

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica**



**DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS ALELOS A1 Y A2 DEL GEN CSN2  
EN BOVINOS DE RAZA HOLSTEIN Y BOVINOS CRIOLLOS DEL DEPARTAMENTO  
DE APURÍMAC.**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Zúñiga Aranibar, Dayana Milagros**

para optar el Título Profesional de

**Ingeniera Biotecnóloga**

Asesor:

**Ing. Carpio Carpio, José Miguel**

Co - asesor:

**Blga. Yalta Macedo, Claudia**

**Arequipa – Perú**

**2022**

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**INGENIERIA BIOTECNOLOGICA**  
**TITULACIÓN CON TESIS**  
**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR**

Arequipa, 31 de Agosto del 2022

**Dictamen: 006635-C-EPIB-2022**

Visto el borrador del expediente 006635, presentado por:

**2012801542 - ZUÑIGA ARANIBAR DAYANA MILAGROS**

Titulado:

**DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS ALELOS A1 Y A2 DEL GEN CSN2 EN BOVINOS DE  
RAZA HOLSTEIN Y BOVINOS CRIOLLOS DEL DEPARTAMENTO DE APURÍMAC**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

**2478 - TERAN DIANDERAS ADILMI MILAGRO  
DICTAMINADOR**



**3135 - LOPEZ ALVAREZ NATALIA PAOLA  
DICTAMINADOR**



**3319 - MEDINA CABRERA EDILBERTO VICENTE  
DICTAMINADOR**



## DEDICATORIA

*A mi Dios, por darme fortaleza en todo momento y ser tan real en mi vida.*

*A mi papá Jesús por esforzarse en sacarme adelante, por estar pendiente de lo que necesito, aunque ya no sea la misma niña de antes, por retarme a conseguir mejores cosas para mi futuro.*

*A mi mamá Milagros por haber luchado por mí desde que tengo uso de razón, por su cariño y sus ocurrencias. Por enseñarme a que debo tener mis prioridades en orden y a no depender de nadie sólo de Dios.*

*A mis hermanitas Sharon y Antonella que son el regalo más tierno que Dios me ha dado y un fuerte motivo para ser yo una mejor persona y poder ser la hermana mayor en la que encuentren un apoyo incondicional y un buen ejemplo.*

*A mi papá Jesús (abuelito); a mi mamá Magda por engréirme siempre, por su cuidado y preocupación constante; a mi papá Osquitar por soñar siempre con mi futuro, por engréirme y haber colocado en mí recuerdos eternos y haberme dicho que soy tu alegría días antes de irte. Los tres son mis angelitos en el cielo y aunque su partida es algo que no supero, estoy agradecida por ser parte de su legado.*

*A mi mamita Carmen por criarme como su hija menor, por haberme inculcado buenos valores, por enseñarme a ser una mujer esforzada y valiente. Que Dios me regale muchísimos años más a tu lado y la oportunidad de compensarte todo lo que has hecho por mí.*

*A mi tía Camucha, mis tíos Papi, Fernando, Christian y Alex con los cuales he tenido la fortuna de poder vivir toda mi niñez y pubertad. Por haberme dado tanto cariño, amor, risas escandalosas, el gusto por el baile y la buena música. Todos sus consejos están siempre presentes en mi mente y en mi corazón.*

*A mi tía Anita y a mi Zoilita por todas sus atenciones conmigo y estar siempre pendientes de mí.*

## AGRADECIMIENTO

*A mi Dios, por su protección y por haberme rodeado de las personas correctas en el momento correcto para la realización de esta tesis.*

*A la Blga. Claudia Yalta por su guía, por sus correcciones, por haberme ayudado a aprender de mis errores además de su constante ayuda y paciencia para poder culminar esta investigación.*

*A la Blga. Wendy Acuña por capacitarme, por todos sus conocimientos compartidos conmigo, por haber sacado a adelante el proyecto y por darme la oportunidad de desarrollar otras habilidades.*

*Al Ing. Eudosio Veli que ha sido pieza clave para el desarrollo de este trabajo de investigación, por sus buenos valores y hábitos que hicieron del equipo de Biotecnología Animal un equipo sólido en el cual desempeñarse y desarrollarse como profesional.*

*Al Ing. José Carpio por su asesoría, orientación y corrección durante la redacción de esta tesis.*

*A la Blga. Judith García por su apoyo y corrección en la realización del proyecto de investigación al cual pertenece esta tesis.*

*A la Téc. Yris Tenazoa por brindarme las herramientas necesarias para las actividades de laboratorio.*

*Al Adm. Juan Torres por haber hecho factible cada requerimiento de esta tesis.*

*A los Blgos. Henry Mallqui y Gerardo Díaz por ayudarme con la parte experimental de esta investigación.*

*Al Blgo. Cristian Bustamante por su amable disponibilidad en ayudarme, por sus correcciones desde que ingresé al equipo de Biotecnología animal y sus consejos para seguir adelante en el ámbito profesional.*

*Al Blgo. Lenin Chumbe por atender a mis consultas siempre que lo he necesitado, especialmente en la última etapa de la redacción de esta tesis.*

*A mis amigos tesisistas de Biotecnología Animal: Mechita, Lili y Francisco por todas las anécdotas vividas y el gran apoyo que nos hemos dado.*

*A mi familia limeña: tía Eli, tío Helbert y Johanna por tanto cariño, cuidado, apoyo que me han brindado, por abrirme las puertas de su casa y tratarme como una hija más.*

*Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) por permitirme usar las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica para la realización de esta tesis.*

*Al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) por el financiamiento de esta tesis bajo el marco del Proyecto de Investigación 232\_PI titulado "IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS LÁCTEAS ASOCIADAS A CARACTERÍSTICAS DE IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA LECHERA"*



## RESUMEN

La leche bovina es un alimento muy consumido en Perú y estudios han demostrado que la calidad de la leche puede verse afectada por variantes genéticas presentes en las proteínas lácteas; de las cuales la beta caseína constituye el 30%. Las variantes genéticas A1 y A2 son las más comunes de esta proteína. La variante A1 ha sido relacionada con la liberación de un péptido perjudicial para la salud mientras que la variante A2 ha mostrado mejores propiedades para el ser humano. Esta investigación tuvo como objetivo determinar la frecuencia de los alelos A1 y A2 del gen *CSN2* (gen que codifica para la síntesis de la proteína láctea beta caseína) en bovinos de raza Holstein de la empresa LACTEA S.A. y en bovinos criollos del departamento de Apurímac, mediante el ensayo PCR-RFLP. Los análisis estadísticos señalaron que en los bovinos raza Holstein las frecuencias genotípicas fueron 0.20 (A1A1), 0.46 (A1A2) y 0.34 (A2A2) y la frecuencia de los alelos A1 y A2 fue de 0.43 y 0.57 respectivamente; mientras que en los bovinos criollos del departamento de Apurímac las frecuencias genotípicas fueron 0.08 (A1A1), 0.42 (A1A2) y 0.50 (A2A2) y la frecuencia del alelo A1 fue de 0.29 y del alelo A2 fue de 0.71. Además, se determinó que ambas poblaciones de estudio se encontraron en equilibrio de Hardy Weinberg. Los resultados mostraron que el genotipo con mayor frecuencia fue el A1A2 en los bovinos raza Holstein y el A2A2 en los bovinos criollos estudiados y que el alelo A2 del gen *CSN2* fue el más frecuente en ambas poblaciones; sin embargo, fue significativamente más frecuente en los bovinos criollos del departamento de Apurímac (Valor  $P < 0.05$ ).

### Palabras clave:

Gen *CSN2*, bovino criollo, bovino raza Holstein, PCR-RFLP, frecuencias genotípicas, frecuencias alélicas (A1A1), (A1A2) y (A2A2).

## ABSTRACT

Bovine milk is a widely consumed food in Peru and studies have shown that the quality of milk can be affected by genetic variants present in milk proteins; of which beta casein constitutes 30%. Genetic variants A1 and A2 are the most common of this protein. The A1 variant has been related to the release of a peptide that is harmful to health, in contrast the A2 variant has shown better properties for humans. The aim of this research was to determine the frequency of the alleles A1 and A2 of the gene CSN2 (gene that encodes the protein beta casein in bovine milk) in Holstein cattle of the company LACTEA S.A. and in creole cattle of the department of Apurimac, utilizing the PCR-RFLP assay. The statistical analysis genotypic frequencies were 0.20 (A1A1), 0.46 (A1A2) and 0.34 (A2A2), frequency of 0.43 and 0.57 for the A1 and A2 alleles respectively; while in creole cattle the genotypic frequencies were 0.08 (A1A1), 0.42 (A1A2) and 0.50 (A2A2) while for the A1 allele was 0.29 and the A2 allele was 0.71. Furthermore, it was determined that both populations reach the Hardy Weinberg equilibrium. The results showed that the most frequent genotype in Holstein cattle was A1A2 and A2A2 in the creole cattle; A2 allele of the CSN2 gene was the most frequent in both populations; however, it was significantly more frequent in creole cattle from the department of Apurimac ( $P$  value  $< 0.05$ ).

### Keywords:

CSN2 gene, creole cattle, Holstein cattle, PCR-RFLP, genotypic frequencies, allelic frequencies (A1A1), (A1A2) y (A2A2).

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BCM 7</b>	Betacasomorfina 7
<b>CENAGRO</b>	Censo Nacional Agropecuario
<b>DEEIA</b>	Dirección de Estudios Económicos e Información Agraria
<b>DGPA</b>	Dirección General de Promoción Agraria
<b>NTP</b>	Nucleósido trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
<b>IGN</b>	Instituto Geofísico Nacional
<b>INIA</b>	Instituto Nacional de Innovación Agraria
<b>LO</b>	Latitud oeste
<b>LS</b>	Latitud sur
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligramos
<b>MIDAGRI</b>	Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>pb</b>	pares de bases

<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
<b>pH</b>	potencial de Hidrógeno
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism (Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica)
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SCIPA</b>	Servicio Cooperativo Interamericano de Producción de Alimentos
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de nucleótido único)
<b>TBE</b>	Tris-Borato-EDTA
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>tn</b>	Toneladas
<b>U</b>	Unidades
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Voltios
<b>var.</b>	Variación
<b>°C</b>	grados centígrados
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Producción de leche fresca de vaca según región, 2009 – 2018 (toneladas). .....	12
<b>Tabla 2.</b> Número de individuos muestreados por área de estudio .....	26
<b>Tabla 3.</b> Frecuencias genotípicas y alélicas para el gen CSN2 en las poblaciones de estudio ....	45
<b>Tabla 4.</b> Prueba de Chi cuadrado para las frecuencias genotípicas entre poblaciones .....	46
<b>Tabla 5.</b> Coordenadas de los puntos de colecta del departamento de Apurímac. ....	63
<b>Tabla 6.</b> Protocolo de amplificación del fragmento que contiene el SNP rs43703011 del gen CSN2.....	70
<b>Tabla 7.</b> Protocolo de digestión del fragmento amplificado con la enzima DdeI.....	70



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A) Toro Holstein color berrendo negro, con la variante genética A2A2 del gen CSN2 (10). B) Vaca Holstein color berrendo negro, ganadora del premio “Estrella de la raza 2011” de la Asociación Holstein de Estados Unidos. C) Vaca Holstein color berrendo rojo, ganadora del premio “Estrella de la raza 2016” de la Asociación Holstein de Estados Unidos. (11). .....	7
<b>Figura 2.</b> Mapa de población de ganado vacuno Holstein (número de cabezas) en el Perú (12). Obtenida del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) – IV Censo Nacional Agropecuario 2012.....	8
<b>Figura 3.</b> Producción Nacional de leche fresca de vaca desde el año 2002 hasta el año 2015 (19) .....	11
<b>Figura 4.</b> A) Organización genómica del locus de las caseínas. B) Organización estructural de las unidades de transcripción de las caseínas; las barras abiertas representan a los intrones. Los exones se representan mediante cajas grandes: las grises no se traducen, las negras codifican el péptido señal y las coloreadas codifican proteínas maduras. El tamaño de los exones se da en pares de bases, debajo de cada exón con su número indicado en la parte superior (modificado) (31).....	14
<b>Figura 5.</b> Ilustración de tres SNP que podrían encontrarse en la secuencia de un cromosoma (33). .....	16
<b>Figura 6.</b> Secuencia aminoacídica del exón VII del gen CSN2*A1 (43). .....	17
<b>Figura 7.</b> Diferencia en la secuencia aminoacídica de la beta-caseína A1 y A2 (3).....	18
<b>Figura 8.</b> Liberación del péptido BCM-7 (3).....	18
<b>Figura 9.</b> Representación gráfica de un patrón de electroforesis de RFLP de un genoma diploide (49).....	21
<b>Figura 10.</b> Diagrama ternario con la región de aceptación de la prueba de $X^2$ (56).....	24

<b>Figura 11.</b> Mapa de colecta de muestras biológicas de las poblaciones de estudio. Mapa generado en el programa QGIS 2.18. ....	27
<b>Figura 12.</b> Mapa de puntos de colecta de muestras biológicas de bovinos criollos del departamento de Apurímac. Mapa generado en el programa QGIS 2.18.....	28
<b>Figura 13.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído con solventes orgánicos (A) y un kit comercial (B) a partir de leucocitos de bovinos raza Holstein y bovinos criollos del departamento de Apurímac.....	39
<b>Figura 14.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído con solventes orgánicos (A) y un kit comercial (B) a partir de folículos pilosos de bovinos raza Holstein y bovinos criollos del departamento de Apurímac.....	39
<b>Figura 15.</b> Secuencia nucleotídica del fragmento amplificado del gen CSN2 que contiene el SNP rs43703011 representado por los alelos C/T.....	40
<b>Figura 16.</b> Electroforesis de ADN amplificado por PCR convencional con cebadores específicos para el SNP rs43703011 del gen CSN2 en gel de agarosa 2%. Fragmento de 121 pb carriles 1, 2, 3 y 4. Marcador de peso molecular carril M (50 pb). ....	40
<b>Figura 17.</b> Digestión virtual con la enzima DdeI en el programa de mapeo de restricciones en línea Restriction Mapper.....	41
<b>Figura 18.</b> Electroforesis de genotipos obtenidos del ensayo PCR-RFLP para el gen CSN2 de bovinos raza Holstein. Genotipos: CSN2*A1A1 carril 8, CSN2*A2A1 carriles 1, 2, 3, 4, 6, 7 y CSN2*A2A2 en el carril 5. Marcador de peso molecular carril M (50 pb).....	42
<b>Figura 19.</b> Electroforesis de fragmentos obtenidos de un ensayo PCR-RFLP para el gen CSN2 de bovinos criollos del departamento de Apurímac. Genotipos: CSN2*A2A1 carriles 1, 5, 7, 8, 17,	

18, 19 y CSN2\*A2A2 carriles 2, 3, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16. Marcador de peso molecular carril M (50 pb)..... 42

**Figura 20.** Porcentaje de cada genotipo del gen CSN2 en los bovinos de raza Holstein ..... 43

**Figura 21.** Porcentaje de cada genotipo del gen CSN2 en los bovinos criollos del departamento de Apurímac..... 43

**Figura 22.** Porcentaje para cada genotipo por población de estudio ..... 44

**Figura 233.** Diagrama ternario para los genotipos del SNP rs43703011 del gen CSN2 en las poblaciones de estudio..... 45



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	iii
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	x
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	3
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	3
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	3
<b>HIPÓTESIS</b> .....	4
<b>CAPÍTULO I</b> .....	5
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE .....	5
1.2. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN .....	6
1.3. BOVINOS RAZA HOLSTEIN .....	6
1.4. BOVINOS CRIOLLOS .....	9
1.5. PRODUCCIÓN LECHERA EN EL PERÚ.....	10

1.6. PROTEÍNAS DE LA LECHE .....	13
1.7. POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO ÚNICO.....	15
1.8. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO DE LA BETA CASEÍNA.....	16
1.9. LECHE TIPO A2.....	18
1.10. FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA .....	19
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>25</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	25
2.2. ÁREA DE ESTUDIO.....	25
2.3. MATERIALES.....	29
2.4. METODOLOGÍA.....	31
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>38</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>61</b>

## INTRODUCCIÓN

En el Perú, las poblaciones bovinas de raza Holstein son seleccionadas principalmente para producción lechera. Mientras que la población bovina criolla nacional es usada para triple propósito (leche, carne y trabajo) (1).

Según el Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI) antes llamado Ministerio de Agricultura y Riego; el 80% del ganado bovino nacional está en la sierra, estos animales fueron traídos por los españoles hace 450 años aproximadamente, desde entonces se recibieron aportes migratorios de otras razas como las Simmental, Normando, Shorthorn lechero, Jersey, Brown Swiss y Holstein. En la costa, la producción lechera se debe a razas especializadas, y en la selva a las razas cebú.

En contraste con el ganado de raza, el ganado criollo es de inferior estatura y peso; pero muy adaptados a las condiciones de la serranía peruana, tanto de alimentación, sanidad y ecología por selección natural. Según el MIDAGRI, los bovinos criollos deben ser la base de mejoramiento genético en cualquier programa de apoyo a la ganadería vacuna, especialmente a la de la sierra (2).

Las proteínas de la leche bovina se dividen en dos grupos principales: las séricas y las caseínas. En este último grupo se encuentra la beta-caseína (codificada por el gen *CSN2*) que está asociada a características productivas de interés en ganado bovino lechero. En este contexto, cabe mencionar que las formas más comunes de la beta-caseína en los bovinos lecheros son la A1 y la A2, como producto de la sustitución del aminoácido prolina (beta-caseína A2) por histidina (beta-caseína A1). Este tipo de mutación puntual, también llamado SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) se ha relacionado en países de Europa como promotor de malestares

gastrointestinales; esto cuando se consume leche bovina con beta-caseína A1 (3). Por otro lado, Nilsen et al. (4) concluyeron en su investigación que la beta-caseína A2 está asociada con una mayor producción de leche y porcentaje de proteína.

Por lo mencionado anteriormente, el presente estudio analizará los alelos A1 y A2 del SNP rs43703011 de poblaciones de bovinos raza Holstein y bovinos criollos del departamento de Apurímac mediante ensayos Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica, conocida como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). La evaluación del gen A2 de la beta caseína nunca se ha dado en Perú y encontrar una alta frecuencia de este alelo en los bovinos criollos de este trabajo sería un importante sustento para que el estado peruano invierta en preservar el recurso genético nacional, esta investigación puede ser la base de futuras investigaciones de este SNP en otras poblaciones bovinas del Perú para preparar al ganadero peruano para futuras demandas de consumo de leche A2.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de los alelos A1 y A2 del gen *CSN2* en bovinos de raza Holstein de la empresa LACTEA S.A. y en bovinos criollos del departamento de Apurímac.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar un protocolo de PCR-RFLP para la identificación de los alelos A1 y A2 del gen *CSN2* en las poblaciones de estudio.
2. Identificación de los genotipos homocigotos (A1A1/A2A2) y el genotipo heterocigoto (A1A2) en las poblaciones de estudio.
3. Determinar las frecuencias genotípicas para el gen *CSN2* en las poblaciones de estudio.
4. Determinar la frecuencia de los alelos A1 y A2 del gen *CSN2* en las poblaciones de estudio.
5. Comparar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen *CSN2* entre las poblaciones de estudio.

## HIPÓTESIS

Debido a que las vacas de alta producción lechera presentan mayormente el alelo A1 de la beta caseína en contraposición del alelo original A2, que es deseable para la salud humana, es posible que en las vacas criollas sea más frecuente el alelo A2 en contraste de las vacas de raza Holstein de la empresa ganadera LACTEA S.A.

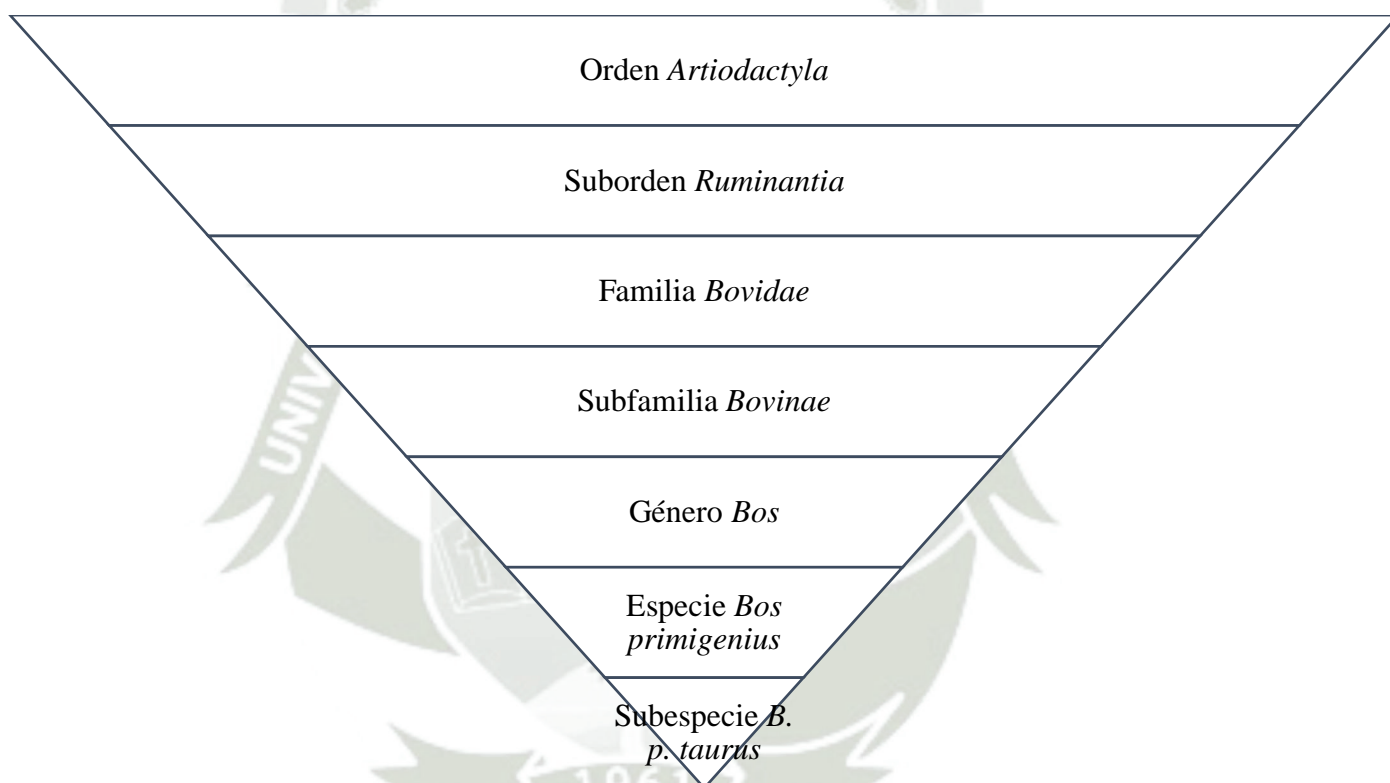


## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE

El *Bos taurus* se encuentra dentro de la siguiente clasificación zoológica (5):



Esta subespecie se encuentra mejor adaptada a zonas templadas y frías. Se caracteriza por no tener joroba; tienen una cabeza corta y ancha, cuello ancho, sus orejas redondeadas están en ángulo recto, sus cuernos son cortos y finos, su tórax es bien arqueado, el pecho es ancho y profundo, sus miembros son cortos y musculosos. La ubre de las hembras es grande, con base amplia y pezones desarrollados (5).

## 1.2. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

La domesticación del *Bos taurus* se dio en el periodo neolítico con el inicio de las actividades de agricultura y ganadería, y se convirtió en el animal más importante de esa época porque sirvió como suministro de alimento por su leche y carne; utilizaron el cuero como vestimenta, los cuernos y huesos como herramientas (6).

Esta subespecie migró desde Asia hacia Europa y llegó al continente americano a fines del siglo XIX; dando lugar a los bovinos criollos de la zona y a diferentes razas que se forjaron de acuerdo con las condiciones climatológicas y geográficas de las zonas donde se ubicaron. Aunado a esto, el hombre empezó a seleccionar su ganado de acuerdo con el propósito de producción, tales como: leche, carne, doble propósito o transporte (5).

## 1.3. BOVINOS RAZA HOLSTEIN

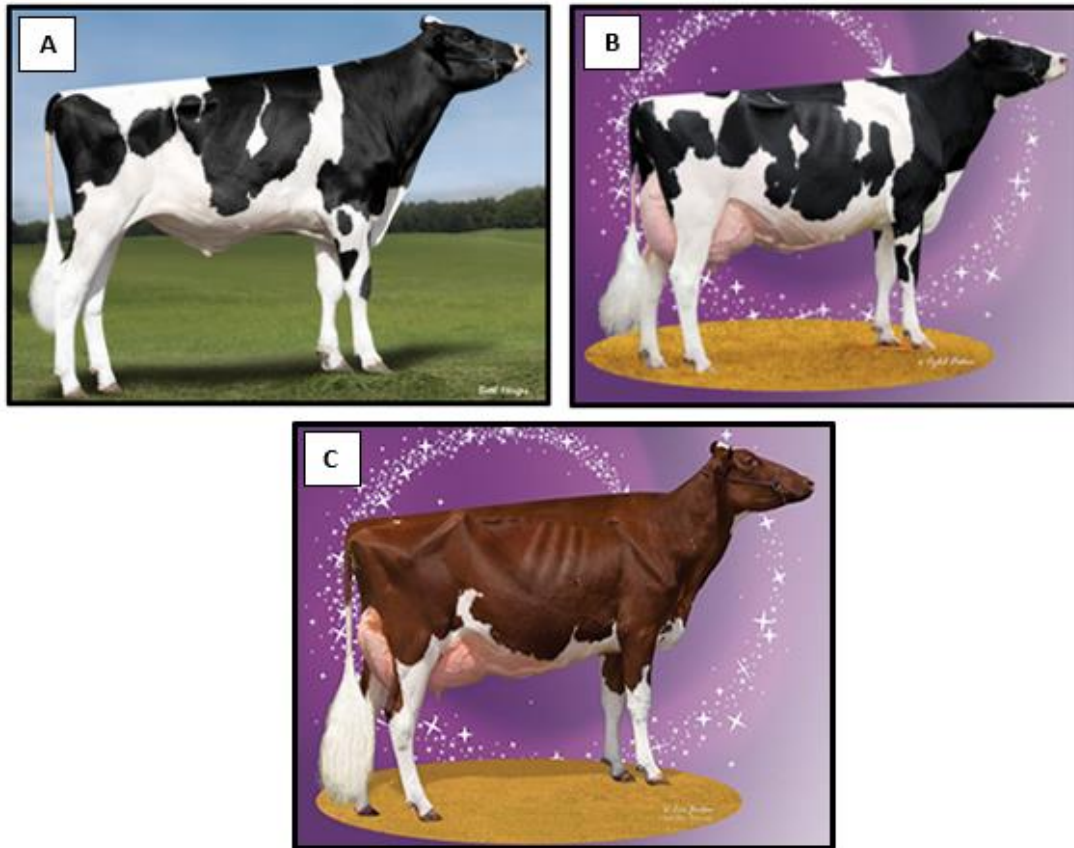
El concepto de raza está definido como un grupo de individuos con características morfológicas y fisiológicas propias que les permiten distinguirse de otros de su misma especie, estas características son transmisibles por generación (7).

La raza de ganado Holstein se originó principalmente en dos provincias de Holanda: Frisia y Holanda del Norte. Sus características han sido las más valoradas puesto que es la raza lechera más productiva. Por tal motivo, esta raza está siendo usada como máquina de producción lechera en varios países de cada continente; recibe diferentes denominaciones: En Estados Unidos es conocida como Holstein Friesian; en Gran Bretaña, British Friesian; en Nueva Zelanda y Australia, Friesian; en Francia, Pie Noire Hollandaise (8).

La inseminación artificial ha permitido el mejoramiento genético de la raza; tanto así que el 85% de los nacimientos son a consecuencia del uso de esta técnica, lo que ha llevado que esta

raza se encuentre en todos los continentes y en casi todos los países; evidencia de su superioridad genética causal de exportación y comercialización para hembras, sementales, semen y embriones congelados en más de 50 países para mejorar los hatos lecheros (9).

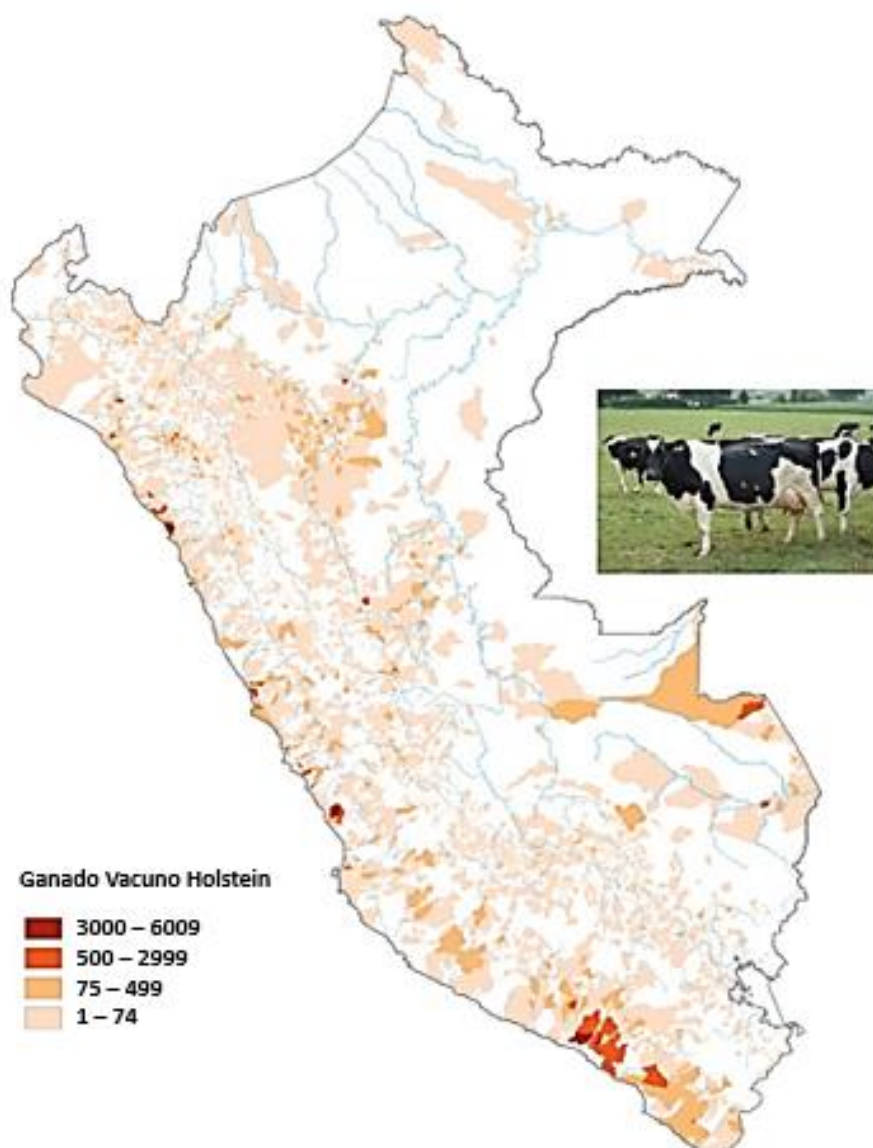
El pelaje de esta raza tiene dos variaciones: berrendo blanco con negro y berrendo blanco con rojo (color berrendo es un cuerpo que tiene manchas de color diferente al resto de la piel) (Figura 1). Tienen cuerpo anguloso y amplio, un cuello largo descarnado y su capacidad corporal es grande en comparación con su tamaño, la ubre es de gran capacidad, sus pezones son medianos y equidistantes (9).



**Figura 1.** A) Toro Holstein color berrendo negro, con la variante genética A2A2 del gen CSN2 (10). B) Vaca Holstein color berrendo negro, ganadora del premio “Estrella de la raza 2011” de la Asociación Holstein de Estados Unidos. C) Vaca Holstein color berrendo rojo, ganadora del premio “Estrella de la raza 2016” de la Asociación Holstein de Estados Unidos. (11).

Una vaca Holstein adulta en producción pesa aproximadamente 680 kg, y llega a producir hasta 6 000 L de leche por campaña (una campaña tiene 305 días de producción), con un porcentaje de 3.5% de grasa, en condiciones de estabulación (2). El 10.3% de la población total de ganado vacuno en el Perú es raza Holstein (Figura 2) (12).

**POBLACIÓN DE GANADO VACUNO HOLSTEIN**



**Figura 2.** Mapa de población de ganado vacuno Holstein (número de cabezas) en el Perú (12). Obtenida del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) – IV Censo Nacional Agropecuario 2012

#### 1.4. BOVINOS CRIOLLOS

Se llaman bovinos criollos a aquellos que descienden de las razas nativas ubicadas al sur de España y que se han habituado a las diferentes zonas geográficas del Perú (13).

*Primo AT*, menciona que estos animales fueron introducidos por los españoles al continente americano hace más de 500 años; ingresando por Santa Marta en Colombia hasta llegar a Venezuela y Perú, esparciéndose por Bolivia, Paraguay, Chile, Argentina y Uruguay; otra corriente ingresó por Brasil. Para el año 1524 los bovinos ya estaban presentes en todos los países de Sudamérica (14).

En las comunidades campesinas los bovinos criollos sirven como suministro de carne, leche, queso y fuerza de trabajo. Su valor genético está en su resistencia a enfermedades y en su capacidad de adaptación a difíciles condiciones geográficas y climatológicas (15).

El ganado criollo es de baja estatura y peso; pero bien aclimatado a las condiciones de la sierra, tanto en alimentación y sanidad, como a las condiciones ambientales. Esto debido a la selección natural (2).

El 85% de los bovinos que hay en nuestro país no tienen raza definida, gran parte de este porcentaje son bovinos criollos (16).

Actualmente, el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) es el encargado de preservar, conservar, caracterizar, documentar, coleccionar, investigar y monitorear la diversidad y variabilidad de estos animales mediante la conservación *ex situ* e *in situ* en nuestro país para que sea un recurso aprovechable y sustentable para el bien socioeconómico de los peruanos (17).

## 1.5. PRODUCCIÓN LECHERA EN EL PERÚ

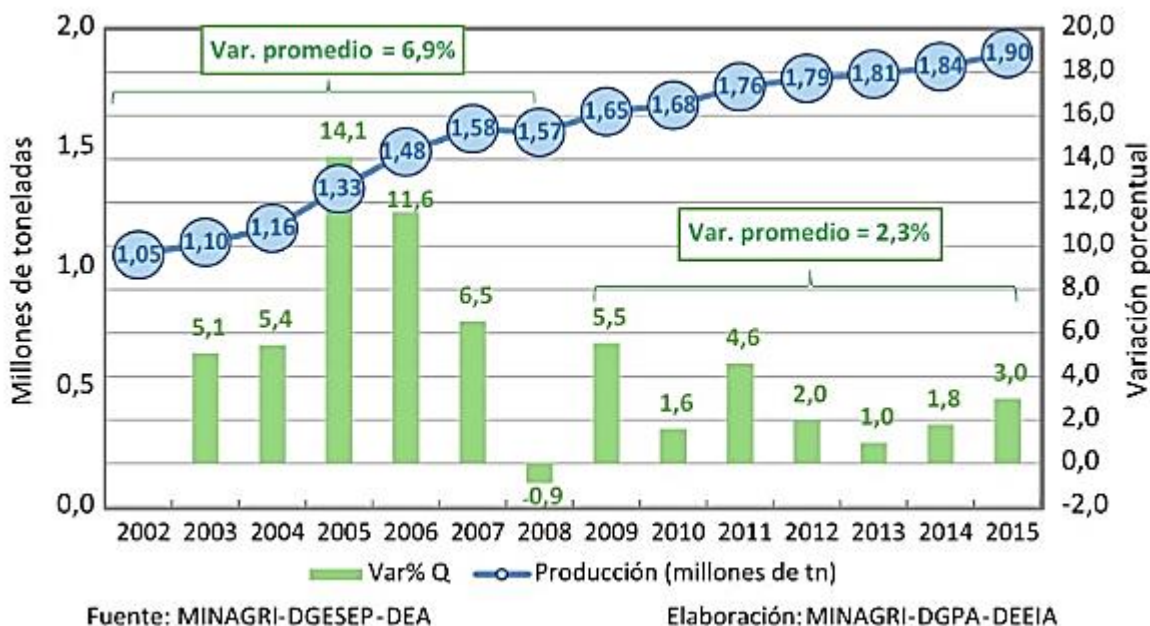
En el Perú, la actividad pecuaria dirigida hacia la producción lechera empieza en el siglo XIX y toma significativa importancia con la introducción de ganado lechero estadounidense tipo Holstein y Brown Swiss; esto como resultado de la creación de la Asociación de Ganaderos del Perú en 1915 (18). En 1946, la empresa Leche Gloria S.A. en cooperación con el Servicio Cooperativo Interamericano de Producción de Alimentos (SCIPA) es pionera en el uso de la inseminación artificial con semen fresco de reproductores importados de Estados Unidos y en la realización de trasplantes de embriones a fines de la década del 70 (18), durante estos años hubo diferentes cooperaciones internacionales que impulsaron la producción lechera en el país; sin embargo, la Reforma Agraria y el terrorismo provocaron una depreciación en esta actividad pecuaria en las décadas 80 y 90. Después de esta etapa, los conflictos sociales cesaron y la economía en el Perú empezó a estabilizarse aunado a esto se expandieron y reconstruyeron redes viales que permitieron acceder a la producción de las zonas rurales de modo que la producción lechera empezó a incrementarse nuevamente (2).

Desde el año 2002 se ha registrado un aumento anual en la producción nacional de leche fresca, llegando a producir 1,90 millones de toneladas para el año 2015 (Figura 3) (19).

El MIDAGRI ha reportado 2,12 millones de toneladas de producción lechera para el año 2019; Cajamarca aportó el 18.4%, Arequipa el 16.6% y Lima el 12.6%, estos departamentos son las principales cuencas lecheras del Perú. El departamento de Apurímac aportó solo el 1.6% a la producción nacional, según la Tabla 1 en esta región hubo un decrecimiento en la producción lechera desde el año 2009 hasta el 2018 (20).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) señala que el consumo de leche anual por persona debe de ser 120 kg; sin embargo, en el Perú cada persona consume aproximadamente 87 kg de leche anualmente (21).

El IV Censo Nacional Agropecuario del año 2012 (IV CENAGRO 2012) indica que los bovinos raza Holstein representan alrededor del 60% de la población bovina en los sistemas de producción lechera. Por otro lado, en nuestro país los bovinos criollos dan un mayor aporte significativo en la producción de carne que en leche; por este motivo, se trabaja en la mejora del manejo reproductivo para aumentar el rendimiento lechero del bovino criollo (2).



**Figura 3.** Producción Nacional de leche fresca de vaca desde el año 2002 hasta el año 2015 (19)

*Tabla 1. Producción de leche fresca de vaca según región, 2009 – 2018 (toneladas).*

Región	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
<b>Total nacional</b>	<b>1 652 112</b>	<b>1 678 372</b>	<b>1 755 529</b>	<b>1 790 670</b>	<b>1 807 806</b>	<b>1 840 226</b>	<b>1 903 177</b>	<b>1 954 232</b>	<b>2 013 310</b>	<b>2 066 125</b>
<b>Tumbes</b>	517	568	601	651	790	692	659	409	412	358
<b>Piura</b>	37 152	31 497	43 867	47 125	47 581	50 081	41 556	42 578	37 240	41 316
<b>Lambayeque</b>	36 814	39 517	37 262	39 291	45 080	49 837	53 136	59 215	55 426	56 242
<b>La Libertad</b>	98 524	100 618	113 502	116 710	118 937	121 501	125 366	129 501	132 475	135 819
<b>Cajamarca</b>	304 884	303 449	310 629	318 594	324 862	323 687	345 029	352 076	360 200	369 983
<b>Amazonas</b>	75 111	75 125	74 369	76 184	80 358	76 093	79 208	83 366	93 894	97 640
<b>Ancash</b>	16 439	16 921	16 803	17 356	16 635	17 456	15 271	15 749	16 107	18 170
<b>Lima</b>	286 719	306 876	322 678	318 263	329 311	335 970	342 846	348 518	272 292	277 119
<b>Ica</b>	27 723	30 278	32 109	35 609	43 361	48 046	51 005	57 139	64 979	66 143
<b>Huánuco</b>	35 854	39 413	40 474	44 517	39 187	38 576	42 249	44 955	48 243	49 492
<b>Pasco</b>	18 021	18 178	18 249	25 461	24 602	24 127	26 339	25 296	32 145	31 232
<b>Junín</b>	27 223	31 111	39 435	42 385	46 276	46 710	47 870	51 250	52 094	53 135
<b>Huancavelica</b>	15 876	17 193	20 183	24 180	22 443	22 555	24 890	20 916	21 810	23 675
<b>Arequipa</b>	387 317	355 013	363 668	352 406	315 380	325 253	335 534	348 889	353 749	363 930
<b>Moquegua</b>	15 123	15 262	15 212	14 737	17 539	16 273	15 891	16 222	16 648	16 966
<b>Tacna</b>	25 892	26 224	26 356	24 983	25 138	25 042	23 487	23 610	23 406	23 452
<b>Ayacucho</b>	40 950	43 482	50 138	51 424	50 147	51 788	47 122	45 151	57 449	56 910
<b>Apurímac</b>	42 248	42 392	40 770	33 104	32 122	32 593	32 659	32 365	32 468	32 982
<b>Cusco</b>	50 955	68 452	65 242	77 621	93 148	95 633	104 016	102 458	102 227	106 028
<b>Puno</b>	71 047	76 907	79 038	85 032	91 287	95 416	106 953	110 465	114 671	119 855
<b>San Martín</b>	27 399	29 321	32 955	32 037	31 344	31 341	31 038	32 811	33 764	34 990
<b>Loreto</b>	2 414	2 527	3 181	2 767	2 533	2 437	2 280	2 144	2 198	1 637
<b>Ucayali</b>	4 806	4 986	5 081	4 921	4 908	4 910	5 119	7 340	6 399	2 818
<b>Madre de Dios</b>	3 054	3 063	3 726	4 214	4 839	4 210	3 653	1 808	1 522	1 526

Fuente: Direcciones Regionales de Agricultura, elaborado por DGESEP-DEA, MIDAGRI (2017c)

## 1.6. PROTEÍNAS DE LA LECHE

La leche bovina se considera un alimento con alto valor nutricional porque es una fuente de proteínas de alto valor biológico que suministran los aminoácidos esenciales para el ser humano. Tras la digestión de las proteínas se liberan péptidos con propiedades diferentes a la proteína entera; estos péptidos intervienen en el sistema cardiovascular, nervioso, digestivo e inmune (22–24)

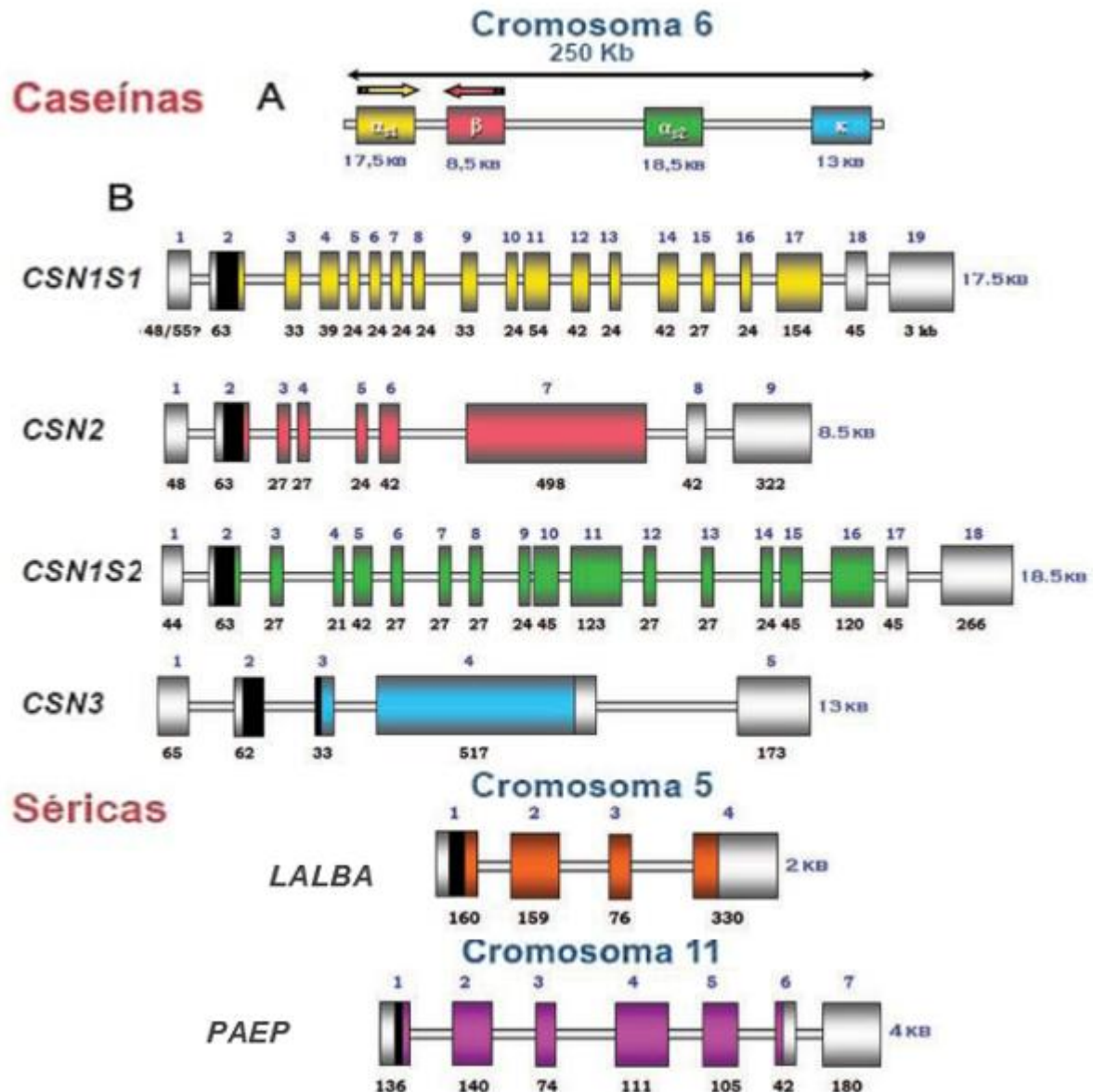
El resultado de la interacción de la genética del animal con el ambiente en que se encuentra influye en el rendimiento lechero, el cual es la relación que hay entre la cantidad de leche producida y su calidad; la concentración de la proteína en la leche del ganado bovino es de aproximadamente 3.5%, puede variar ligeramente entre razas y esto es de mucho interés en la industria láctea, así como para los consumidores (25).

En la leche encontramos dos grupos de proteínas clasificados por su comportamiento en un pH de 4.6; la parte soluble conformado por proteínas séricas y el precipitado conformado por caseínas (26,27).

En la Figura 4, se observan los dos tipos de proteínas que hay en la leche: las séricas y las caseínas. Las caseínas constituyen un 80% de la proteína total, las cuales son la alfa-caseína S1, alfa-caseína S2, beta-caseína y la kappa-caseína; estas caseínas son codificadas por los genes *CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2* y *CSN3*, respectivamente y se agrupan en el cromosoma 6 (28). El otro grupo que constituye un 20% del total son las proteínas séricas, la alfa-lactoalbúmina ( $\alpha$ -LA) codificada por el gen *LALBA* ubicado en el cromosoma 5 y la beta-lactoglobulina ( $\beta$ -LG) codificada por el gen *PAEP* ubicado en el cromosoma 11 comprenden entre el 70 y 80% de las

proteínas séricas y el resto está conformado por las inmunoglobulinas, seroalbúmina, lactoferrina, lactoperoxidasa y proteasa peptonas (29,30).

Los genes de las proteínas de la leche tienen variaciones genéticas que están relacionadas con las características productivas de la leche y sus valores nutricionales (31).



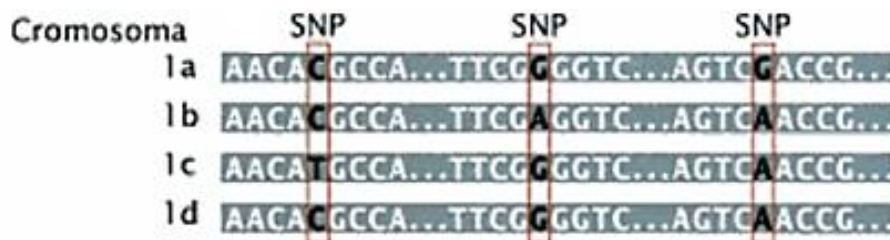
**Figura 4.** A) Organización genómica del locus de las caseínas. B) Organización estructural de las unidades de transcripción de las caseínas; las barras abiertas representan a los intrones. Los exones se representan mediante cajas grandes: las grises no se traducen, las negras codifican el

*péptido señal y las coloreadas codifican proteínas maduras. El tamaño de los exones se da en pares de bases, debajo de cada exón con su número indicado en la parte superior (modificado) (31).*

### **1.7. POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO ÚNICO**

Se llama polimorfismo de nucleótido único o también conocido por su sigla en inglés SNP (*Single Nucleotide Polimorfism*) a la variación de un nucleótido en una ubicación puntual en el genoma de una especie, estos SNP surgen de una variación genética simple en un determinado cromosoma y luego se transmite por herencia mendeliana hasta propagarse en una población. Estas variaciones genéticas son abundantes y se encuentran en todo el genoma; en una misma región del genoma de dos individuos se puede hallar un SNP cada 1000 pb. Los SNP debe tener una frecuencia mayor al 1% entre miembros de una especie para que sea considerada un polimorfismo de nucleótido único, hay polimorfismos que son propios de una población. En la Figura 5, se observa la secuencia de un cromosoma donde la variación de una base nitrogenada representa cada SNP que podría encontrarse en una población (32,33).

Es más común que estas variaciones se den entre purinas (A y G) o pirimidinas (T y C) y con menos frecuencia entre una purina y una pirimidina. Estos polimorfismos se pueden ubicar en regiones codificantes y regiones no codificantes, aquellos que no estén en una secuencia codificante no alterarán la composición de aminoácidos de una proteína. Por otro lado, si el SNP se ubica en una región codificante, se podrá clasificar en SNP sinónimo o no sinónimo. Los SNP sinónimos no afectan la secuencia de una proteína mientras que el segundo tipo sí, codificando un aminoácido alterno al original (34,35).



**Figura 5.** Ilustración de tres SNP que podrían encontrarse en la secuencia de un cromosoma (33).

### 1.8. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO DE LA BETA CASEÍNA

La beta-caseína, presentada en adelante con su sigla *CSN2*, es la proteína láctea con más variaciones genéticas, teniendo un total de 13 alelos: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G. Las formas más frecuentes de la beta-caseína en los bovinos lecheros son la A1 y la A2, la B es poco común, la A3 y C son raras. La posición de un nucleótido cambia y codifica aminoácidos diferentes en los alelos. En la Figura 6, se presenta la secuencia aminoacídica del exón VII del gen *CSN2\*A1* y en la Figura 7, se aprecia la sustitución del aminoácido que causa el polimorfismo (cCt→cAt) en el codón 67 del gen de la beta-caseína: prolina (beta-caseína A2) por histidina (beta-caseína A1) (36–38).

El gen *CSN2* influye en la producción de la leche, porcentaje de grasa y porcentaje de proteína, los mejores resultados para estas características han sido relacionados con el genotipo homocigoto A2A2. Por otro lado, el gen *CSN2\*A1* ha sido asociado con la incidencia de diabetes mellitus tipo 1, enfermedad coronaria, autismo, entre otras enfermedades (39,40).

Los efectos dañinos de la ingesta de leche se han relacionado con unos péptidos que se encuentran en la leche, liberados tras la proteólisis de la beta-caseína A1, puesto que es más fácil de hidrolizar por las enzimas digestivas y esto se debe a la débil unión entre la histidina y la isoleucina. Como se observa en la Figura 8 producto de esta proteólisis se da la liberación del

péptido beta casomorfina 7 (BCM-7) que está constituido por 7 aminoácidos; es decir, es un heptapéptido y está ubicado en la posición 60 – 66 de la beta-caseína en bovinos. Este péptido es el principal objeto de estudio en varias investigaciones por estar asociado con procesos inflamatorios. Por el contrario, en la beta caseína A2, la prolina está fuertemente unida a la isoleucina y no hay liberación del péptido BCM-7 (3,41,42).

*Bahattin, et al.* Mencionan que en el norte de América y de Europa la frecuencia del alelo A1 es muy alta en bovinos de raza Holstein (mayor al 90%) pero en bovinos Holstein de Alemania el alelo con mayor frecuencia es el A2 (mayor al 97%).

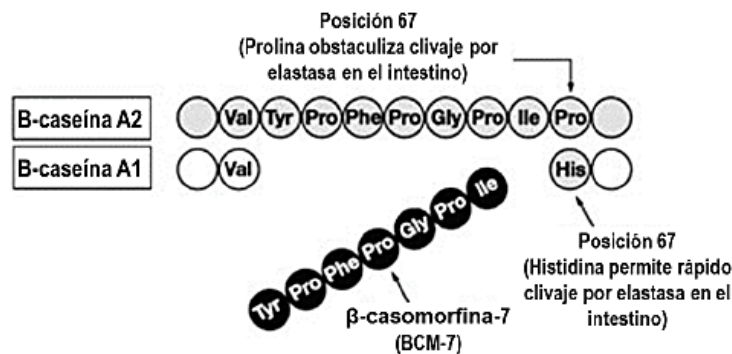
```

GAATTATGTTTTAAAAAGAGGAGGATAATTCATCATGAATAACAATTATAACTGGATTATGGACTCAAAGATTTGTTTTTC
6300          EXON VII                               6350
CTTCTTCCAG GAT GAA CTC CAG GAT AAA ATC CAC CCC TTT GCC CAG ACA CAG TCT CTA GTC
          Asp Glu Leu Gln Asp Lys Ile His Pro Phe Ala Gln Thr Gln Ser Leu Val
          6400
TAT CCC TTC CCT GGA CCC ATC CAT AAC AGC CTC CCA CAA AAC ATC CCT CCT CTT ACT CAA
Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile His Asn Ser Leu Pro Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln
          6450
ACC CCT GTG GTG GTG CCG CCT TTC CTT CAG CCT GAA GTA ATG GGA GTC TCC AAA GTG AAG
Thr Pro Val Val Val Pro Pro Phe Leu Gln Pro Glu Val Met Gly Val Ser Lys Val Lys
          6500
GAG GCT ATG GCT CCT AAG CAC AAA GAA ATG CCC TTC CCT AAA TAT CCA GTT GAG CCC TTT
Glu Ala Met Ala Pro Lys His Lys Glu Met Pro Phe Pro Lys Tyr Pro Val Glu Pro Phe
          6550
ACT GAA AGC CAG AGC CTG ACT CTC ACT GAT GTT GAA AAT CTG CAC CTT CCT CTG CCT CTG
Thr Glu Ser Gln Ser Leu Thr Leu Thr Asp Val Glu Asn Leu His Leu Pro Leu Pro Leu
6600
CTC CAG TCT TGG ATG CAC CAG CCT CAC CAG CCT CTT CCT CCA ACT GTC ATG TTT CCT CCT
Leu Gln Ser Trp Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val Met Phe Pro Pro
          6700
CAG TCC GTG CTG TCC CTT TCT CAG TCC AAA GTC CTG CCT GTT CCC CAG AAA GCA GTG CCC
Gln Ser Val Leu Ser Leu Ser Gln Ser Lys Val Leu Pro Val Pro Gln Lys Ala Val Pro
          6750
TAT CCC CAG AGA GAT ATG CCC ATT CAG GCC TTT CTG CTG TAC CAG GAG CCT GTA CTC GGT
Tyr Pro Gln Arg Asp Met Pro Ile Gln Ala Pro Gln Leu Tyr Gln Glu Pro Val Leu Gly
          6800          INTRON VII
CCT GTC CGG GGA CCC TTC CCT ATT ATT GTAAGTCTAAATTTACTAACTGTGCCTGTTTAACTTCTGATGTT
Pro Val Arg Gly Pro Phe Pro Ile Ile
    
```

**Figura 6.** Secuencia aminoacídica del exón VII del gen CSN2\*A1 (43).



*Figura 7. Diferencia en la secuencia aminoacídica de la beta-caseína A1 y A2 (3).*



*Figura 8. Liberación del péptido BCM-7 (3).*

### 1.9. LECHE TIPO A2

Se le llama leche A2, a la leche que es obtenida a partir de bovinos que tienen el genotipo homocigoto A2A2 en el gen CSN2 (44). La mayoría de los mamíferos incluyendo a los humanos producen leche con la beta-caseína A2 (42,45).

En el año 2000 se funda en Nueva Zelanda la compañía pionera a2 Milk™ con el fin de dedicarse a la producción y exportación de leche A2; extendiéndose hasta países como Australia, China y Estados Unidos. Esta compañía señala que la leche que venden difiere a la leche convencional porque proviene de vacas que han pasado por una selección genética natural para producir leche que contenga únicamente la beta-caseína A2. Alegan también que profesionales de

la salud y muchos de sus consumidores que tenían problemas digestivos reportaron que han experimentado beneficios cuando optaron por consumir la leche a2 Milk™ (46).

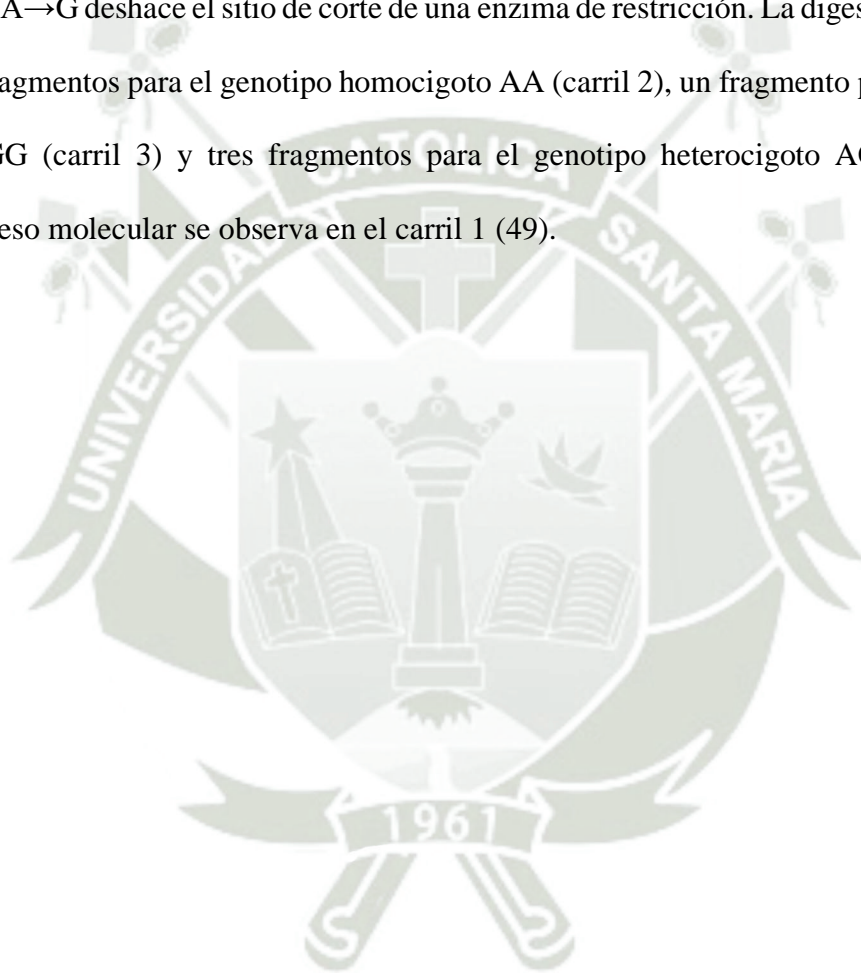
Por otro lado, la compañía Nestlé ha hecho contratos con productores argentinos que tienen certificación de producción de leche A2 para exportarla a los países donde a2 Milk™ ya se ha posicionado; esto debido a que los consumidores de estos países ya están enterados de los beneficios que significa el consumo de leche A2. Sin embargo, la compañía también tiene proyectado la venta de productos con leche A2 en el mercado argentino, para esto Nestlé requiere que cada bovino tenga su estudio genético para que se realice un ordeño y acopio diferenciado de las vacas que no producen leche A2 (45,47).

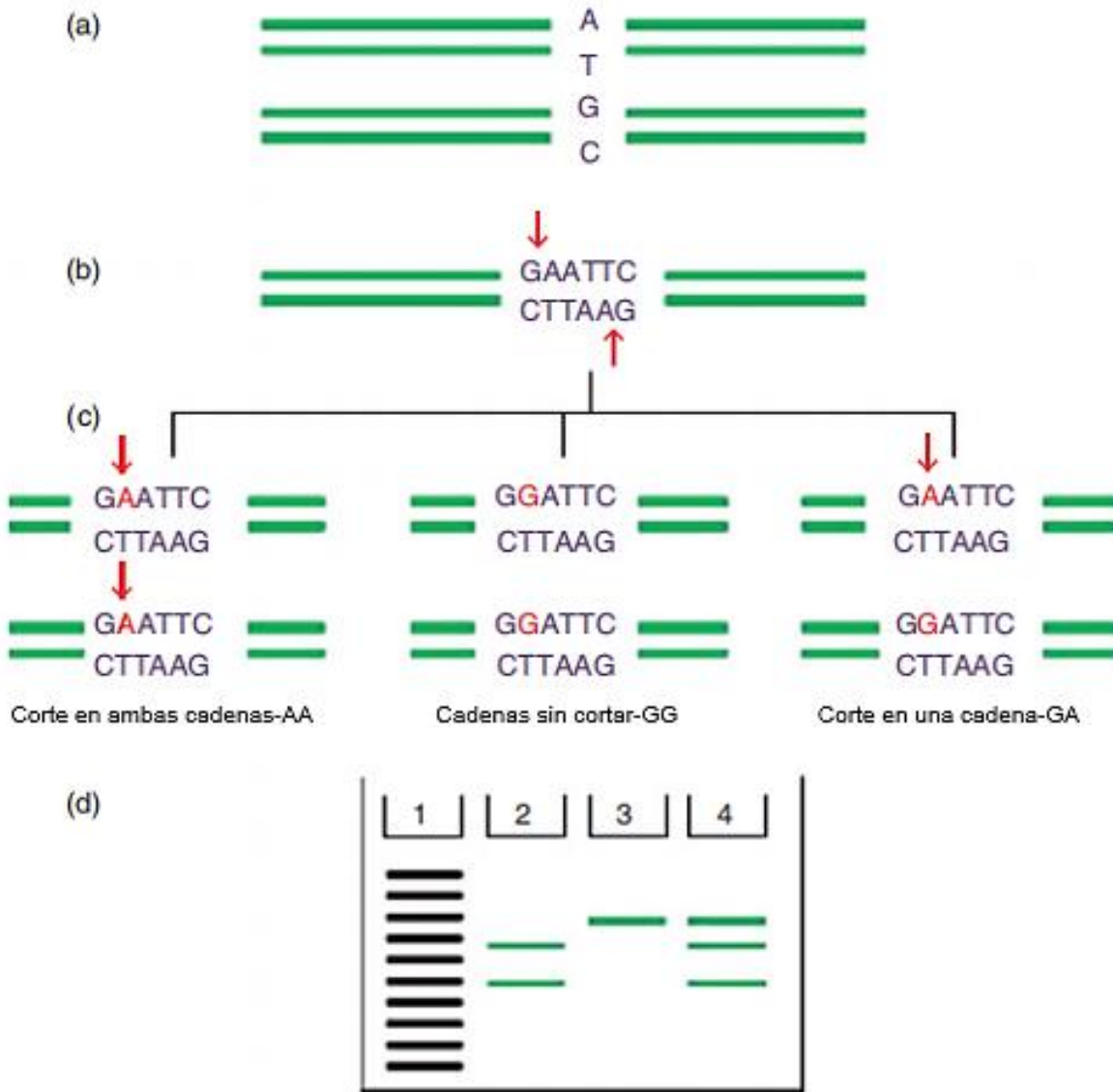
#### **1.10. FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA**

Esta técnica de la biología molecular también llamada RFLP por sus siglas en inglés, es usada para detectar cambios de nucleótidos en secuencias homólogas de ADN. Para esto, se usan enzimas de restricción que debido a su especificidad reconocen sitios puntuales en la cadena doble ADN para realizar cortes, las zonas reconocidas por la enzima se conocen como regiones de restricción (48).

Secuencias completas de ADN, plásmidos genómicos o el producto de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se incuban por un tiempo y temperatura establecidos con las enzimas de restricción; cuando la enzima de restricción realiza un corte genera fragmentos de longitudes determinadas. Estos fragmentos se separan de acuerdo con su tamaño por electroforesis en geles de acrilamida o agarosa, para visualizarlos se debe emplear colorantes capaces de teñir el ADN (49–51).

Esta es una técnica económica, esto permite realizar estudios poblacionales de detección y genotipado de SNP. Si el SNP genera o deshace una región de restricción para una enzima, se puede detectar con la amplificación de esa región del ADN mediante PCR y luego el producto de PCR se digiere con la enzima de restricción (PCR-RFLP). En la Figura 9, se aprecia la representación de un patrón de electroforesis de RFLP de un genoma diploide, donde hay el cambio del nucleótido A→G deshace el sitio de corte de una enzima de restricción. La digestión enzimática produce dos fragmentos para el genotipo homocigoto AA (carril 2), un fragmento para el genotipo homocigoto GG (carril 3) y tres fragmentos para el genotipo heterocigoto AG (carril 4); el marcador de peso molecular se observa en el carril 1 (49).





**Figura 9.** Representación gráfica de un patrón de electroforesis de RFLP de un genoma diploide (49).

### 1.11. EQUILIBRIO HARDY – WEINBERG

Se dice que una población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg cuando es numerosa, donde no hay migración, mutación genética ni selección natural, y todos los individuos poseen igual probabilidad de aparearse, es decir que el apareamiento es al azar, por lo tanto, las

frecuencias genotípicas observadas en la generación parental serán igual a las frecuencias genotípicas esperadas en la generación filial. Se demuestra que una población está o no en equilibrio de Hardy Weinberg determinando las frecuencias de los genotipos a partir de las frecuencias de los alelos (52,53).

Por ejemplo, si se está estudiando los alelos  $p$  y  $q$  de un gen  $X$ , se puede hallar la frecuencia alélica de  $p$  a través de la siguiente ecuación:

*Ecuación 1*

$$p = \frac{(2 \times PP) + PQ}{2 \times total}$$

Donde  $PP$  es el conteo del genotipo homocigoto para el alelo  $p$  y  $PQ$  es el conteo del genotipo heterocigoto  $PQ$ .

Luego, la frecuencia genotípica se calcula a partir de la ecuación del binomio al cuadrado, la suma de frecuencias será 1:

*Ecuación 2*

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Después, se desarrolla la prueba estadística de chi cuadrado ( $X^2$ ) hallando un  $X^2$  calculado y un  $X^2$  tabulado, esta prueba es una medida estadística para la diferencia entre las frecuencias observadas y esperadas. Mientras más grande el valor de  $X^2$  más grande es la diferencia y se establecen dos hipótesis:

Hipótesis nula: La población se encuentra en equilibrio.

Hipótesis alternativa: La población no se encuentra en equilibrio.

La prueba de  $X^2$  para el equilibrio Hardy Weinberg asume la hipótesis nula. Para hallar el  $X^2$  calculado se usa la ecuación:

*Ecuación 3*

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

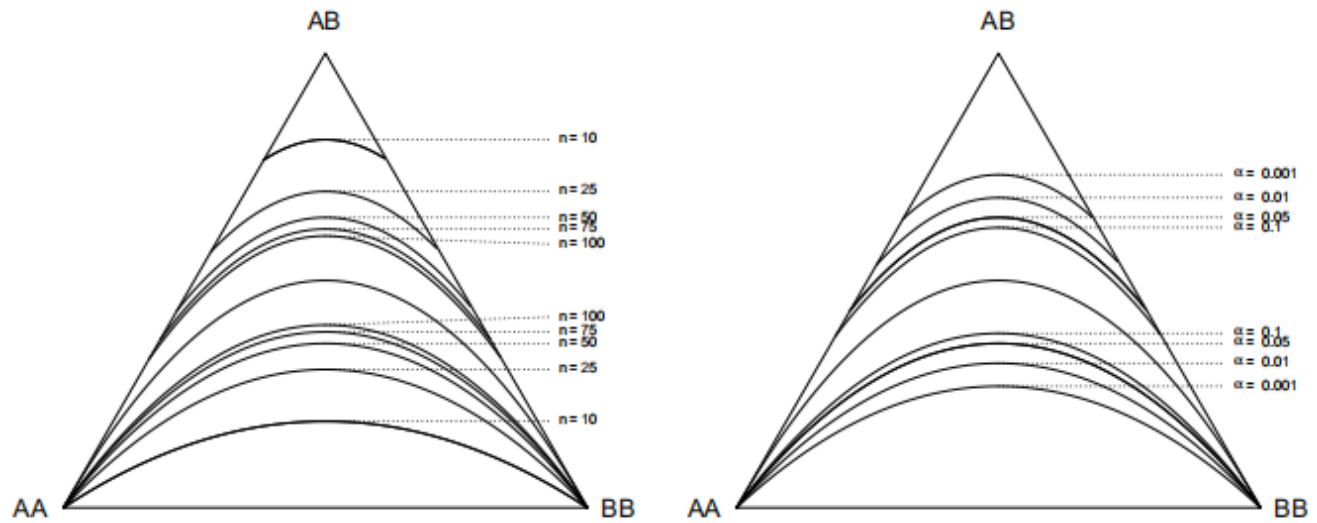
Donde  $O$  es la frecuencia genotípica observada y  $E$  la frecuencia genotípica esperada.

Para hallar el  $X^2$  tabulado en la tabla de valores críticos de distribución; se determina los grados de libertad (número de genotipos menos el número de alelos) y el nivel de confianza.

A través del valor de probabilidad  $P$  se evalúa la significancia del  $X^2$ , mayormente se da un 5% de margen de error; es decir un valor  $P$  de 0.05. Así queda un 95% de probabilidad que la diferencia entre las frecuencias observadas y esperadas sea real.

Entonces si el  $X^2$  calculado es mayor que el  $X^2$  tabulado ( $P < 0.05$ ) quiere decir que hay diferencia significativa, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Si el  $X^2$  calculado es menor que el  $X^2$  tabulado ( $P > 0.05$ ) quiere decir que no hay diferencia significativa, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa (54,55).

Los análisis estadísticos mencionados pueden ser graficados, la composición genotípica de una población se puede representar en un diagrama ternario juntamente con los límites de aceptación del equilibrio de Hardy Weinberg. En la Figura 10, se muestra en el panel izquierdo la región de aceptación en función del tamaño de muestra  $n$  con significancia de 0.05 y en el panel derecho se muestra la región de aceptación en función al nivel de significancia con  $n = 50$ . (56).



*Figura 10. Diagrama ternario con la región de aceptación de la prueba de  $X^2$  (56).*



## CAPÍTULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del Instituto Nacional de Innovación Agraria – Sede Central, Lima.

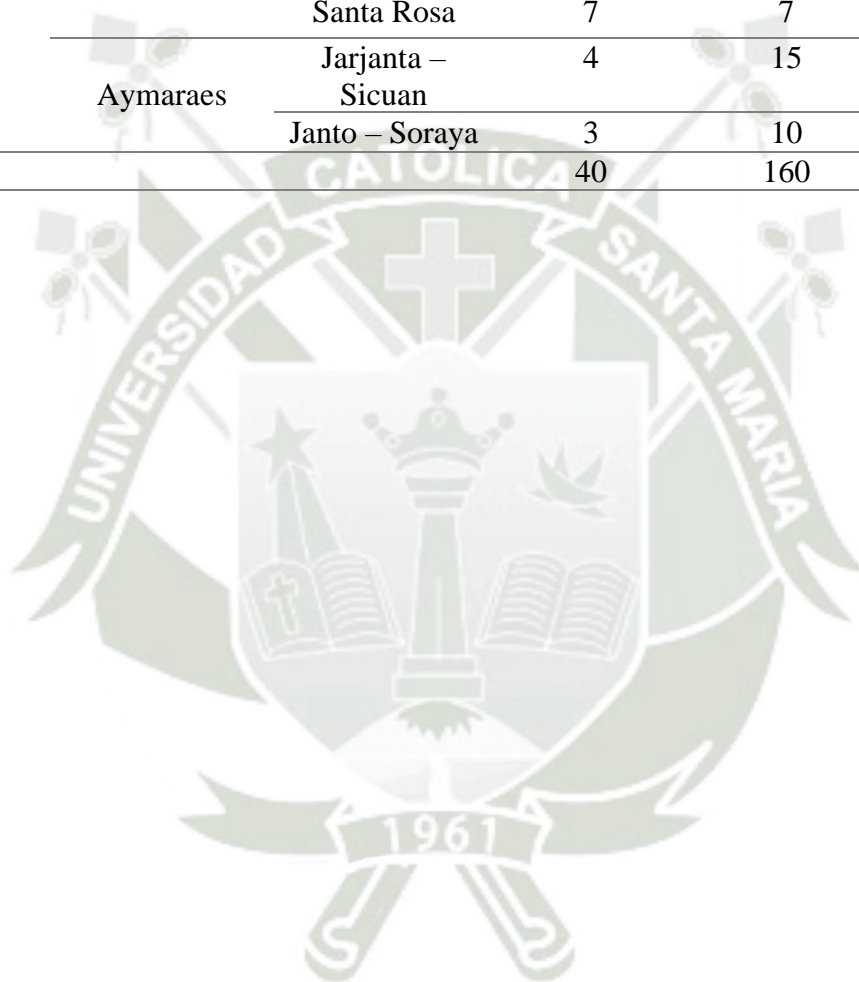
#### 2.2. ÁREA DE ESTUDIO

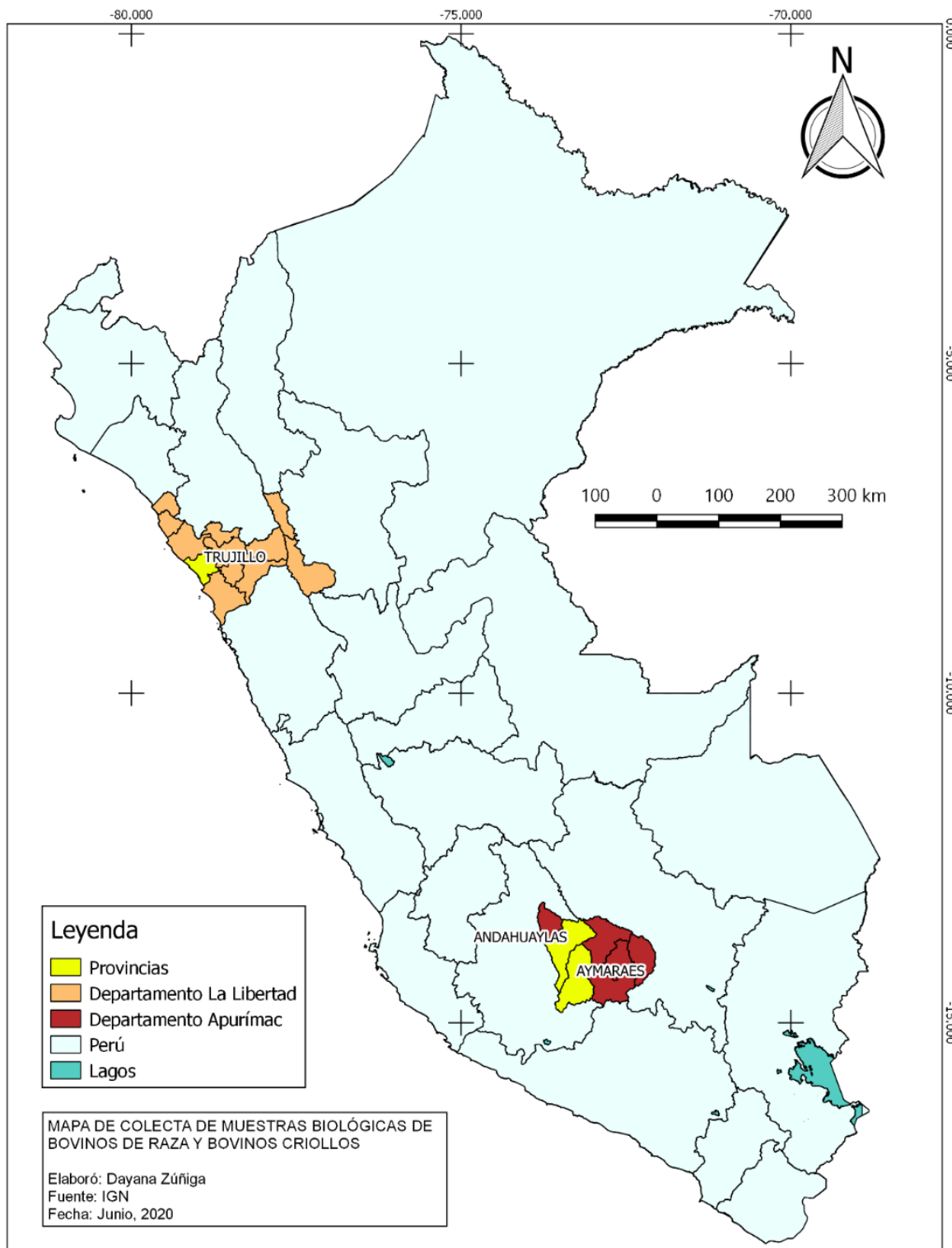
En el mes de noviembre del año 2018, se colectaron muestras biológicas de 102 bovinos raza Holstein de la empresa ganadera LACTEA S.A. ubicada en la ciudad de Trujillo en el departamento de La Libertad (Figura 11). Adicionalmente, en el año 2019, se colectaron al azar muestras biológicas de 98 bovinos criollos en el departamento de Apurímac (Figura 12) pertenecientes a dos provincias Andahuaylas y Aymaraes (Anexo II).

En la Tabla 2 se observa el número de individuos muestreados en las provincias de Trujillo, Andahuaylas y Aymaraes.

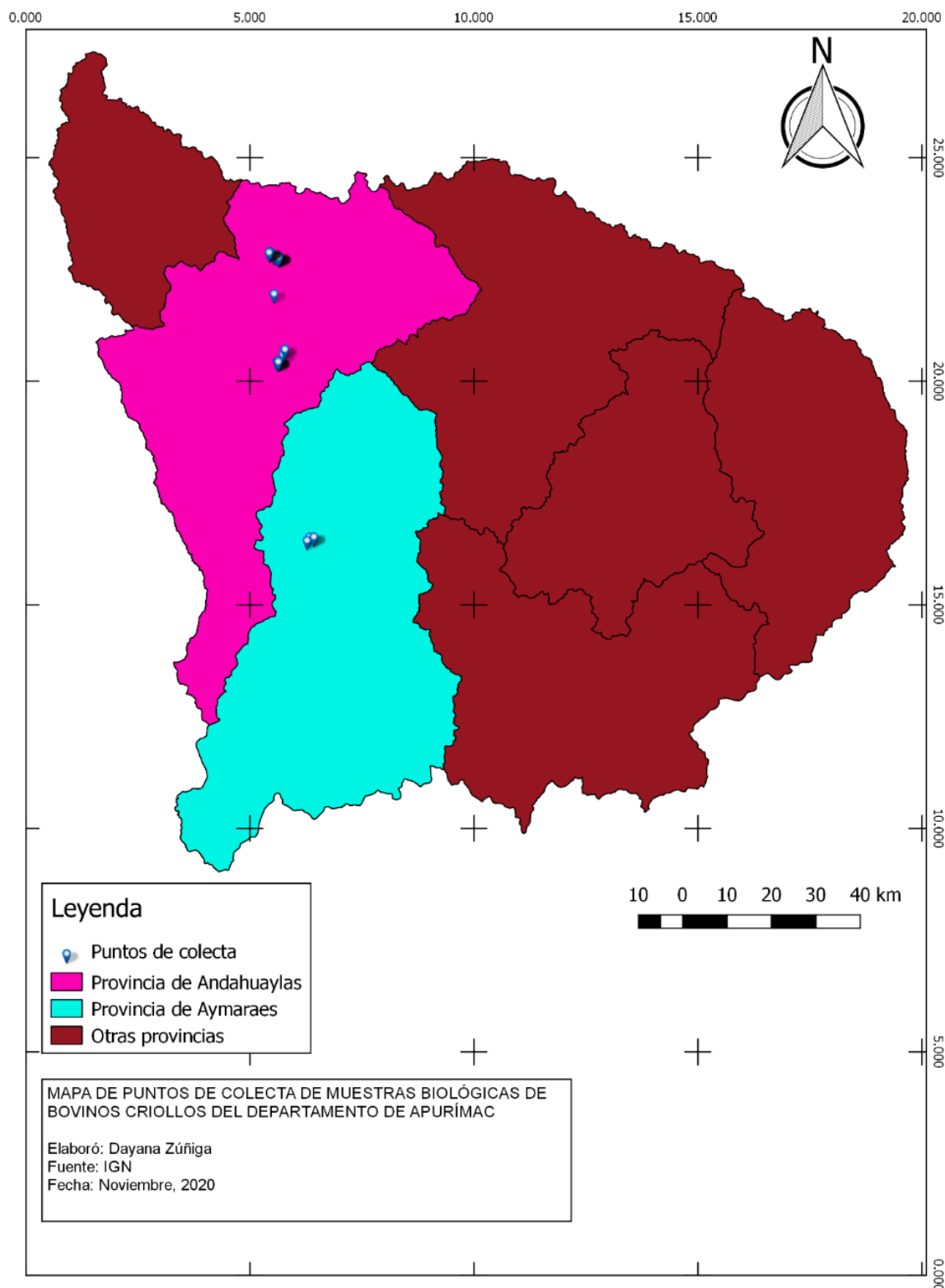
**Tabla 2.** Número de individuos muestreados por área de estudio

Poblaciones	Provincia	Comunidad	Machos	Hembras	Total
<b>Bovinos raza Holstein</b>	Trujillo	-	12	90	102
<b>Bovinos criollos del departamento de Apurímac</b>	Andahuaylas	Huaraccopata	2	11	13
		Checche	0	9	9
		Ñahuimpuquio	1	2	3
	Aymaraes	Pucullococha	11	16	27
		Santa Rosa	7	7	14
		Jarjanta – Sicuan	4	15	19
		Janto – Soraya	3	10	13
<b>Total</b>			40	160	200





**Figura 11.** Mapa de colecta de muestras biológicas de las poblaciones de estudio. Mapa generado en el programa QGIS 2.18.



*Figura 12. Mapa de puntos de colecta de muestras biológicas de bovinos criollos del departamento de Apurímac. Mapa generado en el programa QGIS 2.18*

## 2.3. MATERIALES

### Muestras biológicas

- Sangre de bovinos raza Holstein
- Sangre de bovinos criollos del departamento de Apurímac
- Mechones de pelo con folículo piloso de bovinos raza Holstein
- Mechones de pelo con folículo piloso de bovinos criollos del departamento de Apurímac

### Materiales de campo

- Tubos Vacutest® con EDTA K2
- Agujas BD Vacutainer®
- Capuchones plásticos para tubos al vacío
- Jeringas
- Bolsas con cierre hermético
- GPS (GARMIN)
- Fichas de colecta

### Reactivos e insumos de laboratorio

- Etanol 70%
- Etanol absoluto
- Isopropanol
- Cloroformo: alcohol isoamílico (proporción 24:1)
- Tampón TE (proporción 20:5)
- Tampón TBE 1X

- SDS 10%
- Tampón de carga Sal B 2X (azul de bromofenol, xileno cianol, naranja G, sucrosa)
- Gel Red®
- Agarosa
- Tubos para microcentrífuga
- Puntas para micropipeta
- Placas para PCR
- Marcador de peso molecular para ADN
- Enzimas de restricción
- Cebadores específicos para las variaciones genéticas de estudio

#### **Equipos e instrumentos de laboratorio**

- Balanza de precisión (Sartorius)
- Termobloque (Eppendorf)
- Microcentrífuga con refrigeración (Eppendorf)
- Microcentrífuga (miniSpin Eppendorf)
- Termociclador en tiempo final (Eppendorf)
- Cámara de electroforesis
- Transiluminador UV Chemic XR (BIO-RAD)
- Fotodocumentador (BIO-RAD)
- Vórtex (Labnet)
- Mezclador (Eppendorf)
- Cabina de bioseguridad para PCR (Aura PCR BIOAIR)

- Cámara de flujo laminar
- Cámara de extracción de gases
- Espectrofotómetro (Epoch BioTek)
- Micropipetas de 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L

## 2.4. METODOLOGÍA

### 2.4.1. Colecta de muestras biológicas

Para las muestras de sangre se limpió con alcohol yodado el área de punción (vena caudal de la cola), y se colectó 6 mL de sangre por cada individuo en tubos Vacutest® con EDTA K2 (anticoagulante) rotulados correctamente.

Para la obtención de mechones de pelo con folículo piloso de cada individuo se limpió el área de la cola en la parte superior de la borla, luego se enrolló un mechón de 40 a 50 pelos alrededor de los dedos lo más cerca posible a la piel para asegurarse de obtener la raíz y se tiró fuertemente. Por último, el mechón de pelo se sujetó con cinta adhesiva y se introdujo en una bolsa con cierre hermético, se identificó y selló correctamente.

### 2.4.2. Extracción de ADN a partir de muestras biológicas

#### 2.4.2.1. Muestras de sangre

Para la obtención de leucocitos se siguió el siguiente procedimiento: los tubos Vacutest® que contenían las muestras de sangre colectadas se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 minutos para separar los componentes sanguíneos. La interfase de cada muestra se colocó en tubos de microcentrífuga y se procedió a lavar con 500  $\mu$ L de tampón Tris-EDTA (TE, proporción 20:5,

pH 8.0) repetidas veces hasta que se obtuvo un precipitado de leucocitos libre de glóbulos rojos y se almacenó en cajas criogénicas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

**a. Extracción de ADN con solventes orgánicos a partir de leucocitos**

Cada precipitado de leucocitos se resuspendió en  $500\text{ }\mu\text{L}$  de tampón TE (proporción 20:5, pH 8.0), con  $75\text{ }\mu\text{L}$  de SDS 10% y  $15\text{ }\mu\text{L}$  de proteinasa K ( $20\text{ mg}/\mu\text{L}$ ); este volumen final se incubó a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas. Luego, se agregó  $500\text{ }\mu\text{L}$  de acetato de potasio 3M para separar las impurezas, seguido de dos lavados con cloroformo: alcohol isoamílico (proporción 24:1). Para la precipitación del ADN se añadió cloruro de sodio 5 M y etanol absoluto frío ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); el precipitado de ADN obtenido se lavó dos veces con etanol al 70% frío ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y el último lavado se hizo con etanol absoluto frío ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Por último, se eliminó el sobrenadante por inversión y se resuspendió el ADN en tampón TE (proporción 10:1, pH 8.0). Las muestras de ADN extraídas se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

El procedimiento de extracción de ADN en mención se basó en la metodología de Sambrook y Russell (1989) con modificaciones hechas por el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del INIA.

**b. Extracción de ADN con un kit comercial a partir de leucocitos**

Para la extracción de ADN de los individuos que tenían un único precipitado de leucocitos se utilizó el kit comercial *Pure Link® Genomic DNA Mini Kit* de Invitrogen.

Se adicionó a cada precipitado de leucocitos  $250\text{ }\mu\text{L}$  de tampón TE (proporción 20:5, pH 8.0),  $75\text{ }\mu\text{L}$  de SDS 10% y  $15\text{ }\mu\text{L}$  de proteinasa K del kit comercial; esta mezcla se incubó a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas. Posteriormente se agregó  $200\text{ }\mu\text{L}$  de acetato de potasio 3M para separar las impurezas y se hizo un solo lavado con cloroformo: alcohol isoamílico (proporción 24:1), se

recuperó la fase acuosa y se adicionó 200  $\mu\text{L}$  de solución de lisis, 20  $\mu\text{L}$  de ARNasa y 800  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto frío ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

El lisado se trasladó a la columna colectora de ADN, luego se agregó 500  $\mu\text{L}$  de la Solución de lavado 1 y después se adicionó 500  $\mu\text{L}$  de la Solución de lavado 2 (después de la adición de cada solución se eliminó el filtrado). Por último, se recuperó la columna y se colocó en otro tubo de microcentrífuga con el rotulo definitivo, se añadió a la columna 100  $\mu\text{L}$  de Solución de elución; y se repitió este último paso en un segundo tubo de microcentrífuga. Las muestras de ADN extraído se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### **2.4.2.2. Muestras de pelos.**

El proceso de preparación de muestras de folículos pilosos para la extracción de ADN se realizó en una cabina para evitar la contaminación del área de extracción de ADN. Primero, se retiró un mechón de pelos de la bolsa hermética, se cortó la raíz de los pelos teniendo cuidado de incluir el bulbo piloso en un tubo de microcentrífuga correctamente rotulado con el código del individuo y se procedió con el protocolo de extracción de ADN.

##### **a. Extracción de ADN con solventes orgánicos a partir de folículos pilosos**

Al tubo de microcentrífuga con los folículos pilosos se adicionó 750  $\mu\text{L}$  de tampón TE (proporción 20:5, pH 8.0), 75  $\mu\text{L}$  de SDS 10%, 15  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (20 mg/ $\mu\text{L}$ ) y 50  $\mu\text{L}$  de DTT 1M, se incubó esta mezcla a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas y luego de ese tiempo se agregó nuevamente 50  $\mu\text{L}$  de DTT 1M y se continuó con la incubación por 5 horas más. Al finalizar la incubación se adicionó 500  $\mu\text{L}$  de acetato de potasio 3M, después se hizo un lavado con cloroformo: alcohol isoamílico (proporción 24:1) y se precipitó el ADN de la fase acuosa con isopropanol frío ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Al precipitado de ADN se añadió 200  $\mu\text{L}$  de tampón TE (proporción

20:5, pH 8.0), 200  $\mu$ L de acetato de potasio 3M, 500  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico (proporción 24:1).

La fase acuosa recuperada se lavó nuevamente con 600  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico (proporción 24:1) y se continuó con el procedimiento usado para la extracción de ADN a partir de leucocitos con solventes orgánicos.

#### **b. Extracción de ADN con un kit comercial a partir de folículos pilosos**

Se utilizó el kit comercial *Pure Link® Genomic DNA Mini Kit* de Invitrogen. Al tubo de microcentrífuga con los folículos pilosos se añadió 750  $\mu$ L de tampón TE (proporción 20:5, pH 8.0), 75  $\mu$ L de SDS 10%, 15  $\mu$ L de proteinasa K del kit y 50  $\mu$ L de DTT 1M. Se incubó los tubos a 55 °C durante 4 horas. Luego de la incubación se adicionó 500  $\mu$ L de acetato de potasio 3M para separar las impurezas y al sobrenadante se agregó 800  $\mu$ L de isopropanol frío (-20 °C) para precipitar el ADN.

El ADN precipitado se disolvió en 200  $\mu$ L de tampón TE (proporción 20:5, pH 8.0) y se adicionó 200  $\mu$ L de solución de lisis, 20  $\mu$ L de ARNasa y 800  $\mu$ L de etanol absoluto frío (-20 °C). Después se continuó con el procedimiento descrito para la extracción de ADN a partir de leucocitos haciendo uso de un kit comercial.

#### **2.4.3. Determinación de la pureza y concentración del ADN mediante espectrofotometría UV/Vis**

Primero, se hicieron diluciones del ADN extraído con buffer TE 10:1 hasta llegar a una concentración entre 10 y 40 ng/ $\mu$ L. Luego, se leyó las muestras de ADN en el espectrofotómetro Epoch (BioTek) en el UV visible a 260 nm y 280 nm. El cociente de las absorbancias a 260 y 280 nm debe estar entre 1.8 – 2.0 y el cociente de las absorbancias 260 y 230 nm debe ser mayor a 2.0.

#### **2.4.4. Determinación de la calidad de ADN mediante electroforesis**

Para la elaboración del gel de agarosa 1% se pesó 0.5 g de agarosa y se disolvió en 50 mL de tampón TBE 1X pH 8.0, se calentó hasta que la agarosa se haya disuelto y se retiró inmediatamente del microondas. Se vertió la mezcla sobre el molde con los peines, se dejó gelificar de 15 a 30 minutos y se retiraron los peines con cuidado. Luego, se colocó el gel de agarosa en la cámara de electroforesis y se cubrió con buffer TBE 1X. Para la migración del ADN, se cargó 2  $\mu\text{L}$  de las muestras de ADN mezcladas con 6  $\mu\text{L}$  del tampón de carga Sal B 2X (azul de bromofenol, xilencianol, naranja G, sucrosa). Como colorante de ácidos nucleicos se utilizó GelRed®. La corrida electroforética se hizo a un voltaje constante de 120 V durante 20 minutos.

La visualización del gel se hizo mediante el Fotodocumentador ChemicDoc XR y las fotografías se procesaron con el programa Quantity One v. 4.6.3 (Biorad).

#### **2.4.5. Identificación de los genotipos homocigotos (A1A1/A2A2) y el genotipo heterocigoto (A1A2) mediante PCR-RFLP.**

La amplificación de una región del exón 7 del gen CSN2, que contiene al SNP rs43703011, fue realizada de acuerdo con lo siguiente: la mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$  que contenía 1.5  $\mu\text{L}$  de buffer, 1.2  $\mu\text{L}$  de dNTPs 0.2 mM, 0.9  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  3 mM, 0.45  $\mu\text{L}$  de cebadores delantero y reverso 0.15  $\mu\text{M}$  y 0.5 U de Taq Polimerasa y 4  $\mu\text{L}$  de ADN (20 ng/ $\mu\text{L}$ ).

El protocolo de amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos para la desnaturalización de las hebras de ADN, 56 °C por 40 segundos para la hibridación de los cebadores y 72 °C por 30 segundos para la extensión; por último, una extensión final a 72 °C por 15 minutos.

Se usó el cebador delantero 5'-CCTTCTTTCCAGGATGAACTCCAG-3' y el cebador reverso 5'-GAGTAAGAGGAGGGATGTTTTGTGGGAGGCTCT-3' (39,57), los cuales amplifican un fragmento de 121 pb. Para el análisis de los productos de PCR se elaboraron geles de agarosa 2%. Para la migración del ADN amplificado, se cargó 4  $\mu$ L de producto de PCR mezclado con 6  $\mu$ L del tampón de carga Sal B 2 X (azul de bromofenol, xilencianol, naranja G, sucrosa) mezclado con GelRed® 1000 X como colorante de ácidos nucleicos. La corrida electroforética se hizo a un voltaje constante de 100 V durante 20 minutos.

Se visualizaron los geles en un Fotodocumentador UV Chemi XR y las fotografías se procesaron con el programa Quantity One v. 4.6.3 (Biorad).

**a. Digestión enzimática del fragmento de interés con la enzima DdeI.**

Para verificar los puntos de corte de la enzima DdeI según referencia bibliográfica (39,57), primero se realizaron dos pruebas de simulación computacional (in silico) en la secuencia del gen de la beta caseína en formato FASTA obtenida de la base de datos Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) insertando el código del SNP de interés (rs43703011). Luego, se utilizó el servidor web In-Silico PCR (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) para obtener la secuencia nucleotídica del fragmento de interés, los cebadores empleados fueron diseñados por McLachlan (57).

Después, se hizo una digestión virtual del fragmento obtenido con la enzima *DdeI* con el programa de mapeo de restricciones en línea *Restriction Mapper* (<http://www.restrictionmapper.org/>).

Se utilizó 10  $\mu$ L del producto de PCR para ser digerido por la endonucleasa de restricción *DdeI* (Promega) a 37 °C durante 4 horas, se utilizó 1.40  $\mu$ L de buffer de restricción 10X, 0.14  $\mu$ L

de acetilasa BSA (10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y 0.35  $\mu\text{L}$  de enzima de *DdeI* (10 U/ $\mu\text{L}$ ) en un volumen final de 14  $\mu\text{L}$ .

Para la visualización de los fragmentos de restricción se hizo una electroforesis en gel de agarosa 3% con un voltaje de 80 V por 90 minutos, previamente en la preparación de 120 mL de gel de agarosa se añadió 1.4  $\mu\text{L}$  del colorante fluorescente GelRed® 10 000X. Se utilizó un Fotodocumentador UV Chemi XR para fotografiar los geles.

#### **2.4.6. Determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas del gen *CSN2***

Este análisis estadístico se ejecutó en el programa informático RStudio, en el cual se utilizaron los paquetes PEGAS v. 0.14 (58) y ADEGENET v. 2.1.3. (59) para determinar las frecuencias de los alelos A1 y A2 y las frecuencias de los genotipos A1A1, A1A2 y A2A2 del gen *CSN2*; el paquete HARDYWEINBERG v. 1.6.6. (60) para las pruebas estadísticas y la gráfica del equilibrio de Hardy Weinberg.

Para determinar las diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas de ambas poblaciones de estudio se utilizó el programa IBM® SPSS Statistics con el cual se halló el Chi cuadrado ( $X^2$ ) y el valor P. La prueba estadística de  $X^2$  sirvió para conocer la diferencia entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas, mientras más pequeño es el valor de  $X^2$  más pequeña es la diferencia.

Con el valor de probabilidad P se evaluó la significancia de los valores de  $X^2$  y se dio un margen del 5% de error.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Extracción de ADN

En este procedimiento se realizó la extracción de dos tipos de muestras biológicas; leucocitos y folículos pilosos. Se obtuvo una mayor concentración de ADN a partir de leucocitos (entre 30 y 250 ng/ $\mu$ L) con el protocolo de extracción con solventes orgánicos a diferencia del protocolo con el kit comercial *Pure Link® Genomic DNA Mini Kit* de Invitrogen, pero con ambos protocolos se logró obtener ADN de buena calidad (Figura 13). Por otro lado, el ADN extraído a partir de folículos pilosos presentó señales de degradación en ambos métodos de extracción (Figura 14) y presencia de ARN, por consiguiente, las lecturas en el espectrofotómetro fueron altas (entre 100 y 500 ng/ $\mu$ L). Esto puede deberse a la poca cantidad de células nucleadas que hay en las muestras de pelos además de la presencia de polifenoles y melaninas que ocasionan problemas en la extracción de ADN (61).

En el espectrofotómetro, los cocientes de las absorbancias a 260 y 280 nm estuvieron entre 1.8 – 2.0 y los cocientes de las absorbancias 260 y 230 nm fueron mayores a 2.0. Esto quiere decir que se logró extraer ADN con una pureza óptima, sin presencia de sales, fenoles o ARN que puedan actuar como inhibidores de la PCR (62).

**A**

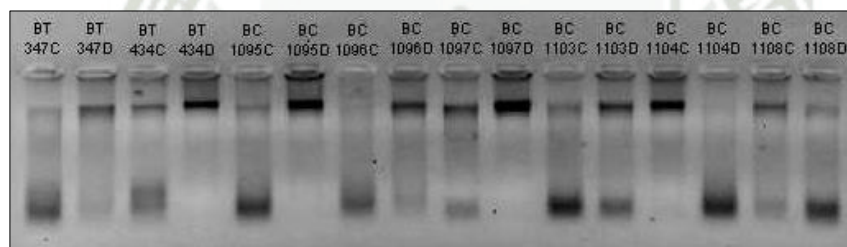


**B**

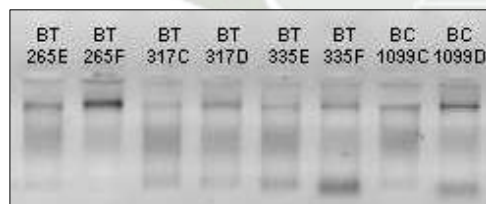


**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído con solventes orgánicos (A) y un kit comercial (B) a partir de leucocitos de bovinos raza Holstein y bovinos criollos del departamento de Apurímac.

**A**



**B**



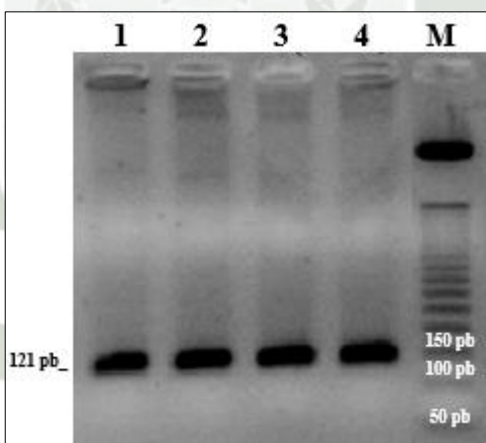
**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído con solventes orgánicos (A) y un kit comercial (B) a partir de folículos pilosos de bovinos raza Holstein y bovinos criollos del departamento de Apurímac.

### 3.2. Identificación de los genotipos homocigotos (A1A1/A2A2) y el genotipo heterocigoto (A1/A2).

El tamaño del fragmento de 121 pb obtenido de las pruebas PCR In silico (Figura 15) fueron concordantes con los resultados de la técnica de PCR de punto final que contienen el SNP rs43703011 del gen CSN2 (Figura 16).

```
>chr6:85451263-85451383 121pb
5' CCTTCTTTCCAGGATGAACTCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCT
CTAGTCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCC[C/T]TAAGAGCCTCCCACAAAACATCCCTCCT
CTTACTC 3'
```

**Figura 15.** Secuencia nucleotídica del fragmento amplificado del gen CSN2 que contiene el SNP rs43703011 representado por los alelos C/T



**Figura 16.** Electroforesis de ADN amplificado por PCR convencional con cebadores específicos para el SNP rs43703011 del gen CSN2 en gel de agarosa 2%. Fragmento de 121 pb carriles 1, 2, 3 y 4. Marcador de peso molecular carril M (50 pb).

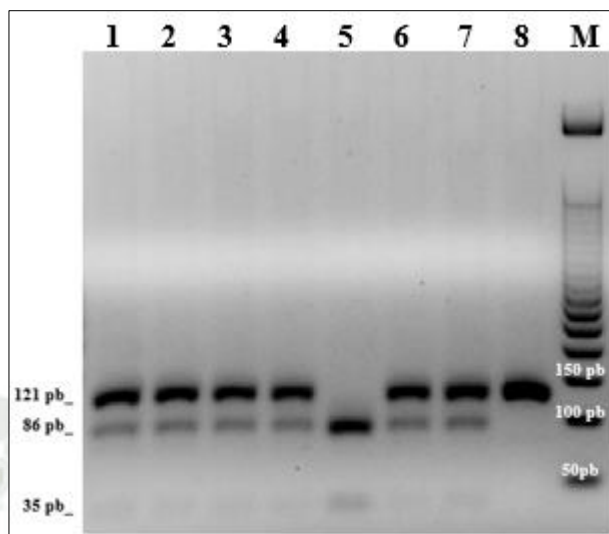
Además, el resultado de PCR-RFLP In silico, digerida con la enzima *DdeI* en la secuencia nucleotídica 5' CTTAG 3', generaron dos fragmentos uno de 86 pb y 35 pb los cuales representan

el genotipo CSN2\*A2A2 (Figura 17). Al comparar estos resultados con los obtenidos en la electroforesis horizontal en geles de agarosa, se observó una banda de ADN (121 pb) cuando el individuo tenía el genotipo homocigoto CSN2\*A1A1, dos bandas cuando tenía el genotipo homocigoto CSN2\*A2A2 (86 pb y 35 pb) y tres bandas cuando tenía el genotipo heterocigoto CSN2\*A2A1(121 pb, 86 pb y 35 pb) (Figura 18). Esto concuerda con los genotipos encontrados por Miluchová M. et al.

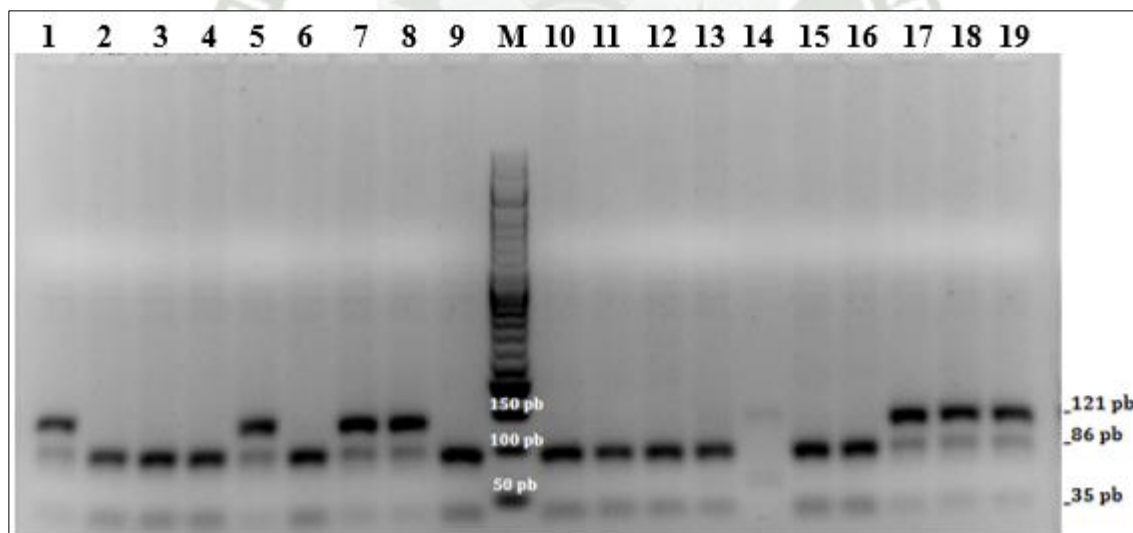
Enzymes: DdeI					
Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
86	none	1	DdeI	86	CCTTCTTTCC AGGATGAACT CCAGGATAAA ATCCACCCCT TTGCCCAGAC  ACAGTCTCTA GTCTATCCCT TCCCTGGGCC CATCCC
35	DdeI	87	none	121	TAAGAGCCTC CCACAAAACA TCCCTCCTCT TACTC

**Figura 17.** Digestión virtual con la enzima DdeI en el programa de mapeo de restricciones en línea Restriction Mapper

La genotipificación con PCR-RFLP en las muestras de bovinos Holstein y bovinos “criollos”, se observaron los patrones para los tres genotipos (Figura 18 y 19 respectivamente): homocigoto para el alelo A1 (CSN2\*A1A1), heterocigoto (CSN2\*A2A1) y homocigoto para el alelo A2 (CSN2\*A2A2).

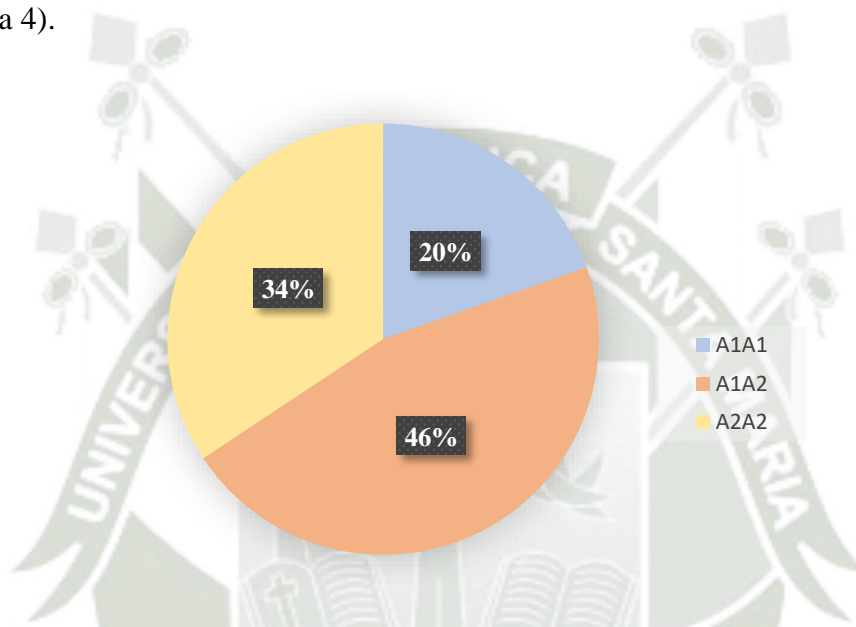


**Figura 18.** Electroforesis de genotipos obtenidos del ensayo PCR-RFLP para el gen CSN2 de bovinos raza *Holstein*. Genotipos: CSN2\*A1A1 carril 8, CSN2\*A2A1 carriles 1, 2, 3, 4, 6, 7 y CSN2\*A2A2 en el carril 5. Marcador de peso molecular carril M (50 pb).

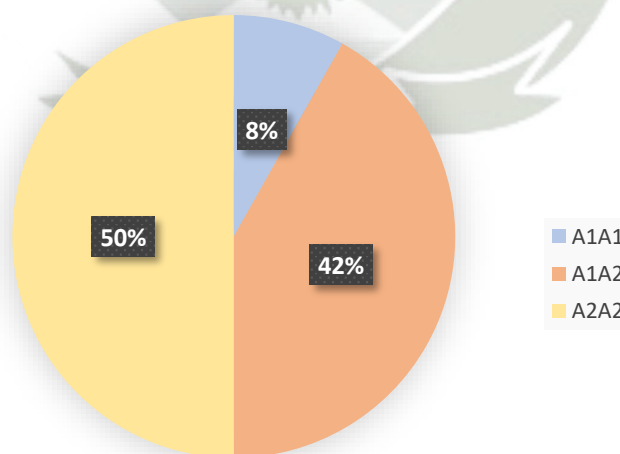


**Figura 19.** Electroforesis de fragmentos obtenidos de un ensayo PCR-RFLP para el gen CSN2 de bovinos criollos del departamento de Apurímac. Genotipos: CSN2\*A2A1 carriles 1, 5, 7, 8, 17, 18, 19 y CSN2\*A2A2 carriles 2, 3, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16. Marcador de peso molecular carril M (50 pb).

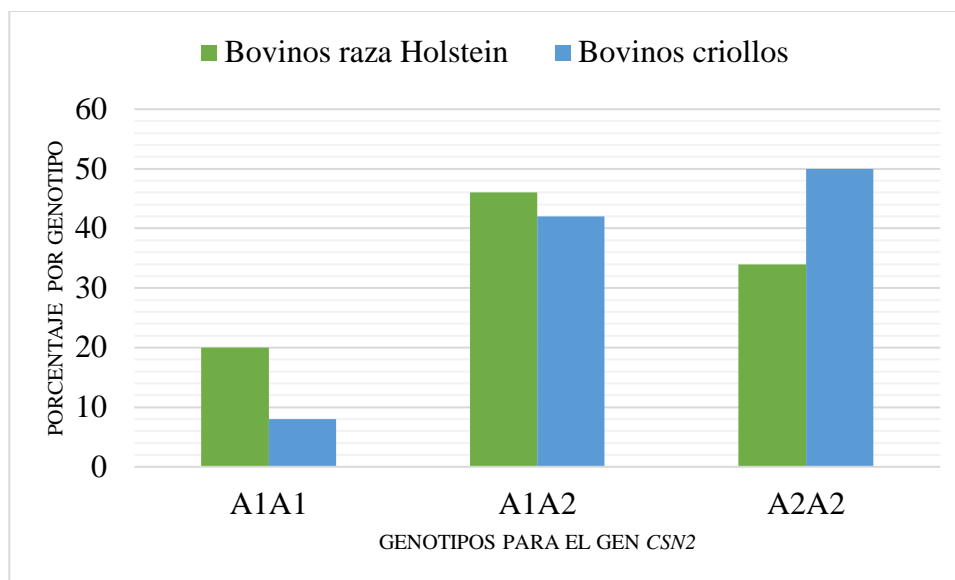
De los 102 bovinos raza Holstein 20 presentaron el genotipo  $CSN2^*A1A1$ , que representa un 20% del total, 47 el genotipo  $CSN2^*A1A2$  representa un 46% del total, 35 el genotipo  $CSN2^*A2A2$  representa el 34 %. Por otro lado, de los 98 bovinos criollos del departamento de Apurímac, 8 presentaron el genotipo  $CSN2^*A1A1$  que representan un 8%, 41 el genotipo  $CSN2^*A1A2$  que representa el 42%, 49 el genotipo  $CSN2^*A2A2$  que representa el 50% (Figura 20, 21 y 22) (Tabla 4).



**Figura 20.** Porcentaje de cada genotipo del gen  $CSN2$  en los bovinos de raza Holstein



**Figura 21.** Porcentaje de cada genotipo del gen  $CSN2$  en los bovinos criollos del departamento de Apurímac



**Figura 22.** Porcentaje para cada genotipo por población de estudio

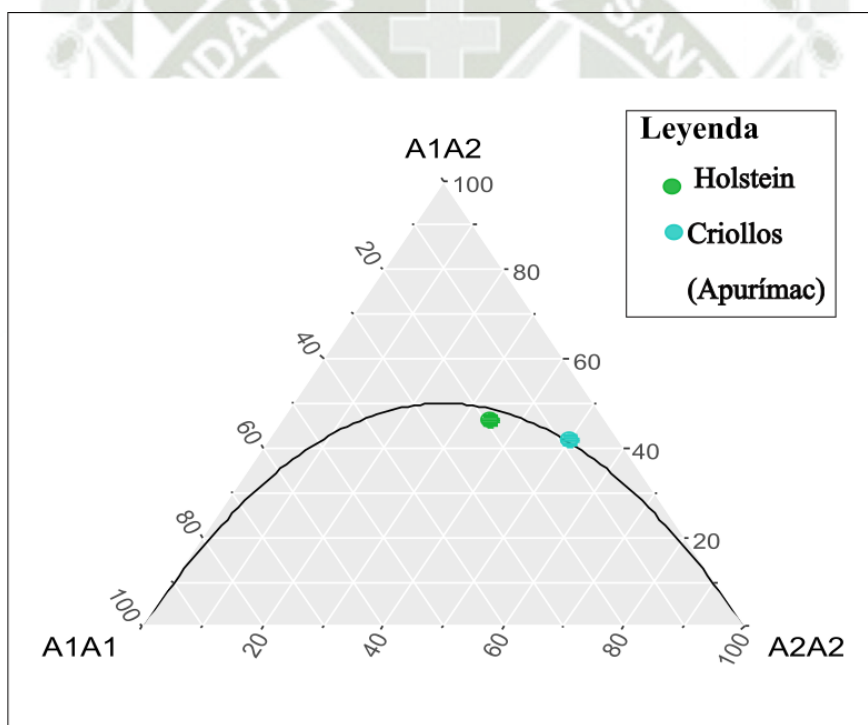
### 3.3. Determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas del gen *CSN2*

La Tabla 4 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas del gen *CSN2* halladas para ambas poblaciones de estudio. El valor P fue mayor que 0.05 para ambas poblaciones, lo que indicó que la diferencia entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas no es significativa; por lo tanto, la distribución de las frecuencias genotípicas se encuentra bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg. Así pues, en la Figura 23 se observa la representación de estos resultados, donde el equilibrio de Hardy-Weinberg está descrito por una parábola.

**Tabla 3.** Frecuencias genotípicas y alélicas para el gen CSN2 en las poblaciones de estudio

Poblaciones	Provincia	N° individuos	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas		X <sup>2</sup>	Valor P	EHW
			A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2			
<b>Bovinos raza Holstein</b>	Trujillo	102	0.20	0.46	0.34	0.43	0.57	0.19	0.66	EE
<b>Bovinos criollos del departamento de Apurímac</b>	Andahuaylas	66	0.08	0.36	0.56	0.26	0.74	0.01	0.94	EE
	Aymaraes	32	0.10	0.53	0.37	0.36	0.64			
	Total	98	0.08	0.42	0.5	0.29	0.71			

*EHW = Equilibrio de Hardy Weinberg; EE = En equilibrio (P>0.05)*



**Figura 233.** Diagrama ternario para los genotipos del SNP rs43703011 del gen CSN2 en las poblaciones de estudio

Por último, las disimilitudes observadas entre las frecuencias genotípicas y alélicas de las poblaciones de estudio no son suficientes para conocer si hay una asociación población – genotipo o población – alelo; por esta razón, se hizo nuevamente la prueba de Chi cuadrado y se evaluó su significancia.

Al analizar las frecuencias genotípicas se halló un valor de 7.808 para el  $X^2$  y 0.02 para el valor P (Tabla 5). En el caso de las frecuencias alélicas se halló un valor de 7.4059 para el  $X^2$  y 0.006 para el valor P.

En ambos casos el valor P fue menor a 0.05 lo que determinó que sí existe una diferencia significativa entre las frecuencias genotípicas y alélicas de los bovinos raza Holstein con los bovinos criollos del departamento de Apurímac.

**Tabla 4.** Prueba de Chi cuadrado para las frecuencias genotípicas entre poblaciones

Poblaciones		Genotipo			Total	$X^2$	Valor P
		A1A1	A1A2	A2A2			
<b>Bovinos raza Holstein</b>	Recuento	20	47	35	102	7.808	0.02
	%	71.4%	53.4%	41.7%	51.0%		
<b>Bovinos criollos del departamento de Apurímac</b>	Recuento	8	41	49	98		
	%	28.6%	46.6%	58.3%	49.0%		
Total	Recuento	28	88	84	200		
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%		

% = Porcentaje dentro del genotipo

Cabe recalcar que el alelo A2 es el alelo original y el alelo A1 es una mutación con alta presencia en poblaciones de bovinos de origen europeo, esto se ve reflejado en los resultados obtenidos en esta investigación ya que se encontró una mayor frecuencia del alelo A2 en los

bovinos criollos de Apurímac que en los bovinos raza Holstein (0.71 y 0.57 respectivamente). Esto puede deberse a que los bovinos criollos no están bajo un sistema de selección, esto quiere decir que los ganaderos altoandinos de Apurímac no han introducido a sus hatos bovinos de razas especializadas en producción de leche. Por otro lado, la raza Holstein ha sido sometida a un mejoramiento genético orientado a mayor producción lechera (9), por lo cual tiene sentido que en esta investigación el alelo A1 presente una mayor frecuencia en los bovinos raza Holstein que en los bovinos criollos de Apurímac (0.43 y 0.29).

Los resultados obtenidos fueron contrastados con los publicados por otras investigaciones; de esta forma, se encontró que las frecuencias alélicas halladas en los bovinos Holstein en esta tesis fueron iguales a una investigación realizada en el año 2014 en México dónde la frecuencia de los alelos A1 y A2 fue de 0.43 y 0.57 respectivamente y similares a las frecuencias alélicas reportadas en Estados Unidos en 1991 (A1: 0.43 y A2: 0.55) (63,64).

Investigaciones realizadas en Canadá, Australia, Italia y Estados Unidos antes del año 2000 mostraron una mayor frecuencia del alelo A1 en bovinos de raza Holstein (65,66), situación que se ha revertido en los últimos años ya que en México, Argentina e Italia se ha encontrado que predomina el alelo A2 (63,67–69). En Nueva Zelanda hallaron una frecuencia de 0.465 para el alelo A1 y de 0.510 para el alelo A2 (37). Como se mencionó anteriormente desde hace más 20 años se conoce las ventajas del alelo A2 sobre el alelo A1, principalmente en Nueva Zelanda; país que juntamente con Estados Unidos y Canadá son importantes exportadores de pajillas de semen de bovinos de diferentes razas. Para el caso de esta investigación, se conoce que la empresa LÁCTEA S.A. importa semen de bovinos neozelandeses raza Holstein, por lo que los resultados de las frecuencias alélicas reportadas en Nueva Zelanda y en esta tesis son semejantes.

La ventaja del alelo A2 sobre el alelo A1 de la beta caseína es que no da lugar a la liberación del péptido BCM-7 debido a la fuerte unión entre la prolina e isoleucina, este péptido está relacionado con enfermedades como la diabetes mellitus tipo 1 y la cardiopatía coronaria. Además, el alelo A2 influye en un mayor rendimiento proteico en la leche de vaca (39).

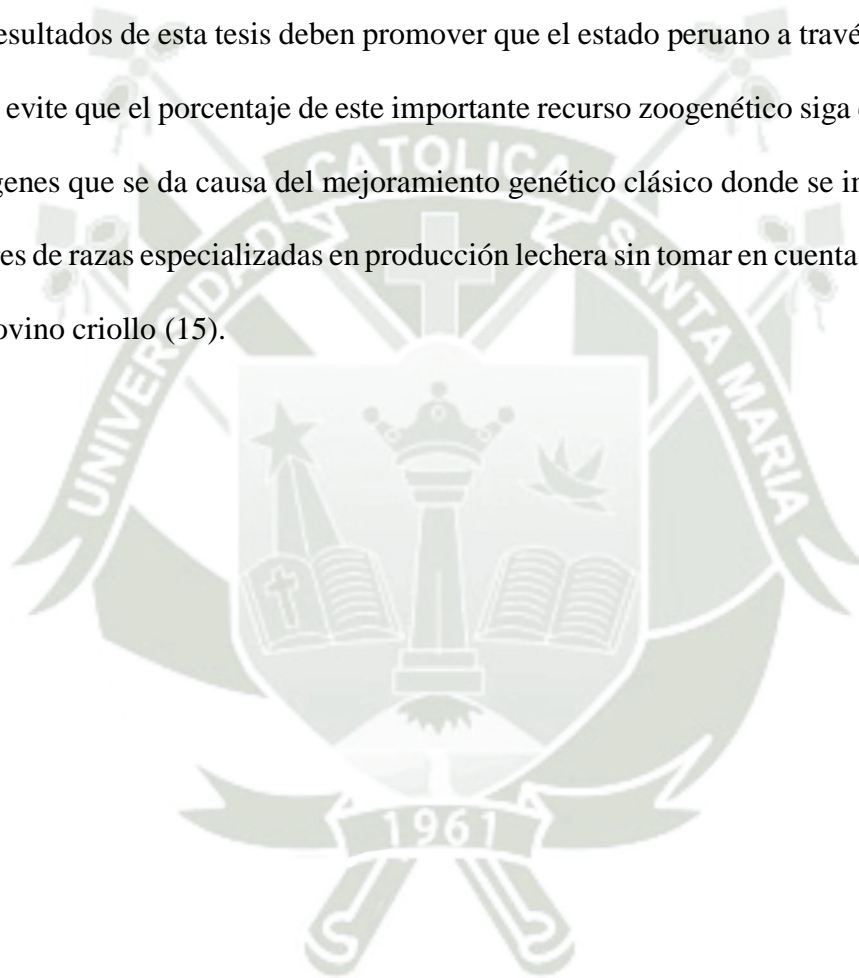
De acuerdo con Primo AT (14) se conoce que los bovinos fueron introducidos por los españoles a Latinoamérica, esto explica la similitud entre los resultados obtenidos en el presente trabajo y en dos investigaciones realizadas en México en el año 2016 y 2017; en la primera, determinaron una frecuencia de 0.48 para el alelo A1 y 0.52 para el alelo A2 y en la segunda, 0.5176 para el alelo A1 y 0.4821 para el alelo A2 (41,70). En ambas poblaciones el genotipo predominante fue el A1A2.

Desafortunadamente, aunque el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino de España tiene a los bovinos autóctonos españoles caracterizados geográfica y fenotípicamente (71); no se encontraron publicaciones sobre genotipado en el gen de la beta caseína. Sin embargo, Gerardo Caja catedrático indica que actualmente se están llevando a cabo investigaciones para genotipar al ganado bovino autóctono de España para evitar que estos animales sigan siendo reemplazados por otros debido a que ha primado la cantidad de leche sobre la calidad (72).

Para finalizar esta investigación, es importante mencionar que el haber hallado una frecuencia de 0.71 del alelo A2 en la población criolla, la más alta a comparación de las investigaciones mencionadas en esta tesis y que el genotipo predominante sea el A2A2 debe hacer que se valore al ganado criollo peruano y cuidar que no sea sustituido por otras razas al desconocer la calidad genética que posee. Por el contrario, los bovinos criollos deben ser la base del mejoramiento genético en cualquier programa de apoyo a la ganadería vacuna, especialmente en la región sierra del país (2).

Alfonso et al. (44), menciona que la venta de leche A2 puede ser una buena oportunidad para las industrias lecheras locales pero un riesgo para los pequeños productores que sostienen una forma tradicional de producción lechera. De modo que es importante que los pequeños y medianos productores puedan conocer el valor genético de su ganado bovino para que estén listos para una eventual demanda de leche A2.

Los resultados de esta tesis deben promover que el estado peruano a través del Ministerio de Agricultura evite que el porcentaje de este importante recurso zoogenético siga decreciendo por la pérdida de genes que se da causa del mejoramiento genético clásico donde se importa el semen de reproductores de razas especializadas en producción lechera sin tomar en cuenta la conservación genética del bovino criollo (15).

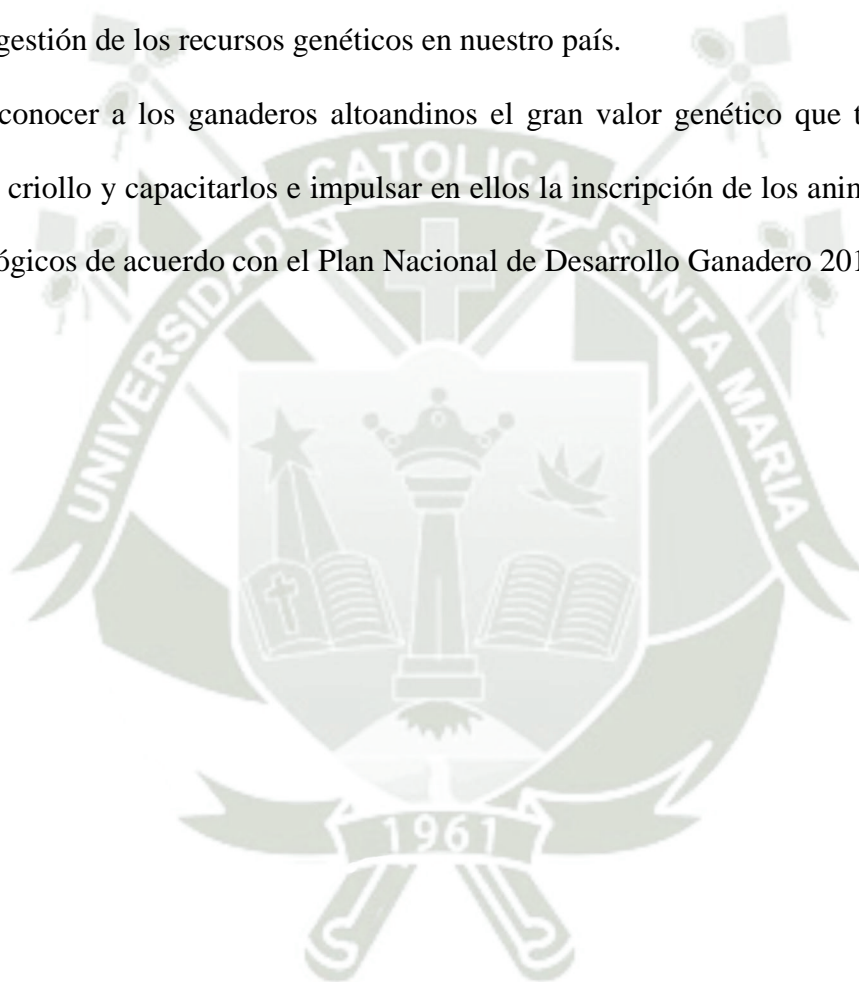


## CONCLUSIONES

1. Se estandarizó un protocolo de PCR-FRLP para la identificación de los alelos A1 y A2 del gen *CSN2* en las poblaciones de estudio.
2. Se identificó los genotipos homocigotos (A1A1/A2A2) y el genotipo heterocigoto (A1A2) en las poblaciones de estudio con la técnica PCR-RFLP.
3. Se determinó una frecuencia de 0.46 para el genotipo heterocigoto A1A2 en los bovinos raza Holstein por lo que fue el más frecuente en esta población. De igual manera, en los bovinos criollos del departamento de Apurímac el genotipo más frecuente fue el genotipo homocigoto A2A2 con una frecuencia de 0.50.
4. En esta tesis se determinó la frecuencia de los alelos A1 y A2 del gen *CSN2*; 0.43 y 0.57 en bovinos de raza Holstein de la empresa LACTEA S.A.; 0.29 y 0.71 en bovinos criollos del departamento de Apurímac.
5. En esta tesis se determinó que el alelo A2 y el genotipo homocigoto A2A2 fueron significativamente más frecuentes en los bovinos criollos del departamento de Apurímac que en los bovinos raza Holstein de la empresa LÁCTEA S.A, por lo tanto, estos resultados indican que las vacas criollas tienen gran potencial para la producción de leche A2.

## RECOMENDACIONES

1. Es preciso realizar este estudio en la cuenca lechera del Perú, conformada principalmente por los departamentos de Cajamarca, Arequipa y Lima.
2. Realizar más estudios de diversidad genética al bovino criollo peruano para realizar una buena gestión de los recursos genéticos en nuestro país.
3. Dar a conocer a los ganaderos altoandinos el gran valor genético que tiene su ganado bovino criollo y capacitarlos e impulsar en ellos la inscripción de los animales a registros genealógicos de acuerdo con el Plan Nacional de Desarrollo Ganadero 2017-2027.



**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Gutiérrez Romero HC, Trujillo Villarroel G, Martínez Flores M. Plan estratégico del sector ganadero bovino en el Perú. 2010.
2. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Situación de las actividades de crianza y producción [Internet]. Disponible en: <https://www.midagri.gob.pe/portal/datero/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-producci>
3. Gatica C, Alomar D. Variantes genéticas de beta caseína bovina: implicancia en la producción, características tecnológicas de la leche y la salud humana. *Agro Sur*. 2017;45(3):29-35.
4. Nilsen H, Olsen HG, Hayes B, Sehested E, Svendsen M, Nome T, et al. Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle. *Genet Sel Evol*. 2009;41(1):1-12.
5. Bavera GA. Razas Bovinas y Bufalinas de la Argentina. Primera ed. Rio Cuarto; 2011. 13-20 p.
6. Gloobe H. Anatomía Aplicada del Bovino. Primera ed. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura; 1989.
7. Sierra Alfranca I. El Concepto de Raza: Evolución y Realidad. *Arch Zootec*. 2001;50(192):547-64.
8. Inchausti D, Tagle E. Bovinotecnia Exterior y razas. Segunda ed. Buenos Aires; 1967. 459-480 p.
9. Características de la raza Holstein. El productor [Internet]. 4 de abril de 2018; Disponible

en: <https://bit.ly/34t72TE>

10. Holstein Association USA. Holstein Marketplace Sires. 2020; Disponible en:  
[http://www.holsteinusa.com/marketplacesires/bull\\_5\\_charisma.html](http://www.holsteinusa.com/marketplacesires/bull_5_charisma.html)
11. Holstein Association USA. Star of the Breed [Internet]. 2011. Disponible en:  
<http://www.holsteinusa.com/awards/animals.html>
12. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Resultados definitivos IV Censo Nacional Agropecuario - 2012. Artículo. 2012.
13. Delgado C. A, García B. C, Allcahuamán M. D, Aguilar G. C, Estrada V. P, Vega A. H. Caracterización fenotípica del ganado criollo en el Parque Nacional Huascarán – Ancash. 2019;30(3):1143-9.
14. Primo AT. El ganado bovino ibérico en Las Américas: 500 años después. Vol. 41, Arch. Zootec. 1992. p. 421-32.
15. Rivas E, Veli E, Aquino Y, Rivas V, Pastor S, Estrada R. Acciones para la caracterización y conservación del bovino criollo Peruano (Bos taurus). Animal Genetic Resources Information. 2007;40:33-42.
16. Barbieri B. Necesidad de contar con un programa de índices de selección oficial para mejoramiento del ganado de la sierra «doble propósito». Rev de Cien Vet. 2006;22:27-8.
17. INIA. Área de Recursos Zoogenéticos del Instituto Nacional Innovación Agraria [Internet]. Disponible en: <https://dr gb.inia.gob.pe/area-de-recursos-zoogeneticos/>
18. Ramírez M, Chávez J. La cooperación internacional y desarrollo de la ganadería lechera en el peru. 2002;12(2):187-92.

19. Ministerio de Agricultura y Riego. Estudio de la ganadería lechera en el Perú. Sierra. 2017;1:84.
20. Santamaría Aranda J, Rodas Tello El, Casimiro Casimiro M, Paredes Durand J, Mendieta Pino J, Sihuas Meza A. Boletín estadístico mensual “El Agro en Cifras”. 2020.
21. Instituto Nacional de Innovación Agraria. Sistematización de la experiencia de los subproyectos de la cadena de ganado vacuno destinado a la producción de leche financiados por el Programa Nacional de Innovación Agraria. 2020.
22. Fernández EF, Hernández JAM, Suárez VM, Villares JMM, Yurrita LRC, Cabria MH, et al. Documento de Consenso: Importancia nutricional y metabólica de la leche. Nutr Hosp. 2015;31(1):92-101.
23. Parra Huertas RA. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. 2009;62(1):4967-82.
24. Rovira Farré R. La leche y los productos lácteos : fuentes dietéticas de calcio. Nutr Hosp. 2015;31(2):1-9.
25. Requena FD, Agüera EI, Requena F. Genética de la caseína de la leche en el bovino Frisón. REDVET. 2007;
26. Hristov P, Radoslavov G. A Review of Methods for Genotyping Milk Proteins in Cattle. Adv Dairy Res. 2015;03(03).
27. García CAC, Montiel RLA, Borderas TF. Grasa y proteína de la leche de vaca: Componentes, síntesis y modificación. 2014;63:85-105.
28. Caroli AM, Chessa S, Erhardt GJ. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle:

- Effect on animal breeding and human nutrition. *J Dairy Sci.* 2009;92(11):5335-52.
29. Davoodi SH, Shahbazi R, Esmaeili S, Sohrabvandi S, Mortazavian AM, Jazayeri S, et al. Health-related aspects of milk proteins. *Iran J Pharm Res.* 2016;15(3):573-91.
  30. Farrell HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision. *J Dairy Sci* [Internet]. 2004;87(6):1641-74. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
  31. Carvajal AM, Kerr B. Factores genéticos que influyen en la composición de la leche bovina.
  32. Cotton CM, Murray JC. Polimorfismos de nucleótido único. En: Elsevier España S.L.U., editor. *Avery Enfermedades del recién nacido.* Décima edi. 2019. p. 181.
  33. Pierce BA. Polimorfismos de un nucleótido único. En: Editorial Médica Panamericana S.A., editor. *Genética: Un enfoque conceptual.* Tercera ed. 2010. p. 556.
  34. Espinosa Salinas MI. Identificación de SNPs implicados en la diferente respuesta a componentes de la dieta y asociación con enfermedades relacionadas con la alimentación: Estudios Nutrigenéticos [Internet]. Universidad Autónoma de Madrid; 2017. Disponible en: [https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/678313/epinosa\\_salinas\\_maria\\_isabel.pdf?sequence=1](https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/678313/epinosa_salinas_maria_isabel.pdf?sequence=1)
  35. Ramírez Bello J, Vargas Alarcón G, Tovilla Zárata C, Fragoso JM. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): Implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gac Med Mex.*

- 2013;149(2):220-8.
36. Ganguly I, Kumar S, Gaur GK, Singh U, Kumar A, Kumar S, et al. Status of  $\beta$ -casein (CSN2) Polymorphism in Frieswal (HF X Sahiwal Crossbred) Cattle. 2013;4(3):249-56.
  37. Kamiński S, Cieślińska A, Kostyra E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. J Appl Genet. 2007;48(3):189-98.
  38. Kučerová J, Matějček A, Jandurová OM, Sørensen P, Němcová E, Štípková M, et al. Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. Czech J Anim Sci. 2006;51(6):241-7.
  39. Miluchová M, Trakovická A, Gábor M. Analysis of Polymorphism of Beta Casein of Slovak Pinzgau Cattle By Pcr-Rflp for Allels a1 and a2 Analiza Polimorfismului Genei B-Cazeinei Prin Metoda Pcr-Rflp Pentru Alelele a1 Ş I a2 La. 2009;42(2):288-92.
  40. Winkelman AM, Wickham BW. Associations between milk protein genetic variants and production traits in New Zealand dairy cattle. New Zeal Soc Anim Prod online. 1996;56.
  41. Manzano Reyes E de J. Identificación de las frecuencias alélicas A1 y A2 del gen CSN2 en bovinos de la región del Papaloapan, mediante qPCR [Internet]. Universidad del Papaloapan; 2017. Disponible en:  
[https://www.unpa.edu.mx/tesis\\_Tux/tesis\\_digitales/maestria\\_biotecnologia/MB50-Erick\\_de\\_Jesús\\_Manzano\\_Reyes.pdf](https://www.unpa.edu.mx/tesis_Tux/tesis_digitales/maestria_biotecnologia/MB50-Erick_de_Jesús_Manzano_Reyes.pdf)
  42. Serrano Riaño JY, Minga Narváez SP. Composición, beneficios y enfermedades asociadas al consumo de leche de vaca. AREANDINA [Internet]. 2000;12-24. Disponible en:  
<https://revia.areandina.edu.co/index.php/RSA/article/view/352/385>

43. Bonsing J, Stewart FA, Mackinlay AG. Complete NucleotideSequence of the Bovine  $\beta$ -casein Gene. *Aust J Biol Sci.* 1988;41(4):527-38.
44. Alfonso L, Urrutia O, Mendizabal JA. Conversión de las explotaciones de vacuno de leche a la producción de leche A2 ante una posible demanda del mercado: posibilidades e implicaciones. *Inf Tec Econ Agrar.* 2019;xx:1-21.
45. Morais D. Nestlé pone mucha energía en promover la leche A2. *edairynews DairyCorp* [Internet]. 6 de julio de 2020; Disponible en: <https://edairynews.com/es/nestle-pone-mucha-energia-en-promover-la-leche-a2-140309/>
46. a2 Milk TM. The a2 Milk Company [Internet]. 2020 [citado 27 de octubre de 2020]. Disponible en: <https://thea2milkcompany.com/thea2milkdifference/>
47. Morais D. Nestlé con contratos a tres años por leche A2. *edairynews DairyCorp* [Internet]. 9 de octubre de 2019; Disponible en: <https://edairynews.com/es/nestle-con-contratos-a-tres-anos-por-leche-a2-125572/>
48. Nathans D, Smith HO. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu Rev Biochem.* 1975;44:273-93.
49. Mittal B, Chaturvedi P, Tulsyan S. Restriction Fragment Length Polymorphism [Internet]. Vol. 6, *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition.* Elsevier Inc.; 2013. 190-193 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01314-0>
50. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1980;32(3):314-31.

51. Ben-Ari G, Lavi U. Marker-assisted selection in plant breeding [Internet]. First Edit. Plant Biotechnology and Agriculture. Elsevier Inc.; 2012. 163-184 p. Disponible en:  
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00011-0>
52. Kalmes R, Huret J-L. Modelo de Hardy-Weinberg [Internet]. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. 2001 [citado 30 de septiembre de 2020].  
Disponible en: <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/HardySp.html>
53. Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. Introduction to Conservation Genetics. Vol. 66. 2012. 37-39 p.
54. EdSci Education & Science. Cómo se demuestra el equilibrio Hardy Weinberg [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=REpd6HRklG0>
55. EdSci Education & Science. Chi cuadrado en Equilibrio Hardy Weinberg [Internet]. 2017. Disponible en: [https://www.youtube.com/watch?v=z\\_Y8EqwVvEQ](https://www.youtube.com/watch?v=z_Y8EqwVvEQ)
56. Graffelman J, Morales Camarena J. Hardy-Weinberg Equilibrium and the Ternary Plot [Internet]. ResearchGate. 2008 [citado 2 de octubre de 2020]. Disponible en:  
[https://www.researchgate.net/publication/42366823\\_Hardy-Weinberg\\_Equilibrium\\_and\\_the\\_Ternary\\_Plot](https://www.researchgate.net/publication/42366823_Hardy-Weinberg_Equilibrium_and_the_Ternary_Plot)
57. McLachlan CNS. BREEDING AND MILKING COWS FOR MILK FREE OF B-CASEIN A1. Vol. 2. US 7,094,949 B2, 2006.
58. Paradis E. Package ‘ pegas ’. 2020.
59. Jombart T, Kamvar ZN. Package ‘ adegenet ’. 2020.
60. Graffelman J. Package «Hardy-Weinberg». 2020.

61. Contreras CG, Lemus C, Hernández A. Estandarización de una técnica de extracción de ADN en sementales porcinos para evaluar la frecuencia de los genes ESR y PRLR con PCR-RFLP. *Rev Complut Ciencias Vet.* 2008;2(1):39-39.
62. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. En: Banco ADN. 2.<sup>a</sup> ed. 2020. p. 1-10.
63. Duifhuis-Rivera T, Lemus-Flores C, Ayala-Valdovinos M, Sánchez-Chiprés DR, Galindo-García J, Mejía-Martínez K, et al. Polymorphisms in Beta and Kappa-casein are not associated with milk production in two highly technified populations of Holstein cattle in Mexico. *J Anim Plant Sci.* 2014;24(5):1316-21.
64. Demirel AF, Çak B. Discussions of Effect A1 and A2 Milk Beta-Casein Gene on Health. 2018;3(2):216-21.
65. Ng-Kwai-Hang KF, Hayes JF, Moxley JE, Monardes HG. Association of Genetic Variants of Casein and Milk Serum Proteins with Milk, Fat, and Protein Production by Dairy Cattle. *J Dairy Sci.* 1983;835-40.
66. De Noni I, FitzGerald RJ, Korhonen HJT, Le Roux Y, Livesey CT, Thorsdottir I, et al. Review of the potential health impact of  $\beta$ -casomorphins and related peptides. Vol. 231, European Food Safety Authority Scientific Report. 2009.
67. Pons Fita A. Determinación de la Frecuencia del alelo A2 de la Beta-caseína (CNS2) en pajillas de toros lecheros de la raza Holstein. Universidad de Girona; 2015.
68. Raschia MA. Identificación de variantes alélicas de genes candidatos involucrados en producción de leche en un rodeo de bovinos de raza Holando y cruza Holando x Jersey.

- 2015.
69. Sebastiani C, Arcangeli C, Ciullo M, Torricelli M, Cinti G, Fisichella S, et al. Frequencies evaluation of  $\beta$ -Casein gene polymorphisms in dairy cows reared in central Italy. *Animals*. 2020;10(2):1-7.
  70. Rivera D, Valdovinos A, Morales A, Vázquez G, Ponce R, Pérez B. Frecuencias genotípicas y alélicas de la  $\beta$ -caseína en el bovino Criollo Lechero Tropical de México. *Arch Zootec*. 2016;65(65251):251-409.
  71. Andino M de MA y M y M. Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España. 2010; Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/Razas de ganado del catalogo web\\_tcm30-118989.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/Razas%20de%20ganado%20del%20catalogo%20web_tcm30-118989.pdf)
  72. Martínez L. Eliminando los genotipos A1 las ganaderías de vacuno de leche darían un paso de futuro. *Campo Galego* [Internet]. 17 de octubre de 2018; Disponible en: <https://www.campogalego.es/eliminando-los-genotipos-a1-las-ganaderias-de-vacuno-de-leche-darian-un-paso-de-futuro/>

## ANEXOS

**ANEXO I:** Ficha de colecta.



FICHA DE CAMPO

RESPONSABLES COMUNIDAD COORDENADAS		DISTRITO	FECHA PROVINCIA ALTURA	DEPARTAMENTO					
Nº	COD. MUESTRA LABORATORIO	ID (Nº ARETE)	REGISTRO/TATUAJE/ OTROS	SEXO	COLOR	EDAD	PROPIETARIO	Nº FOTO	OBSERVACIONES
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									



**ANEXO II:**

**Tabla 5.** *Coordenadas de los puntos de colecta del departamento de Apurímac.*

Provincia	Comunidad	Coordenadas
<b>Andahuaylas</b>	Huaraccopata	13° 47' 42.6" LS - 73° 22' 06.9" LO
		13° 47' 38.7" LS - 73° 22' 12.1" LO
		13° 47' 39.6" LS - 73° 22' 09.7" LO
		13° 47' 38.8" LS - 73° 22' 07.8" LO
		13° 47' 38.1" LS - 73° 22' 06.7" LO
		13° 47' 37.8" LS - 73° 22' 02.8" LO
		13° 47' 36.1" LS - 73° 22' 03.9" LO
		13° 47' 42.0" LS - 73° 22' 03.9" LO
	Checche	13° 46' 47.1" LS - 73° 21' 27.8" LO
		13° 46' 08.7" LS - 73° 21' 16.4" LO
	Ñahuimpuquio	13° 46' 10.8" LS - 73° 21' 15.0" LO
		Pucullococha
	13° 34' 38.9" LS - 73° 22' 39.9" LO	
	13° 34' 38.6" LS - 73° 22' 37.7" LO	
	13° 34' 47.4" LS - 73° 22' 14.7" LO	
	13° 34' 49.5" LS - 73° 22' 08.9" LO	
	13° 34' 48.0" LS - 73° 22' 10.1" LO	
	13° 34' 52.8" LS - 73° 22' 05.6" LO	
	13° 34' 53.8" LS - 73° 22' 06.4" LO	
	13° 34' 56.0" LS - 73° 22' 07.9" LO	
13° 34' 54.0" LS - 73° 22' 01.8" LO		
13° 34' 49.3" LS - 73° 22' 03.1" LO		
Santa Rosa	13° 34' 15.6" LS - 73° 23' 10.4" LO	
	13° 34' 19.0" LS - 73° 23' 13.1" LO	
	13° 34' 18.3" LS - 73° 23' 14.3" LO	
	13° 34' 16.8" LS - 73° 23' 15.6" LO	
	13° 34' 18.0" LS - 73° 23' 15.5" LO	
13° 34' 19.2" LS - 73° 23' 18.0" LO		
<b>Aymaraes</b>	Jarjanta – Sicuan	14° 09' 08.7" LS - 73° 17' 28.0" LO
		14° 09' 07.2" LS - 73° 17' 26.7" LO
	Janto – Soraya	14° 09' 07.8" LS - 73° 17' 59.2" LO
		14° 09' 34.1" LS - 73° 18' 18.1" LO

**ANEXO III:** Protocolo de extracción de ADN a partir de leucocitos de bovinos con solventes orgánicos.

### **DIA 1**

1. Adicionar 500  $\mu$ L de buffer TE 20:5 al pellet de linfocitos.
2. Adicionar 75  $\mu$ L de SDS 10% (Tratando de no formar espuma).
3. Adicionar 15  $\mu$ L de Proteinasa K y realizar Vórtice suave.
4. Incubar en el termobloque a 56 °C y a 1000 rpm por 3 horas. Verificar que la disolución tenga un volumen homogéneo.
5. Adicionar 500  $\mu$ L de acetato de potasio 3M y realizar vórtice.
6. Refrigerar por 10 minutos a -20 °C.
7. Centrifugar por 15 minutos, a 14000 rpm y 10 °C.
8. Separar todo el sobrenadante en dos tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.
9. Adicionar 500  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y realizar vórtice.
10. Centrifugar por 15 minutos a 14000 rpm a 10 °C.
11. Pasar el sobrenadante a otros dos tubos de microcentrífuga de 1.5 mL (El sobrenadante equivale a la primera fase).
12. Adicionar isopropanol hasta 1.5 mL.
13. Invertir suavemente los tubos hasta visualizar el algodón de ADN.
14. Refrigerar 30 minutos a -20 °C.
15. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a 10 °C. Eliminar el sobrenadante por inversión.
16. Adicionar 300  $\mu$ L de buffer TE 20:5, disolver el pellet y almacenar a 4°C.

### **DIA 2**

17. Adicionar 200  $\mu$ L de acetato de potasio 3M y realizar vórtice.
18. Adicionar 500  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y realizar vórtice.
19. Centrifugar por 15 minutos a 14000 rpm a 10 °C.
20. Pasar el sobrenadante a otros dos tubos de microcentrífuga de 1.5 mL
21. Adicionar 800  $\mu$ L de etanol absoluto helado.

22. Invertir suavemente hasta visualizar el algodón de ADN.
23. Refrigerar por 20 minutos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
24. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
25. Eliminar el sobrenadante por inversión (Teniendo cuidado de no eliminar el pellet).
26. Adicionar  $200\text{ }\mu\text{L}$  de buffer TE 20:5 y verificar que el pellet se disuelva.
27. Adicionar  $8\text{ }\mu\text{L}$  de NaCl 5M y realizar vórtice con los dedos.
28. Adicionar  $420\text{ }\mu\text{L}$  de etanol absoluto helado.
29. Invertir suavemente hasta visualizar el pellet.
30. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
31. Eliminar el sobrenadante por inversión (Teniendo cuidado de no eliminar el pellet).
32. Adicionar  $400\text{ }\mu\text{L}$  de etanol al 70% helado. Vórtice con los dedos hasta desprender el pellet.
33. Centrifugar de 3' - 5' a 14000 rpm a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
34. Eliminar el sobrenadante por inversión (Teniendo cuidado de no eliminar el pellet).
35. Repetir una vez más los pasos del 32 al 34.
36. Adicionar  $400\text{ }\mu\text{L}$  de etanol absoluto helado y realizar vórtice con los dedos hasta desprender el pellet.
37. Visualizar el tamaño de los pellets y asignar el volumen de TE 10:1 en que se resuspenderán posteriormente.
38. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
39. Eliminar el sobrenadante por inversión (Teniendo cuidado de no eliminar el pellet).
40. Dejar secar a temperatura ambiente o en el concentrador de ADN durante aproximadamente 5 minutos a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
41. Verificar que el tubo esté seco antes de resuspenderlo.
42. Resuspender el ADN en buffer TE 10:1, teniendo en cuenta el paso 37.
43. Almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**ANEXO IV:** Protocolo de extracción de ADN a partir de folículos pilosos de bovinos con solventes orgánicos.

### **DIA 1**

1. Adicionar 750  $\mu\text{L}$  de TE 20:5 y 75  $\mu\text{L}$  de SDS.
2. Adicionar 15  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (20 mg/  $\mu\text{L}$ )
3. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de DTT (1M) y homogenizar usando el vórtice.
4. Incubar a 55 °C por 7 horas (Vórtice con los dedos cada 30 minutos).
5. Después de las primeras 02 horas de incubación adicional 50  $\mu\text{L}$  de DTT.
6. Retirar los tubos del termobloque y enfriar por 10 minutos.
7. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de acetato de potasio 3M mezclar haciendo vórtice con los dedos.
8. Refrigerar por 10 minutos a -20 °C.
9. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 10 °C y recuperar al sobrenadante en un tubo de microcentrifuga de 2 mL.
10. Enrazar con cloroformo alcohol isoamílico, homogenizar invirtiendo los tubos manualmente.
11. Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 10 °C y recuperar el sobrenadante en dos tubos de 1.5 ml.
12. Adicionar 800  $\mu\text{L}$  de isopropanol helado e invertir suavemente el tubo para la formación del pellet de ADN. Refrigerar por 15 minutos a -20 °C.
13. Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
14. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de TE 20:5.
15. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de Acetato y 500  $\mu\text{L}$  de Cloroformo alcohol isoamílico (24:1). Hacer vórtice por 1 minuto.
16. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos y recuperar el sobrenadante de las muestras en un solo tubo de microcentrifuga.
17. Adicionar 600  $\mu\text{L}$  de cloroformo alcohol isoamílico (24:1).
18. Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 10 °C y trasvasar el sobrenadante a un solo tubo de microcentrifuga de 1.5 mL.
19. Adicionar 800  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (enrazar a 1.5 mL), invertir suavemente hasta visualizar el algodón de ADN y refrigerar a -20 °C durante 30 minutos.
20. Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos a 10 °C y eliminar el sobrenadante por inversión (Cuidando de no votar el pellet).
21. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de TE 20:5 y mezclar.

## DIA 2

22. Adicionar 8  $\mu\text{L}$  NaCl 5M. Mezclar haciendo vórtice con los dedos.
23. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de etanol helado, e invertir el tubo suavemente hasta que se forme los pellets de ADN dejar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.
24. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a  $10^{\circ}\text{C}$  y eliminar el sobrenadante.
25. Adicionar 400  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente.
26. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a  $10^{\circ}\text{C}$  y eliminar el sobrenadante.
27. Repetir el paso 25 y 26
28. Adicionar 300  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente.
29. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a  $10^{\circ}\text{C}$  y eliminar el sobrenadante
30. Adicionar 400  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (helado).
31. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a  $10^{\circ}\text{C}$  y eliminar el sobrenadante
32. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (helado).
33. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a  $10^{\circ}\text{C}$  y eliminar el sobrenadante
34. Dejar secar en la estufa a  $39^{\circ}\text{C}$  (O/N) o al medio ambiente.
35. Resuspender en buffer TE 10:1 (o en agua libre de nucleasas), de acuerdo con el tamaño del pellet de ADN
36. Almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

**ANEXO V:** Protocolo de extracción de ADN a partir de leucocitos de bovinos con el kit comercial Pure Link® Genomic DNA Mini Kit de Invitrogen.

1. Colocar la muestra biológica en un tubo de 1.5 mL.
2. Adicionar 250  $\mu$ L de buffer TE 20:5, 75  $\mu$ L SDS (10%) y 15  $\mu$ L de proteinasa K (20 ng/ $\mu$ L). Invertir suavemente.
3. Incubar en el termobloque a 56 °C, 3 horas, 1000 rpm. Verificar que la solución sea homogénea (pelet totalmente disuelto).
4. Dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente por 10 min.
5. Añadir 200  $\mu$ L de acetato de potasio 3M. Vórtice. Congelar a -20 °C por 10 min.
6. Centrifugar 15 min, 14 000 rpm a 10 °C.
7. Separar el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
8. Agregar 500  $\mu$ L de cloroformo:alcohol isoamílico.
9. Vórtice, centrifugar 15 min, 14 000 rpm a 10 °C.
10. Separa la fase acuosa a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
11. Agregar reactivos del kit: 200  $\mu$ L lysis binding, 20  $\mu$ L ARNasa y 800  $\mu$ L de etanol absoluto hasta 1.5 mL. Invertir suavemente.
12. Trasladar 640  $\mu$ L (vol. máximo) del lisado a la columna colectora de ADN.
13. Centrifugar 2 min, 10 000 rpm a 10 °C. Eliminar la solución filtrada.
14. Recuperar la columna, ponerlo dentro de un tubo colector y agregar 500  $\mu$ L de la solución Washing 1. Reposar por 5 min.
15. Centrifugar 2 min, 10 000 rpm a 10 °C. Eliminar la solución filtrada.
16. Recuperar la columna, ponerlo dentro de un tubo colector y agregar 500  $\mu$ L de la solución Washing 2. Reposar por 5 min.
17. Centrifugar 3 min, 14 000 rpm a 10 °C. Eliminar la solución filtrada.
18. Trasladar la columna a un tubo de 1.5 mL (final) ya etiquetado, y agregar 100  $\mu$ L de solución de elución. Reposar por 5 min.
19. Centrifugar 1.5 min, 14 000 rpm a 10 °C.
20. Agregar 100  $\mu$ L de solución de elución a otro tubo de 1.5 mL (final). Reposar por 5 min.
21. Centrifugar 2 min, 14 000 rpm a 10 °C.
22. Almacenar a 4 °C (corto plazo) o -20 °C (largo plazo).

**ANEXO VI:** Protocolo de extracción de ADN a partir de folículos pilosos de bovinos con el kit comercial Pure Link® Genomic DNA Mini Kit de Invitrogen.

1. Colocar la muestra biológica en un tubo de 1.5 mL.
2. Adicionar 750  $\mu$ L de buffer TE 20:5, 75  $\mu$ L SDS (10%), 15  $\mu$ L de proteinasa K (20 ng/ $\mu$ L) y 50  $\mu$ L de DTT 1M. Invertir suavemente.
3. Incubar en el termobloque a 56 °C, 4 horas, 1000 rpm. Verificar que la solución sea homogénea (pelet totalmente disuelto).
4. Dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente por 10 min.
5. Añadir 500  $\mu$ L de acetato de potasio 3M. Vórtice. Congelar a -20 °C por 10 min.
6. Centrifugar 15 min, 14 000 rpm a 10 °C.
7. Separar el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
8. Agregar 800  $\mu$ L de isopropanol frío. Invertir suavemente.
9. Vórtice, centrifugar 15 min, 14 000 rpm a 10 °C.
10. Refrigerar a -20 °C durante 30 minutos
11. Centrifugar 3 min, 14 000 rpm a 10 °C y eliminar el sobrenadante.
12. Agregar 200  $\mu$ L de buffer TE 20:5 y verificar que el pelet esté totalmente disuelto.
13. Agregar reactivos del kit: 200  $\mu$ L lysis binding, 20  $\mu$ L ARNasa y 800  $\mu$ L de etanol absoluto hasta 1.5 mL. Invertir suavemente.
14. Trasladar 640  $\mu$ L (vol. máximo) del lisado a la columna colectora de ADN.
15. Centrifugar 2 min, 10 000 rpm a 10 °C. Eliminar la solución filtrada.
16. Recuperar la columna, ponerlo dentro de un tubo colector y agregar 500  $\mu$ L de la solución Washing 1. Reposar por 5 min.
17. Centrifugar 2 min, 10 000 rpm a 10 °C. Eliminar la solución filtrada.
18. Recuperar la columna, ponerlo dentro de un tubo colector y agregar 500  $\mu$ L de la solución Washing 2. Reposar por 5 min.
19. Centrifugar 3 min, 14 000 rpm a 10 °C. Eliminar la solución filtrada.
20. Trasladar la columna a un tubo de 1.5 mL (final) ya etiquetado, y agregar 100  $\mu$ L de solución de elución. Reposar por 5 min.
21. Centrifugar 1.5 min, 14 000 rpm a 10 °C.
22. Agregar 100  $\mu$ L de solución de elución a otro tubo de 1.5 mL (final). Reposar por 5 min.
23. Centrifugar 2 min, 14 000 rpm a 10 °C.
24. Almacenar a 4 °C (corto plazo) o -20 °C (largo plazo).

**ANEXO VII:** Protocolos de amplificación y digestión para el ensayo PCR-RFLP.

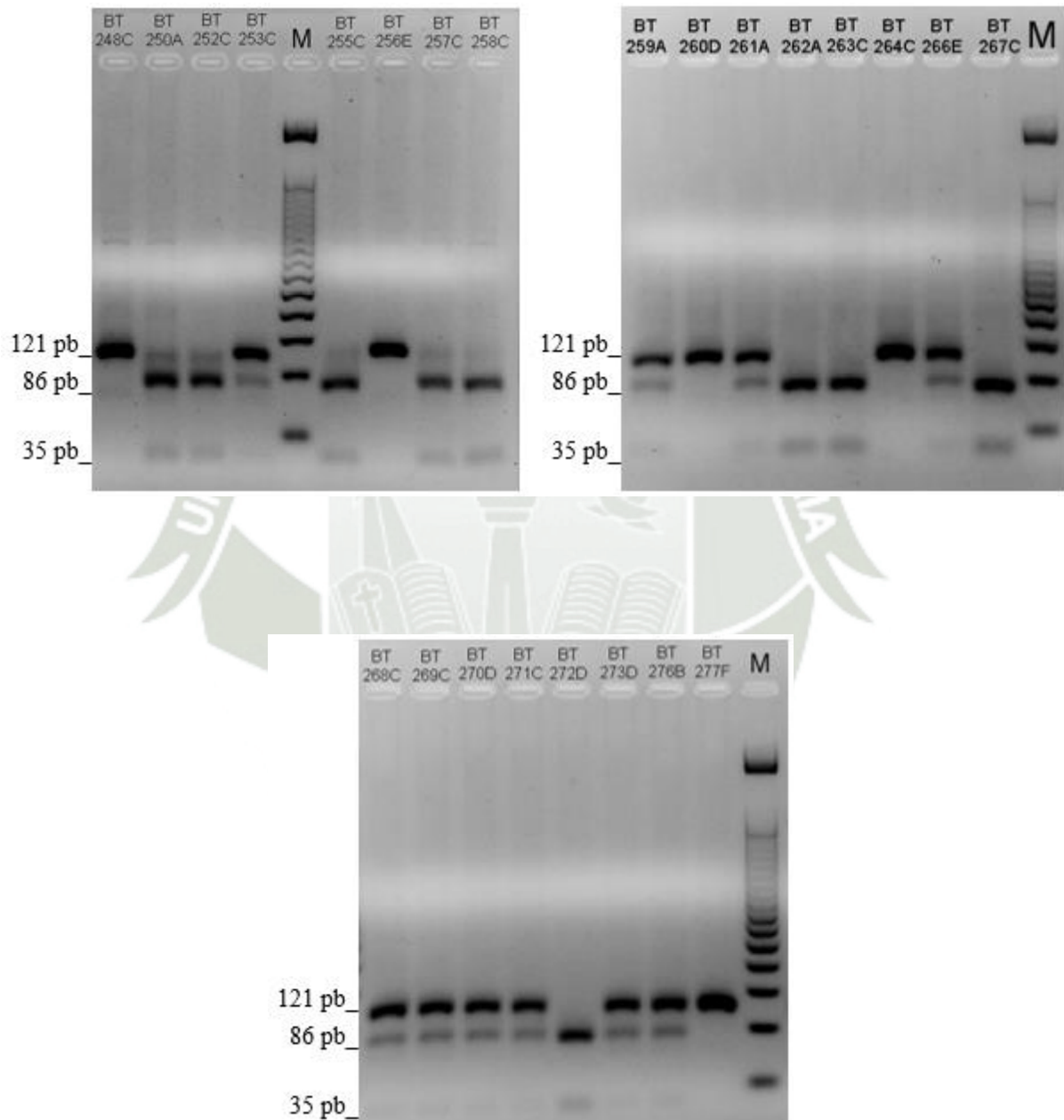
**Tabla 6.** Protocolo de amplificación del fragmento que contiene el SNP rs43703011 del gen CSN2

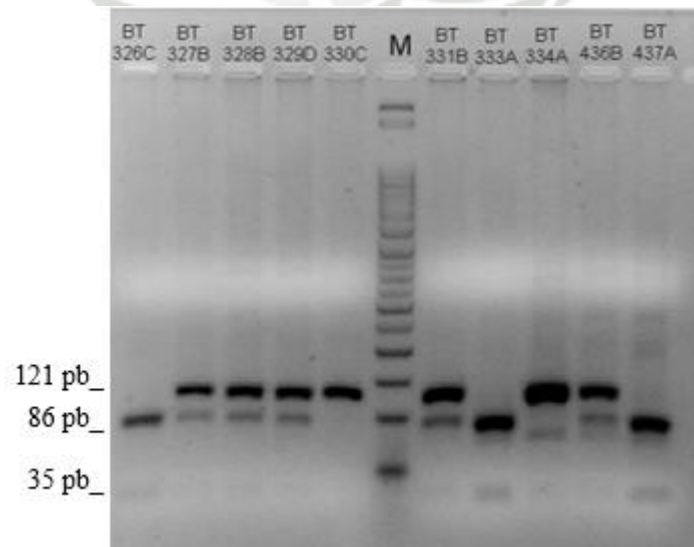
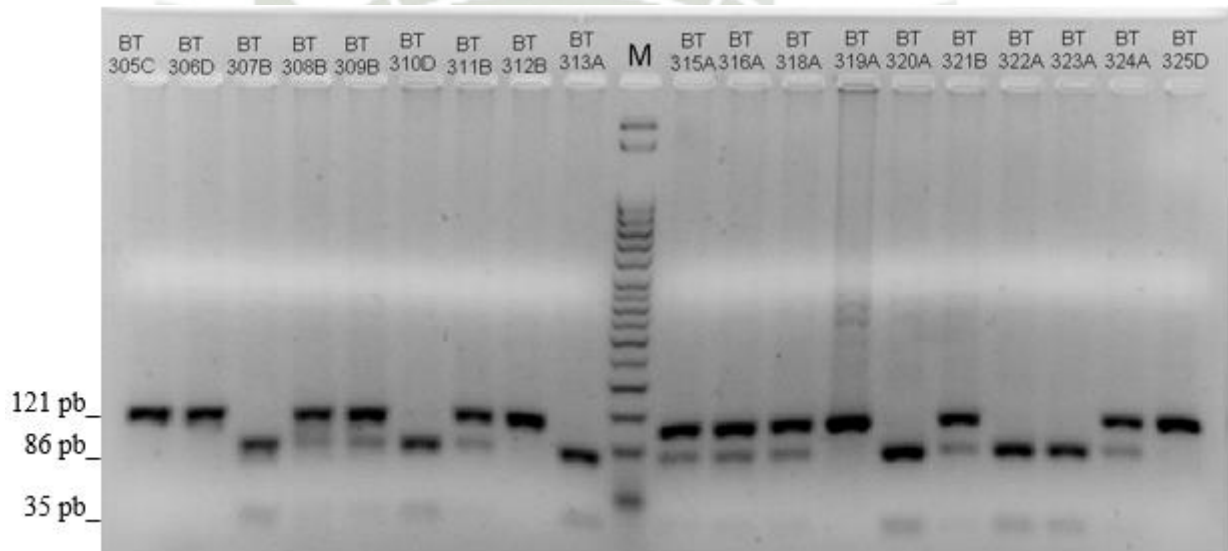
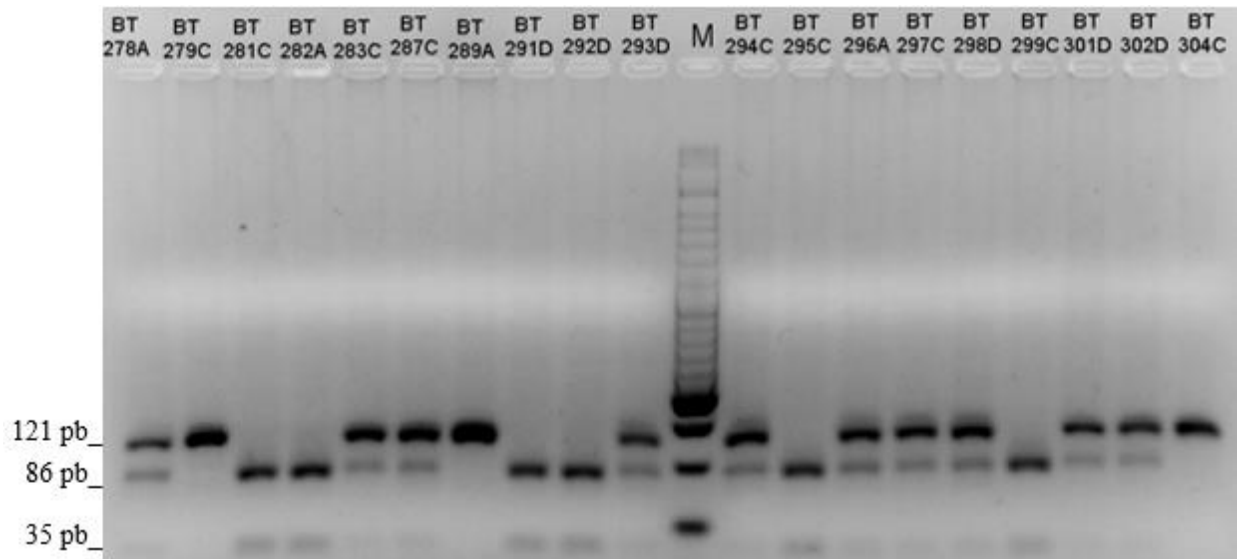
	Con. Stock		Con. Final		1 Rx.	4 Rx.
H2O MQ					5.38	21.5
BUFFER	10	X	1	X	1.5	6
dNTPs	2.5	mM	0.2	mM	1.2	4.8
MgCl2	50	mM	3	mM	0.9	3.6
PRIMER F:	5	μM	0.15	μM	0.45	1.8
PRIMER R:	5	μM	0.15	μM	0.45	1.8
TAQ	5	U	0.025	U	0.125	0.5
						40
DNA	20	ng/μL			5	
Volumen /mix						10
Volumen total					15	

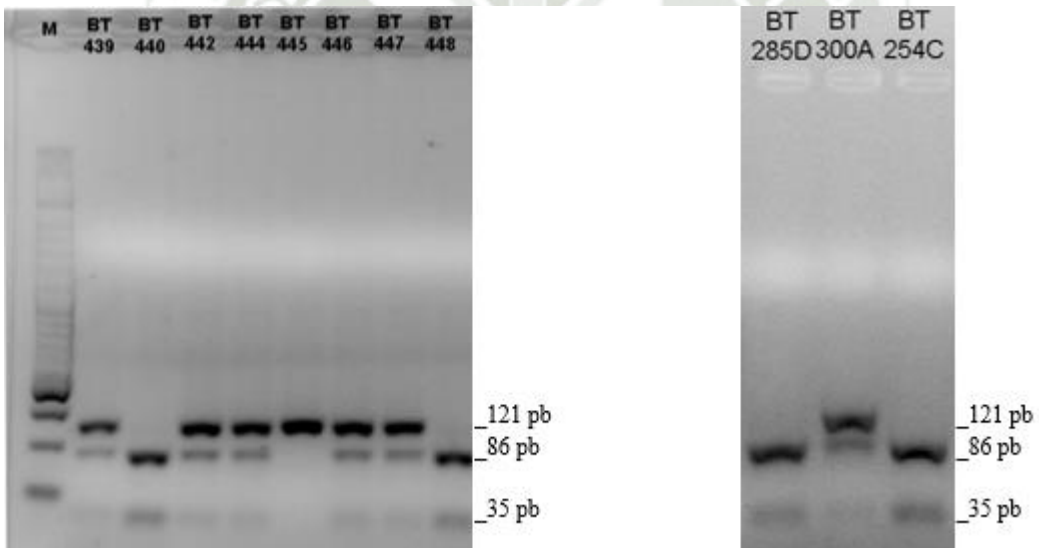
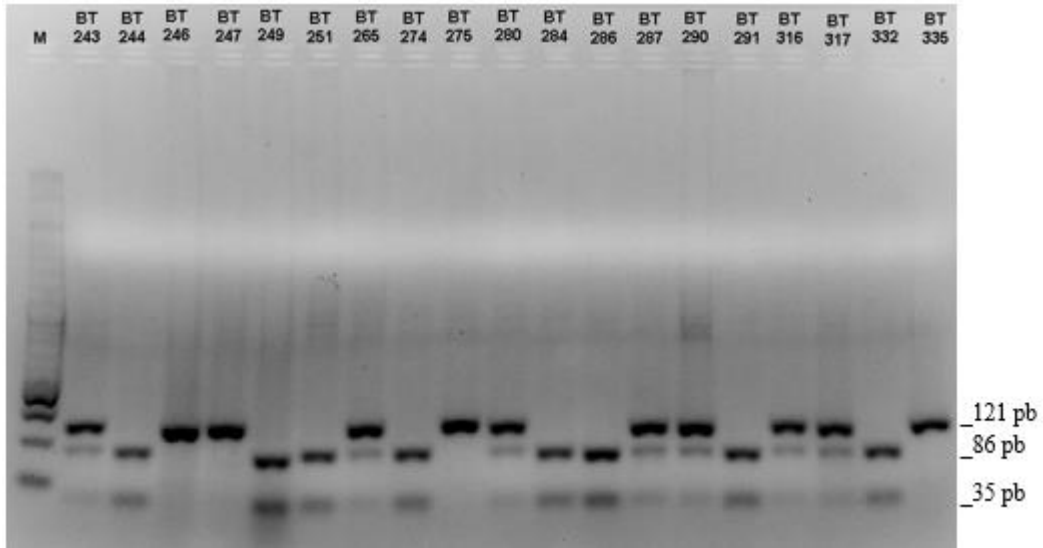
**Tabla 7.** Protocolo de digestión del fragmento amplificado con la enzima DdeI

	Volumen (μL) por Rx.	4 Rx.
H2O MQ	2.11	8.44
BUFFER de restricción (buffer B)	1.40	5.60
Acetilasa BSA (10ug/uL)	0.14	0.56
DDI (10 U/ul)	0.35	1.40
		16.00
Volumen mix	4.00	
Amplificado	10.00	
Volumen total	14.00	

**ANEXO VIII:** Electroforesis de fragmentos obtenidos del ensayo PCR-RFLP para el gen *CSN2* de bovinos raza Holstein. M: marcador de peso molecular (50 pb).







**ANEXO IX:** Electroforesis de fragmentos obtenidos del ensayo PCR-RFLP para el gen *CSN2* de bovinos criollos del departamento de Apurímac. M: marcador de peso molecular (50 pb).

