003) generaron bovinos transgénicos que sobreexpresaban β y κ -CN, los cuales producían leche con un mayor contenido de caseína y proteínas totales sin perjudicar el perfil de ácidos grasos, aminoácidos y vitaminas.

Por último, se atribuye que las condiciones medioambientales tales como: la estación de la toma de muestras, el alimento, las condiciones fisiológicas del rebaño y las características de la propia vaca, son fuentes de variación en la composición y producción de leche (Hallén *et al.*, 2008; Walstra *et al.*, 2006).

2. OBJETIVO

Determinar la frecuencia del alelo A2 del gen de la β -CN (CSN2), en toros lecheros de la raza Holstein, destinados para la inseminación artificial en hatos lecheros mexicanos.

2.1. Objetivos específicos

- Implementar el análisis molecular (PCR-RFPL) como método de genotipificación de los alelos A1 y A2 del gen CSN2 en muestras de pajillas de semen congelado de bovino.
- Calcular las frecuencias génicas y genotípicas, de forma global y de cada grupo, del gen CSN2 en toros lecheros de la raza Holstein.
- Analizar las frecuencias de los tres grupos (poblaciones) de acuerdo con el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas encontradas con la distribución de frecuencias reportadas en otras investigaciones, en ganado lechero Holstein.

2.2. Justificación del Proyecto

El conocimiento de la variación génica de las caseínas en sementales es de suma importancia para los productores de leche por dos motivos: Por un lado, es que recurren habitualmente a la inseminación artificial y la evaluación genómica del semental permite seleccionar toros con mayor mérito genético, mejorando así la genética del rebaño para una característica determinada. Por el otro, es que con base al genotipo se puede orientar la producción lechera a determinados productos lácteos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 60 pajillas de semen congelado comercial importadas de empresas transnacionales y de explotaciones nacionales, en el periodo entre 2012- 2015, utilizadas para la inseminación artificial del ganado lechero mexicano. El trabajo de laboratorio se efectuó en las instalaciones del Instituto de Biotecnología Animal, del Departamento de Producción Animal, de la División de Ciencias Veterinarias, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, localizado en el kilómetro 7.5 de la carretera a San Isidro Mazatepec, calle Juárez No. 104, en la población de La Cofradía, Municipio de Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.

3.1. Obtención de ADN y Genotipificación

Para la extracción de ADN de las pajillas se siguió el procedimiento del kit Quick-gDNA™ Miniprep de Zymo Research. Las muestras con el ADN purificado fueron amplificadas y genotipadas en el locus del gen de β -CN (CSN2) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa acoplada con el análisis por polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP).

En base la secuencia del gen que codifica por la β -CN en bovinos (GenBank: X14711) se usó los cebadores diseñados por McLachlan (2006):

Delantero 5'- CTTCTTCCAGGATGAACTCCAGG – 3'

Reverso 5'- GAGTAAGAGGAGGGATGTTTTGTGGGAGGCTCT- 3'

Para producir un fragmento de 121 pb del gen CSN2, la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se compuso por: 0.06329 μ l de cebador delantero, 0.06596 μ l de cebador reverso, cada uno en concentraciones de 5 pmol/ μ l, 0.5 μ l de dNTP, 1.7 μ l DreamTaq buffer, y 0.2 U de DreamTaq Polimerasa (Fermentas). Del mix de la reacción de PCR se extrajo 13 μ l

por tubo contenidos en 5 µl DNA genómico. Las muestras fueron amplificadas con PCR Thermocycler Biometra bajo las siguientes condiciones: 95°C durante 5 min y 35 ciclos de: 94°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 50 s. La reacción final era completada con una síntesis final de 72°C durante 5 min.

Los amplicones de la PCR fueron digeridos con 5 U de la enzima de restricción *DdeI* de la marca BioLabs^{MR}. De nuevo, se usó Thermocycler Biometra programado en 1h y 30 min a 37°C para permitir la actividad de *Dde I*, con una secuencia de reconocimiento: 5'...C↓TNAG...3'. Después de que la enzima produjera los fragmentos de restricción, se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 4% con bromuro de etidio, como sustancia intercalante. Para su visualización se utilizó un transiluminador GEL LOGIC 200 IMAGING SYSTEM (Software Kodak MI).

3.2. Cálculo de frecuencias genotípicas y génicas

En la estimación de frecuencias para cada genotipo y alelo se utilizó el método de conteo directo (Nei, 1987).

Frecuencias genotípicas:

$$f(A1A1) = \frac{\text{no. de individuos de genotipo A1A1}}{\text{no. Total de individuos}}$$

$$f(A1A2) = \frac{\text{no. de individuos de genotipo A1A2}}{\text{no. Total de individuos}}$$

$$f(A2A2) = \frac{\text{no. de individuos de genotipo A2A2}}{\text{no. Total de individuos}}$$

Frecuencias génicas:

$$f(A1) = f(A1A1) + \frac{1}{2} f(A1A2)$$

$$f(A2) = 1 - f(A1)$$

La estimación del error estándar (SE) de las frecuencias génicas fue calculado como:

$$SE = \sqrt{p(1-p)/2n}$$

Siendo n el tamaño de la muestra, p la frecuencia del alelo A1 y 1-p la frecuencia del alelo A2.

3.3. Análisis de frecuencias y Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se realizó un análisis de frecuencias génicas y genotípicas según el origen de las pajillas, los grupos A y B, correspondientes a dos empresas transnacionales y C, de explotaciones nacionales, por medio de la prueba de Chi-Cuadrado, X^2 (con 1g.l, $p>0.05=3.84$), para determinar si se cumple la ley de equilibrio de H-W.

$$X^2 (df) = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

X^2 = Chi-cuadrado

df = grados de libertad

O = frecuencia genotípica observada

E = frecuencia genotípica esperada (Weir, 1990)

Para el análisis de las frecuencias se empleó el programa POPGENE[®] versión 1.32 (POPGENE, 1997).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prueba RFLP se realizó a través de la digestión del fragmento de 121 pb amplificado en la reacción de PCR. La enzima o endonucleasa de restricción *DdeI* reconoce una región de corte en el alelo A2, generando dos fragmentos de 35 pb y otro de 86 pb. El alelo A1 no es cortado y se mantiene como un solo fragmento de 121 pb.

En toros Holstein fueron detectados todos los genotipos (Tabla 2): homocigótico A1A1 (121 pb) en 8 muestras, heterocigótico A1A2 (121 pb, 86 pb, 35 pb) en 28 muestras y homocigótico A2A2 (86 pb, 35 pb) en 24 muestras.

En la Figura 2 se muestra un resultado obtenido del genotipado del alelo A1 y A2 del Gen de la β -CN (CSN2).

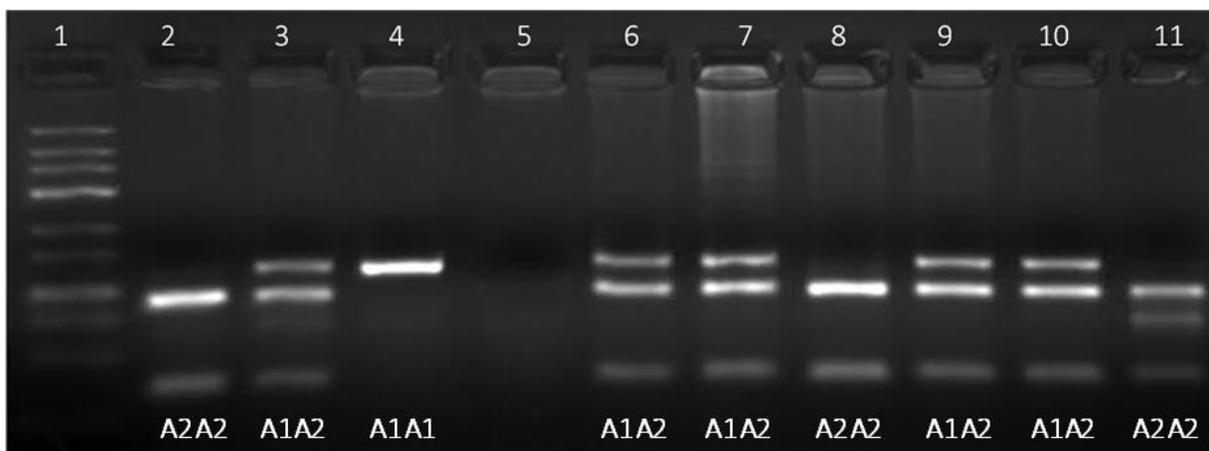


Figura 2: Resultados del genotipado del Gen CSN2 mediante la técnica PCR-RFLP. Electroforesis en gel de agarosa al 4%. Carril 1: marcador de peso molecular de 25 pb. Carriles 2, 3 y 4 controles: genotipo A2A2 (86pb, 35 pb), A1A2 (121 pb, 86 pb, 35 pb) y A1A1 (121 pb). Carril 5: Blanco de reacción. Carril 6, 7, 9 y 10: genotipo A1A2. Carril 8 y 11: genotipo A2A2.

Las frecuencias alélicas que se obtuvieron fueron 0.37 y 0.63, para A1 y A2, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2: Frecuencias alélicas y genotípicas del gen de β -CN (CSN2) en toros lecheros de la raza Holstein.

Genotipo CSN2	Muestra (n)	Frecuencias genotípicas	Frecuencias alélicas	
A1A1	8	0.1	A1	A2
A1A2	28	0.5		
A2A2	24	0.4		
Total	60		0.37	0.63

n: número de pajillas totales para cada genotipo

Los genotipos más frecuentes son el A1A2 y el A2A2.

Según el origen de las pajillas, se determinó sus frecuencias génicas y genotípicas (Tabla 3).

Tabla 3: Frecuencias alélicas y genotípicas del gen de la beta-caseína (CSN2) según la procedencia de las pajillas de semen congelado, de importación de empresas transnacionales (Grupos A y B) o de explotaciones nacionales (Grupo C).

Genotipo CSN2	Grupo A				Grupo B				Grupo C			
	n	F. genotípicas	F. alélicas		n	F. genotípicas	F. alélicas		n	F. genotípicas	F. alélicas	
A1A1	4	0.10	A1	A2	1	0.14	A1	A2	3	0.21	A1	A2
A1A2	20	0.51	0.35	0.65	4	0.57	0.42	0.58	4	0.29	0.35	0.65
A2A2	15	0.39			2	0.29			7	0.5		
Total	39	1			7	1			14	1		

El genotipo predominante por parte de las empresas transnacionales fue el A1A2 (grupo A, 0.51 y el grupo B, 0.57) en cambio el de las exportaciones nacionales fue el A2A2 (grupo C, 0.50). El alelo A2 es mayoritario en los tres grupos. No obstante, la prueba de Chi-Cuadrado (X^2) no mostró diferencias significativas entre grupos ($P > 0.05$) con lo cual, los grupos se encontraban en equilibrio génico (Tabla 4). De modo que, no se pudo evidenciar un proceso de selección, por parte de las empresas transnacionales, para el alelo A2 del gen CSN2.

Tabla 4: Equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias genotípicas

Procedencia	Prueba χ^2	Grados de libertad (df)	Probabilidad (P)
Grupo A	0.402116	1	0.525998
Grupo B	0.057143	1	0.811070
Grupo C	2.447.059	1	0.117745

Valores obtenidos con el programa POPGENE® (versión 1.32)

Por otro lado, se examinó la distribución de frecuencias de los alelos A1 y A2 del gen de la β -CN (CSN2), encontradas en estudios publicados en esta última década, también en la raza Holstein, en varios países (Tabla 5).

Tabla 5: Frecuencias de las variantes A1 y A2 de CSN2 en ganado lechero Holstein

Condición reproductiva	País	Frecuencia de los genotipos de la β -CN			Frecuencia de los alelos		Autores
		A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2	
Vacas	Eslovaquia	0.1379	0.4598	0.4023	0.3678	0.6322	Miluchová <i>et al.</i> , 2014
vacas y toros	Eslovaquia	0.13	0.83	0.04	0.54	0.46	Hanusová <i>et al.</i> , 2010
Vacas	Alemania	0.059	0.46	0.409	0.295	0.667	Çardak, 2005
Vacas	Romania	0.18	0.26	0.26	0.37	0.47	Bugeac <i>et al.</i> , 2015
Toros	Polonia	0.122	0.436	0.452	0.33	0.67	Oleński <i>et al.</i> , 2012
Vacas	Dinamarca	0.067	0.332	0.377	0.266	0.614	Gustavsson <i>et al.</i> , 2014
Vacas	Turquía	n/d	n/d	n/d	0.485	0.456	Dinc <i>et al.</i> , 2013
Toros	-	n/d	n/d	n/d	0.278	0.722	Dinc <i>et al.</i> , 2013
Vacas	Holanda	0	0.13	0.14	0.31	0.405	Visker <i>et al.</i> , 2011
Vacas	Polonia	0.12	0.39	0.49	0.32	0.68	Cieslinska <i>et al.</i> , 2012
Vacas	Holanda	0.08	0.41	0.50	0.285	0.692	Heck <i>et al.</i> , 2009
toros	Polonia	0.11	0.58	0.31	0.40	0.60	Kamiński <i>et al.</i> , 2006a
Vacas	Rep. Checa	0.20	0.50	0.29	0.45	0.55	Manga <i>et al.</i> , 2006
Vacas	Suecia	0.13	0.53	0.34	0.34	0.60	Hallén <i>et al.</i> , 2008
Vacas	Italia	0.13	0.51	0.36	0.385	0.615	Comin <i>et al.</i> , 2008
Vacas	México	0.17	0.48	0.35	0.387	0.613	Duifhuis Rivera <i>et al.</i> , 2014
Vacas	Tailandia	0.056	0.528- 0.606	0.268- 0.315	0.337- 0.363	0.602- 0.612	Molee <i>et al.</i> , 2011

Los genotipos predominantes para la mayoría de los estudios (Tabla 5) fueron el A1A2 y el A2A2 de acuerdo con los resultados del presente estudio (Çardak, 2005; Kamiński *et al.*, 2006a; Manga *et al.*, 2006; Comin *et al.*, 2008; Hallén *et al.*, 2008; Heck *et al.*, 2009; Molee *et al.*, 2011; Visker *et al.*, 2011; Cieslinska *et al.*, 2012; Oleński *et al.*, 2012; Duifhuis Rivera *et al.*, 2014; Gustavsson *et al.*, 2014; Miluchová *et al.*, 2014; Bugeac *et al.*, 2015). Consecuentemente, también el alelo A2 tuvo mayor frecuencia que el alelo A1. Los estudios de Kamiński y colaboradores (2006a) y Oleński y colaboradores (2012), que analizan también el semen de toros lecheros Holstein, presentaban frecuencias muy similares a las encontradas.

Kamiński y sus colaboradores (2006) elaboraron una tabla de frecuencias de los alelos A1, A2 y B del gen de la β -CN (CSN2). La información fue reportada hace más de dos décadas de diferentes estudios de genotipificación de razas de ganado bovino tipo lechero de varios países. Se observó, hasta principios del siglo XXI, que la raza Holstein presentaba una frecuencia similar de A1 y A2. Las frecuencias del alelo B presentaban valores muy bajos comprendidos entre 0.1 hasta 0.05.

No obstante, considerando las frecuencias recogidas, en estos últimos años (Tabla 5) en la raza lechera Holstein prevalece la frecuencia de A2. Tal y como sucede en otras razas europeas de producción lechera. En la Jersey se obtuvieron valores de frecuencia para el alelo A2 de 0.71 (Zepeda-Batista *et al.*, 2015) y 0.634 (Gustavsson *et al.*, 2014).

También, se observaron algunas excepciones como sería con Hanusová y colaboradores (2010) que obtuvieron una frecuencia del alelo A1 ligeramente mayor. Dinc y colaboradores (2013) encontraron frecuencias muy similares entre los dos alelos con muestras de vacas lecheras Holstein. Sin embargo, con muestras de toros candidatos (toros jóvenes seleccionados genéticamente) Holstein predominaba ampliamente el alelo A2.

Presuntamente, los programas de selección y cruzamiento, a sabiendas de los efectos negativos reportados en A1 y el posible vínculo de A2 a un mayor rendimiento de la leche, han fortalecido aún más su frecuencia (Kamiński *et al.*, 2006; Comin *et al.*, 2008; Heck *et al.*, 2009).

Gustavsson y colaboradores (2014) compararon las frecuencias alélicas y genotípicas en tres razas de bovinos europeos, Jersey danesa, Red sueca y Holstein danesa, muy estudiadas en la literatura (Bech & Kristiansen, 1990; Lundén *et al.*, 1997; Ojala *et al.*, 1997). Sus resultados evidenciaron que después de la primera y segunda década se había producido un decrecimiento del genotipo A1A1 (del 20% al 2% aprox.) y A1A2 (del 40% al 15% aprox.) en vacas de raza Holstein danesa. Además, apuntaron un aumento muy pronunciado del genotipo A2A2 (del 9% al 30% aprox.). Las otras dos razas, Jersey danesa y Red sueca, mostraban la misma tendencia de prevalencia del genotipo A2A2.

5. CONCLUSIONES

- Se logró, por medio de la técnica de PCR-RFLP, el genotipado de las variantes A1 y A2 de la β -CN (CSN2) en pajillas de semen de toro congeladas.
- El genotipo predominante en las pajillas procedentes de empresas transnacionales fue el heterocigótico A1A2, con valores de frecuencias para el grupo A de 0.51 y el grupo B de 0.57. En cambio, en pajillas de exportaciones nacionales (grupo C) el genotipo más común fue el homocigótico A2A2 con una frecuencia de 0.50. El alelo con mayor frecuencia fue el A2, tanto en la distribución global, con un valor de 0.63, como por cada grupo (grupo A: 0.65, grupo B: 0.58 y grupo C: 0.65).
- El análisis estadístico de X^2 determinó que no había diferencias en la distribución de frecuencias entre los grupos y se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. No se evidenciaron criterios de selección genotípica por parte de las empresas transnacionales.
- Se identificó cierta similitud entre las frecuencias de los alelos A1 y A2 del gen de la β -CN (CSN2) encontradas en este estudio con las reportadas en la literatura, en ganado bovino Holstein.
- Se muestra, de acuerdo con las publicaciones de otros estudios, una aparente tendencia al alza en el mantenimiento del alelo A2 en ganado bovino Holstein.

6. BIBLIOGRAFIA

Aleandri, R., Buttazzoni, L. G., Schneider, J. C., Caroli, A., & Davoli, R. (1990). The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *Journal of Dairy Science*, 73(2), 241-255.

Alexander, L. J., G. Hayes, W. Bawden, A. F. Stewart and A. G. Mackinalay. (1989). Complete nucleotide sequence of the bovine beta-lactoglobulin gene. *Anim. Biotechnol.* 4:1.

Barnett M.P.G., McNabb W.C., Roy N.C., Woodford K., Clarke A.J. (2014). Effects of Dietary A1 and A2 Beta-Casein on Gastrointestinal Transit Time, DPP-4 activity and Inflammatory Status, in Wistar Rats. *Int J Food Sci Nutr.*

Barrett, J. C., & Kawasaki, E. S. (2003). Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression. *Drug Discovery Today*, 8(3), 134-141.

Bastos, E., Cravador, A., Azevedo, J., & Guedes-Pinto, H. (2001). Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed 'Churra da Terra Quente'. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 5(1), 7-15.

Beales, P., Elliott, R., Flohe, S., Hill, J., Kolb, H., Pozzilli, P., ... & Scott, F. (2002). A multi-centre, blinded international trial of the effect of A1 and A2 β -casein variants on diabetes incidence in two rodent models of spontaneous Type I diabetes. *Diabetologia*, 45(9), 1240-1246.

Bech, A. M., and K. R. Kristiansen (1990). Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield. *Journal Dairy Research* 57: 53–62.

Bonfatti, V., G. Di Martino, A. Cecchinato, D. Vicario, and P. Carnier (2010b). Effects of β - κ -casein (CSN2–CSN3) haplotypes, β -lactoglobulin (BLG) genotypes on milk production traits and detailed protein composition of individual milk of Simmental cows. *J. Dairy Sci.* 93:3797–3808.

Boutrou R, Gaudichon C, Dupont D, Jardin J, Airinei G, Marsset-Baglieri A, et al. (2013). Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* 97(6), 1314-23.

Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, Elsik, C.G., Tellam, R.L. and Worley, K.C. (2009). The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*, 324: 522-528.

Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., L'Huillier P., Laible G. (2003). Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nature biotechnology.* 21(2):157–62.

Bugeac, T., Dumitraş, C. M., & Creangă, Ş. (2015). Genetic Polymorphism of beta-Casein Gene and its Associations with Milk Traits in Holstein-Friesian Cows, 48(1), 103–107.

Busquets, X., & Agustí, A. G. N. (2001). Chip genético (ADN array): el futuro ya está aquí. *Archivos de Bronconeumología*, 37(9), 394-396.

Cade J.R., Privette M.R., Fregly M., Rowland N., Sun Z., Zele V., et al. (2000). Autism and Schizophrenia: Intestinal Disorders. *Nutr Neurosci.* 3:57-72.

Camargo, O. (2012). La vaca lechera: Entre la eficiencia económica y la ineficiencia biológica. *Arch Zootec*, 61: 13-29.

Cardak, A. D. (2005). Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition from Holstein-Friesian and Simmentaler cows. *South African Journal of Animal Science*, 2005, vol. 35, no. 1, p. 41-47.

Caroli, A. M., S. Chessa, and G. J. Erhardt (2009). Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *J. Dairy Sci.* 92:5335–5352.

Cecchinato, A., Penasa, M., De Marchi, M., Gallo, L., Bittante, G., & Carnier, P. (2011). Genetic parameters of coagulation properties, milk yield, quality, and acidity estimated using

coagulating and noncoagulating milk information in Brown Swiss and Holstein-Friesian cows. *Journal of dairy science*, 94(8), 4205-4213.

Cieślińska A., Kamiński S., Kostyra E., Sienkiewicz-Szłapka E., (2007). Beta-casomorphin 7 in raw and hydrolysed milk derived from cows of alternative β -casein genotypes. *Milchwissenschaft* 62: 125–127.

Clare, D.A., Swaisgood, H.E.(2000). Bioactive milk peptides: A prospectus. *J. Dairy Sci.* 83:1187-1195.

Comin, A., Cassandro, M., Chessa, S., Ojala, M., Dal Zotto, R., de Marchi, M, Carnier, P., Gallo, L., Pagnacco, G., Bittante, G. (2008) Effects of composite β - and κ -Casein genotypes on milk coagulation, quality, and yield traits in Italian Holstein cows, *J. Dairy Sci.*

Cremonesi, P., Pisoni, G., Severgnini, M., Consolandi, C., Moroni, P., Raschetti, M., & Castiglioni, B. (2009). Pathogen detection in milk samples by ligation detection reaction-mediated universal array method. *Journal of dairy science*, 92(7), 3027-3039.

De Noni I (2008) Release of β -casomorphins 5 and 7 during simulated gastrointestinal digestion of bovine β -casein variants and milk-based infant formulas. *Food Chem* 110:897–903.

De Noni I, Cattaneo S. (2010). Occurrence of beta-casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and in their digests following in vitro simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chem* 119: 560-566.

Demeter RM, Markiewicz K, van Arendonk JAM & Bovenhuis H. (2010). Relationships between milk protein composition, milk protein variants, and cow fertility traits in Dutch Holstein-Friesian cattle. *Journal of Dairy Science* 93 5495–5502.

Dinc, H., Ozkan, E., Koban, E., Togan, I., (2013) Beta-casein A1/A2, kappa casein and beta-lactoglobulin polymorphisms in Turkish cattle breeds. *Archiv Tierzucht*, 56, doi.org/10.7482/0003-9438-56-065.

Duifhuis Rivera T., Lemus-Flores C., Ayala-Valdovinos M. Á., Sánchez –Chiprés D. R., Galindo-García J., Mejía-Martínez K. y 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. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(5): 1316-1321.

EFSA. (2009). Review of the potential health impact of b-casomorphins and related peptides. *EFSA Science Report* 231:1–107,

Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/231r.htm>

Eggerding F.A. (1994) A one-step coupled amplification and oligonucleotide ligation procedure for multiplex genetic typing. A novel, *Am J. Hum. Genet.* 55, A1063.

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: 292–296.

Ellison J., Dean M. and Goldman D. (1993) Efficacy of fluorescence-based PCR-SSCP for detection of point mutations. *Biotechniques*;15:684-91.

Evans, R. D., Buckley, F., Dillon, P. and Veerkamp, R. F. (2002). Genetic parameters for production and reproduction of spring-calving upgraded Holstein-Friesian dairy cows in Ireland. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 41: 43-54.

Fiat, A. M., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Sollier, C. B. D., & Caen, J. (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 301-310.

FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of Nutrition*, 134(4), 980S-988S.

Foltz M., Meynen E.E., Bianco V., van Platerink C., Koning TMMG, Kloek J. (2007) Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *J Nutr.* 137: 953-958.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Dairy production and products. Global milk production (2011-12).

http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.Va_UArPtmkq

Fox, P.F and McSweeney P.L.H eds (2003) *Advanced Dairy Chemistry Vol.1, Proteins*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Frederiksen, P. D., M. Hammershøj, M. Bakman, P. N. Andersen, J. B. Andersen, K. B. Qvist, and L. B. Larsen (2011b). Variations in coagulation properties of cheese milk from three Danish dairy breeds as determined by a new free oscillation rheometry-based method. *Dairy Sci. & Technol.* 91:309–321.

Gálik, B., Bíro, D., Simko, M., Juráček, M., Horniaková, E., Rolinec, M. (2011). Nutritional characteristic of feed (Nutričná charakteristika krmív), Nitra : SUA, 101 p.

Gaucher, I., Molle, D., Gagnaire, V. and Gaucheron, F. (2008). Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semiskimmed UHT milk. *Food Hydrocol.* 22(1):130–143. doi: 10.1016/j. foodhyd.2007.04.007.

Gaucheron, F., Molle, D., Briard, V. and Leonil, J. (1999). Identification of low molar mass peptides released during sterilization of milk. *Int. Dairy J.* 9 (8):515–521.

Giannino, M. L., Aliprandi, M., Feligini, M., Vanoni, L., Brasca, M., & Fracchetti, F. (2009). A DNA array based assay for the characterization of microbial community in raw milk. *Journal of microbiological methods*, 78(2), 181-188.

Gobbetti, M., Minervini, F., & Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 173-188.

Grummer, R.R., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Watters, R.D. and Silva-Del-Rio, N. (2010). Management of dry and transition cows to improve energy balance and reproduction. *J Reprod Dev*, 56 (Suppl): S22-28.

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), 3866-3877.

Hallén, E., T. Allmere, J. Näslund, A. Andrén, and A. Lundén (2007). Effect of genetic polymorphism of milk proteins on rheology of chymosin-induced milk gels. *Int. Dairy J.* 17:791–799.

Hallén, E., A. Wedholm, A. Andrén, and A. Lundén (2008). Effect of β -casein, κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants. *J. Anim. Breed. Genet.* 125:119–129.

Hallén, E., Lundén, A., Allmere, T., Andrén, A. (2010) Casein retention in curd and loss of casein into whey at chymosin-induced coagulation of milk. *J. Dairy Res.* 2010;77:71–76.

Hanusová, E., J. Huba, M. Oravcová, P. Polák, and I. Vrtková. (2010). Genetic variants of beta casein in Holstein dairy cattle in Slovakia. *Slovak Journal of Animal Science* 43(2): 63-66.

Haq M.R., Kapila R., Sharma R., Saliganti V., Kapila S., (2013). Comparative evaluation of cow β -casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut. *Eur J Nutr.*

Haq MRU, Kapila R., Saliganti V., (2014). Consumption of β -casomorphins-7/5 induce inflammatory immune response in mice gut through Th2 pathway. *J Functional Foods*. 8, 150-60.

Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 163-169.

Heck, J. M. L., Schennink, A., Valenberg, H. J. F., Bovenhuis, H., Visker, M. H., Arendonk, J. A. M., Hooijdonk, A. C. M. (2009). Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk, *J. Dairy Sci.*, 92, 1192-1202.

Heins, B. J., Hansen, L. B., Seykora, A. J., Johnson, D. G., Linn, J. G., Romano, J. E., & Hazel, A. R. (2008). Crossbreds of Jersey \times Holstein compared with pure Holsteins for production, fertility, and body and udder measurements during first lactation. *Journal of dairy science*, 91(3), 1270-1278.

Hernández-Ledesma, B., B. Miralles, L. Amigo. M. Ramos, I. Recio (2005). Identification of and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85:1041-1048.

Ho, S., Woodford, K., Kukuljan, S., & Pal, S. (2014). Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study. *European journal of clinical nutrition*, 68(9), 994-1000.

Hornshøj, H., Conley, L. N., Hedegaard, J., Sørensen, P., Panitz, F., & Bendixen, C. (2007). Microarray expression profiles of 20.000 genes across 23 healthy porcine tissues. *PloS one*, 2(11), e1203.

International Dairy Federation and Statistics Canada. *Global Consumption of dairy products (2011-13)*.

Illumina Data Sheet: DNA Analysis. BovineHD Genotyping BeadChip. (2010).

Jarmolowska, B., Kostyra, E., Krawczuk, S. and Kostyra, H. (1999). Betacasomorphin-7 isolated from Brie cheese. *J. Sci. Food Agr.* 79(13):1788.

Jarmołowska, B., Sidor, K., Iwan, M., Bielikowicz, K., Kaczmarski, M., Kostyra, E., & Kostyra, H. (2007). Changes of β -casomorphin content in human milk during lactation. *Peptides*, 28(10), 1982-1986

Jensen, H. B., N. A. Poulsen, K. K. Andersen, M. Hammershoj, H. D. Poulsen, and L. B. Larsen. 2012b. Distinct composition of bovine milk from Jersey and Holstein-Friesian cows with good, poor, or noncoagulation properties as reflected in protein genetic variants and isoforms. *J. Dairy Sci.* 95:6905–6917.

Jinsmaa, Y. & Yoshikawa, M. (1999). Enzymatic release of neocasomorphin and [beta]-casomorphin from bovine [beta]-casein. *Peptides* 20(8):957–962.

K.F. Ng-Kwai-Hang, F. Grosclaude (2003). Genetic polymorphism of milk proteins *Adv Dairy Chem*, 1, pp. 739–816.

Kamau, S. M., Lu, R. R., Chen, W., Liu, X. M., Tian, F. W., Shen, Y., & Gao, T. (2010). Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins. *Food Reviews International*, 26(4), 386-401.

Kamiński S. Ruś A, Cieślińska A. (2006a). A note on frequency of A1 and A2 variants of bovine beta-casein locus in Polish Holstein bulls. *J Anim Feed Sci* 15: 195–198.

Kamiński, S. Cieslinka, A. Kostyra, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-cesein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics*, vol.48, no.3, p. 189-198

Kamiński, Kostyra E., Cieslinska A., Fiedorowicz E. (2012) Consumption of bovine b-casein variants (A1 or A2) does not affect basic hematological and biochemical indices. *Milchwissenschaft* 67(3):238–241.

Khatib H., Huang W., Wang X., Tran A. H., Bindrim A.B., Schutzkus V., Monson R. L. & Yandell B. S. (2009). Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle. *Journal of Dairy Science* 92 2238–2247.

Korhonen, H., A. Pihlanto (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*. 16: 945-960

Kost NV, Sokolov OY, Kurasova OB, Dmitriev AD, Tarakanova JN, Gabaeva MV, Zolotarev YA, Dadayan AK, Grachev SA, Korneeva EV, Mikheeva IG, Zozulya AA, (2009). Beta-casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. *Peptides*. 30(10), 1854-60.

Kučerová, J., Němcová, E., Stípková, M., Vrtková, I., Dvořák, J., Frelich, J., Bouška, J. and Maršálek, M., (2004). The influence of markers CSN3 and ETH10 on milk production parameters in Czech Pied cattle. *Journal of Central European Agriculture*, 5: 303–308

Lahov, E., & Regelson, W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology*, 34(1), 131-145.

Lin CY, Sabour MP, Lee AJ (1992). Direct typing to milk proteins as an aid for genetic improvement of dairy bulls and cows: A review. *Anim Breeding Abstracts*, 60: 1-10

Lúnden, A., M. Nilsson, and L. Janson (1997). Marked effect of β -lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *Journal of Dairy Science* 80: 2996–3005.

Lonnerdal, B., Bergstrom, S., Andersson, Y., Hjalmarsson, K., Sundqvist, A. K., Hernell, O. (1990) Cloning and sequencing of a cDNA encoding human milk beta-casein. *FEBS Lett.* 269: 153-156.

Maeno, M., N. Yamamoto, and T. Takano (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 79:1316–1321.

Manga, I. Říha, J. dvo Řák, J. (2006). Comparison of influence markers CSN3 and CSN2 on milk performance traits in Czech Spotted and Holstein cattle tested at first, fifth and higher lactation. *Acta fytotechnica and zootechnica*, vol. 9, supplement, p. 13-15.

Maruyama, S., K. Nakagomi, N. Tomizuka, and H. Suzuki (1985). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 49:1405–1409.

Maas, J.A., Garnsworthy, P.C. and Flint, A.P.F. (2009). Modelling responses to nutritional, endocrine and genetic strategies to increase fertility in the UK dairy herd. *Vet J*, 180: 356-362.

McLachlan CN, (2001). Beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Med Hypotheses* 56: 262–272.

McLachlan CN (2006). Breeding and milking cows for milk free of β -casein A1. United States Patent 7094949.

Medina, V. R. M., Rincón, A. M. S., & Alférez, B. P. (2009). Herramientas para el análisis de la variación genético-molecular. *CIENCIA-UANL*, 12(2), 201-205.

Medrano, J.F., E. Aguilar-Cordova (1990). Polymerase chain reaction amplification of bovine b-lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Anim Bio-Technol* 1:73 – 77.

Medrano, R. F. V., & de Oliveira, C. A. (2014). Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Molecular biotechnology*, 56(7), 599-608.

Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 8(5), 363-373.

Meisel, H. (1997). Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Production Science*. 50:125-138.

Meltretter, J., Schmidt, A., Humeny, A., Becker, C. and Pischetsrieder, M. (2008). Analysis of the peptide profile of milk and its changes during thermal treatment and storage. *J. Agr. Food Chem*. 56(9):2899.

Micinski, J., J. Klupczynski (2006). Correlations between polymorphic variants of milk proteins, and milk yield and chemical composition in Black-and-white and Jersey cows. *Pol J Food Nutr Sci*. 15: 137–143.

Miciński, J., J. Klupczyński, W. Mordas, and R. Zabłotna (2007). Yield and Composition of milk from Jersey cows as dependent on the genetic variants of milk proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 57(3): 95-99.

Miluchová, M., Gábor, M., & Trakovická, A. (2014). Analysis of beta-casein gene (CSN2) polymorphism in different breeds of cattle. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 47(2), 56-59.

Molee, A., Boonek, L., Rungsakinnin, N., (2011). The effect of beta and kappa casein genes on milk yield and milk composition in different percentages of Holstein in crossbreed dairy cattle. *Animal Science Journal*, 82, 512-516.

Mullally, M. M., H. Meisel, and R. J. FitzGerald (1996). Synthetic peptides corresponding to alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin sequences with angiotension-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 377:259–260.

Mullally, M. M., H. Meisel, and R. J. FitzGerald (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine beta-lactoglobulin. *FEBS Lett*. 402:99–101.

Napoli C, Lerman L, Sica V, Lerman A, Tajana G, de Nigris F. (2003). Microarray Analysis: a novel research tool for cardiovascular scientists and physicians. *Heart*; 89: 597-604.

Neil, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.

Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., Powell S.J., Summers C., Kalsheker N., Smith J.M., Markham A.F. (1989) Analysis of any mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*, 17(7): p. 2503-2516.

Ng-Kwai-Hang, K. F., Hayes, J. F., Moxley, J. E., & Monardes, H. G. (1986). Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 69(1), 22-26.

Ng-Kwai-Hang, K. F., J. F. Hayes, J. E. Moxles, and H. G. Monardes. (1987). Variation in milk protein concentration association with genetic polymorphism and environmental factors. *J. Dairy Sci.* 70: 563–570.

Nguyen, D. D., Solah, V. A., Johnson, S. K., Charrois, J. W. A., & Buseti, F. (2014) Isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry for simultaneous identification and quantification of beta-casomorphin 5 and beta-casomorphin 7 in yoghurt. *Food Chemistry*, 146, 345–352.

Ojala, M., T. R. Famula, and J. F. Medrano (1997). Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. *Journal of Dairy Science* 80: 1776–1785.

Oleński, K., Cieslinska, A., Suchocki, T., Szyda, J., & Kaminski, S. (2012). Polymorphism in coding and regulatory sequences of beta-casein gene is associated with milk production traits in Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 30(1), 12.

Oltenacu, P. A., & Broom, D. M. (2010). The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare*, 19(1), 39-49.

Ong, L., & Shah, N. P. (2008). Influence of Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. helveticus* on Proteolysis, Organic Acid Profiles, and ACE-Inhibitory Activity of cheddar Cheeses Ripened at 4, 8, and 12° C. *Journal of food science*, 73(3), M111-M120.

Parra MD, Martinez de Morentin BE, Cobo JM, Mateos A, Martinez JA (2004). Daily ingestion of fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN114001 improves innate-defense capacity in healthy middle-aged people. *J Physiol Biochem*. 60: 85-91.

Peñagaricano F, and Khatib H. (2012). Association of milk protein genes with fertilization rate and early embryonic development in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Research* 79: 47–52.

Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*. 16: 1306-1314.

Pihlanto, A., Virtanen, T., & Korhonen, H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, 20(1), 3-10.

Poliwoda, A., & Wiczorek, P. P. (2009). Sample pretreatment techniques for oligopeptide analysis from natural sources. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 885–897.

POPGENE® versión 1.32, F. 1997. Software para análisis estadístico de datos genéticos. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta and Center for International Forestry Research. USA.

Poulsen, N. A., H. P. Bertelsen, H. B. Jensen, F. Gustavsson, M. Glantz, H. L. Mansson, A. Andren, M. Paulsson, C. Bendixen, A. J. Buitenhuis, and L. B. Larsen (2013). The occurrence of noncoagulating milk and the association of bovine milk coagulation properties with genetic variants of the caseins in 3 Scandinavian dairy breeds. *J. Dairy Sci.* 96:4830–4842.

Rachid M, Matar C, Duarte J, Perdigon G. (2006) Effect of milk fermented with a *Lactobacillus helveticus* R389(+) proteolytic strain on the immune system and on the growth of 471 breast cancer cells in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 47: 242-253.

Ramírez, J., Chávez, L., Santillán, J. L., & Guzmán, S. (2003). Microarreglos de DNA. *Mensaje Bioquímico*, 27, 97-120.

Rendel, J.M and Robertson, A. (1950) Estimation of genetic gain in milk production by selection in a closed herd of dairy cattle. *J. Genetics.* 50: 1-8.

Riesner D., Steger G., Zimmat R., Owens R. , Wagenhofer M., Hillen W., Vollbach S., Henco K (1989). Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: Analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions. *Electrophoresis* 10, p. 377–389.

Roelofs, J., López-Gatius, F., Hunter, R. H. F., Van Eerdenburg, F. J. C. M., & Hanzen, C. (2010). When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology*, 74(3), 327-344.

Ruiz Ruiz, J. C., Segura-Campos, M. R., Betancur-Ancona, D., & Chel-Guerrero, L. (2013). Proteínas y péptidos biológicamente activos con potencial nutracéutico. *OmniaScience Monographs*.

Ruottinen O, Ikonen T & Ojala M. (2004). Associations between milk protein genotypes and fertility traits in Finnish Ayrshire heifers and first lactation cows. *Livestock Production Science* 85 27–34

Schieber, A., & Brückner, H. (2000). Characterization of oligo- and polypeptides isolated from yoghurt. *European Food Research and Technology*, 210(5), 310-313.

Seveg, D. (1992). Amplification of nucleic acid sequences by the repair chain reaction in Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules, Kessler, C. Ed., Springer Lab, Berlin.

Severance EG, Dickerson FB, Halling M, Krivogorsky B, Haile L, et al. (2010) Subunit and whole molecule specificity of the anti-bovine casein immune response in recent onset psychosis and schizophrenia. *Schizophr Res* 118: 240–247. doi: 10.1016/j.schres.2009.12.030.

Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW and Stone EM (1993). The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*;16:325-32.

Sienkiewicz-Szłapka E, Jarmołowska B, Krawczuk S, Kostyra E, Kostyra H, M. Iwan M (2009). Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *Int Dairy J* 19:258-263.

Solarte P., Carlos; Rosero G., Carol y Eraso C., Yohana. (2012). Comparación de metodologías moleculares para identificar el gen de la kappa caseína en ganado Holstein. *Rev.MVZ Cordoba*. Vol.17, n.1, pp. 2878-2883.

Somkuti, G. A., & Paul, M. (2010). Enzymatic fragmentation of the antimicrobial peptides casocidin and isracidin by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(1), 235-242.

Sun Z., Zhang Z., Wang X., Cade R., Elmer Z., Fregly M. (2003). Relation of beta-casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides* 24: 937–943.

Tailford KA, Berry CL, Thomas AC, Campbell JH (2003). A casein variant in cow's milk is atherogenic. *Atherosclerosis*;170:13–19.

Taylor, G. R. (1997). *Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA*. CRC Press.

Trompette A., Claustre J., Caillon F., Jourdan G., Chayvialle J.A., Plaisancié P., (2003). Milk bioactive peptides and beta-casomorphins induce mucus release in rat jejunum. *J Nutr*. 133(11), 3499-503.

United States Department of Agriculture (USDA) Federal Milk Order 1. Agricultural Service Dairy Programs. Northeast Marketing Area. Dairy Products Annual Summary, National Agricultural Statistics Service (NASS), USDA.

Van Raden, P. M., & Sanders, A. H. (2003). Economic merit of crossbred and purebred US dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 86(3), 1036-1044.

Van Raden P.M. (2004). Invited review: selection on net merit to improve lifetime profit. *Journal of Dairy Science* 87: 3125-3131

Veerkamp R. F. & Beerda B. (2007). Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology* 68S S266–S273

Visker, M. H. P. W., B. W. Dibbits, S. M. Kinders, H. J. F. van Valenberg, J. A. M. van Arendonk, and H. Bovenhuis (2011). Association of bovine β -casein protein variant I with milk production and milk protein composition. *Anim. Genet.* 42:212–218.

Walstra, P., J. T. M. Wouters, and T. J. Geurts (2006). *Dairy Science and Technology*. 2nd ed. Taylor & Francis, Boca Raton, FL.

Wang, D. and Teichtahl, H. (2007). Opioids, steep architecture and steep-disordered breathing. *Sleep Medicine Reviews* 11 (1): 35-46.

Wasilewska J., Sienkiewicz-Szlapka E., Kuzbida E., Jarmolowska B., Kaczmarek M., Kostyra E., (2011). The exogenous opioid peptides and DPPIV serum activity in infants with apnoea expressed as apparent life threatening events (ALTE). *Neuropeptides*. 45(3), 189-95.

Wedholm, A., L. B. Larsen, H. Lindmark-Månsson, A. H. Karlsson, and A. Andrén (2006). Effect of protein composition on the cheese making properties of milk from individual dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:3296–3305.

Whiteley, Paul, *et al.* The ScanBrit randomised, controlled, single-blind study of a gluten-and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders (2010). *Nutritional neuroscience* 13.2 87-100.

Zucht, H. D., M. Raida, K. Adermann, H. J. Magert, and W. G. Forssman (1995). Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett.* 372:185–188.

Weir, B.S. 1990. *Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data.* Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, MA. p. 377.

Womack, J. E., Johnson, J. S., Owens, E. K., Rexroad, C. E., Schläpfer, J., & Yang, Y. P. (1997). A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping. *Mammalian Genome*, 8(11), 854-856.