

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluación genética de los alelos A₁ y A₂ de β -caseína en 5 razas bovinas

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Médica
Veterinaria Zootecnista


Autores:

Karol Priscila Ruiz Alvarez

Carmen Elizabeth Salmerón Jiménez

Director:

Guillermo Emilio Guevara Viera

ORCID:  0000-0003-3832-9090

Cuenca, Ecuador

2024-02-14

Resumen

La producción de leche bovina es la principal fuente de ingreso económico de las familias del Austro ecuatoriano, se considera un producto esencial para el consumo de las mismas. Por este motivo, los ganaderos deben tomar en cuenta la calidad de la leche que producen. La variante A₂ del gen de la β -caseína tiene propiedades benéficas ya que actúa como reductora de triglicéridos y colesterol. Por otra parte, la variante A₁ afecta a los receptores opioides. Es por ello, que se realizó la evaluación genética para determinar la frecuencia de los alelos A₁ y A₂ del gen de la β -caseína en cinco razas bovinas. Así también, se compararon dos conjuntos de cebadores para la identificación de los alelos. Se recolectó un total de 179 muestras sanguíneas de bovinos provenientes de granjas de las provincias del Azuay, Cañar y del Guayas; mediante la PCR se amplificó el gen de la β -caseína a partir del ADN. El cebador seleccionado fue el AS-PCR BC – ASPCR1For para obtener un amplicón de 854 pares de bases, este se utilizó durante todo el análisis de laboratorio debido a que mostró un patrón de bandas mucho más claras y definidas en los resultados de la electroforesis. La frecuencia génica tanto para el alelo A₁ como para el alelo A₂ fue del 50 % y, la frecuencia genotípica del 92 % para los heterocigotos. Por esta razón, se concluye que la población en estudio se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg y no existe consanguinidad entre razas.

Palabras clave: leche de vaca, caseína, alelos, polimorfismo genético



Abstract

The production of bovine milk is the main source of economic income for families in the Ecuadorian Austro, it is considered an essential product for their consumption. For this reason, farmers must take into account the quality of the milk they produce. The A₂ variant of the β -casein gene has beneficial properties as it acts as a triglyceride and cholesterol lowerer. On the other hand, the A₁ variant affects opioid receptors. Therefore, genetic evaluation was performed to determine the frequency of alleles A₁ and A₂ of the β -casein gene in five cattle breeds. Also, two sets of primers were compared for the identification of alleles. A total of 179 blood samples were collected from cattle from farms in the provinces of Azuay, Cañar and Guayas; PCR amplified the β -casein gene from DNA. The primer selected was the AS-PCR BC – ASPCR1For to obtain an amplicon of 854 base pairs, this was used throughout the laboratory analysis because it showed a much clearer and more defined band pattern in the electrophoresis results. The gene frequency for both the A₁ and A₂ alleles was 50% and the genotypic frequency was 92% for heterozygotes. For this reason, it is concluded that the population under study is in the Hardy Weinberg equilibrium and there is no inbreeding between races.

Keywords: cow's milk, casein, alleles, genetic polymorphism



Índice de contenido

Capítulo 1. Introducción	11
1.1. Objetivos	13
1.1.1. Objetivo General	13
1.1.2. Objetivos Específicos	13
Capítulo 2. Revisión Bibliográfica.....	14
2.1. Características y propiedades de la leche	14
2.2. Caseínas	14
2.3. β -caseína	15
2.4. Beta-casomorfina-7 y sus repercusiones en la salud humana	15
2.5. Características de la leche A_2	17
2.5.1. Precio de la leche A_2	17
2.6. Selección genética	18
2.7. Características de cada raza	18
2.7.1. Holstein Friesian	18
2.7.2. Jersey	19
2.7.3. Brown Swiss	19
2.7.4. Brahman	19
2.7.5. Criollo Ecuatoriano	19
2.8. Análisis de laboratorio	20
2.8.1. Extracción de ADN	20
2.8.2. Enzima <i>Taq ADN Polimerasa</i>	20
2.8.3. Cebadores	20
2.8.4. Reacción en cadena de polimerasa	21
2.8.5. Electroforesis	21
2.9 Análisis genético y estadístico	21
2.9.1. Frecuencias génicas y genotípicas.....	21
2.9.2. Heterocigosidad observada.....	22
2.9.3. Heterocigosidad esperada	22
2.9.4. Equilibrio Hardy-Weinberg	22
2.9.5. Estadísticos F de Wright	22
2.9.6. Alelos nulos.....	23
Capítulo 3. Materiales y métodos	24

3.1. Materiales.....	24
3.2. Metodología.....	24
3.2.1. Obtención de las muestras.....	24
3.2.2. Extracción de ADN.....	25
3.2.3. Aislamiento de ADN.....	25
3.2.4. Ajuste de los cebadores a las condiciones para PCR.....	25
3.2.5. Contenido de la premezcla.....	26
3.2.6. Preparación del gel de agarosa.....	27
3.2.7. Electroforesis.....	28
3.2.8. Análisis genético y estadístico.....	28
Capítulo 4. Resultados y Discusión.....	29
4.1. Comparación de cebadores.....	29
4.2. Frecuencias genotípicas y génicas.....	31
4.2.1. Frecuencias genotípicas.....	31
4.2.2. Frecuencias génicas.....	33
4.3. Análisis estadístico.....	34
4.3.1. F de Wright.....	34
4.3.2. Heterocigosidad esperada y observada.....	35
4.3.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	35
4.3.4. Alelos nulos.....	35
Conclusiones.....	37
Recomendaciones.....	38
Referencias.....	39
Anexos.....	49

Índice de figuras

Figura 1. Variantes genéticas de las Caseínas de la leche bovina. Fuente: (Daniloski et al., 2022)	15
Figura 2. Formación de la Beta-casomorfina-7 Fuente:(Priyadarshini et al., 2018)	16
Figura 3. Gel de agarosa observado en el fotodocumentador para ambos cebadores y sus alelos.	29
Figura 4. Gel de agarosa en escala de grises <i>de la electroforesis con las reacciones de PCR, del cebador "A" y cebador "B" (con el mix para el alelo A1 y el mix para el A2) con la mezcla de 10 muestras de ADN genómico con las diferentes temperaturas. MPM (Invitrogen™TrackIt™ 100 bp DNA Ladder Cat. No. 10488058).</i>	30

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes para la elaboración de la premezcla previo a la PCR	27
Tabla 2. Perfil de temperatura empleado en los ensayos de PCR.....	27
Tabla 3. Interpretación de los resultados de la electroforesis en el gel de agarosa	28
Tabla 4. Frecuencias génicas y genotípicas generales	31
Tabla 5. Frecuencias absolutas y relativas en cinco razas bovinas estudiadas.....	32
Tabla 6. Índice de fijación de Wright	35
Tabla 7. Heterocigosidad observada y esperada; Equilibrio de Hardy-Weinberg; Frecuencia de alelos nulos.....	36

Agradecimientos

Solo tengo palabras de agradecimiento hacia mis padres por todo el apoyo brindado, gracias por demostrarme que se puede conseguir todo lo que me proponga sin necesitar de alguien, a mis hermanas por enseñarme a ser fuerte en la vida y que ser débil no es una opción, también quiero agradecer al Dr. Guillermo Guevara por ser un gran ser humano, que desde primer ciclo me ha alentado a tener un mejor rendimiento académico y crecer como persona, gracias por aceptar ser nuestro director de tesis guiándonos de principio a fin, al Dr. Antonio Vallecillo por su paciencia, dedicación y entusiasmo para enseñarnos. A mis compañeros Nicola y Adrián les agradezco por su tiempo y apoyo brindado para dar inicio a nuestro trabajo de titulación y le agradezco infinitamente a mi compañera de tesis y gran amiga en toda esta trayectoria académica Carmen Salmerón.

No puedo estar más feliz por culminar una etapa difícil pero no imposible y estoy segura de que va a ser la primera de muchas metas en mi vida, totalmente agradecida con la Universidad de Cuenca.

Karol Priscila Ruiz Alvarez

Agradezco infinitamente a Dios, a mi madre y hermanos que fueron los que siempre estuvieron a mi lado, alentándome a seguir adelante e impulsando a alcanzar mis sueños y nunca soltaron mi mano, expreso totalmente mi agradecimiento hacia nuestro tutor el Dr. Guillermo Guevara, ya que sin su guía, paciencia y constancia no lo hubiésemos logrado, gracias por compartir sus conocimientos y virtudes haciendo que nuestro transitar en esta etapa de vida sea más amena. A mis amigos Franklin y Erika que nunca nos soltamos los unos a los otros, a Adrián y Nicola que nos impulsaron en esta recta final y por último a la persona que estuvo conmigo desde el día 1, con quien me desvelaba y nos animamos mutuamente para seguir hacia adelante, a mi amiga Karol Ruiz agradecida contigo toda mi vida.

Carmen Elizabeth Salmerón Jiménez

Dedicatoria

Mi trabajo de titulación va dedicado a mis padres y hermanas que son el pilar fundamental de mi vida, son esas personas que me apoyan y alientan cada instante de mi vida para no rendirme.

Karol Priscila Ruiz Alvarez

Sin duda este trabajo está dedicado con todo el amor del mundo para mi madre, María Lastenia Jiménez y Leopoldo Méndez que ha sido mi ángel guardián durante los últimos 15 años de mi vida; sobre todo son mi más grande orgullo y ejemplo de fortaleza. A mi hermana Margarita Salmerón, quien ha sido como una segunda madre para mí, me ha guiado en el transcurso de la vida, con sus palabras de motivación nunca permitió que desista ante las adversidades.

Carmen Elizabeth Salmerón Jiménez

Glosario

β-caseína	Beta caseína
BCM7	Beta-casomorfina 7
Kb	Kilobase
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
X g	Fuerza centrífuga relativa
mM	Mili-molar
nm	Nanómetros
fi	Frecuencia absoluta
hi	Frecuencia relativa
Fis	Coeficiente de consanguinidad, mide el déficit de heterocigotos
Fit	Calcula el déficit de heterocigotos en la población total
Fst	Diferenciación genética
Ho	Heterocigosidad observada
He	Heterocigosidad esperada

Capítulo 1. Introducción

Antes de que se efectúe la domesticación, hace un poco más de 10.000 años las vacas (*Bos taurus*) únicamente producían la variante A₂ de la β -caseína, pero hace aproximadamente 8.000 años existió una mutación genética en el ganado de raza Holstein Friesian, presentándose la proteína β -caseína A₁ y como resultado de la mutación se transmitió a diferentes razas de bovinos lecheros; de esta manera la variante A₁ se volvió dominante en la leche. En cierta área del sur de Europa, África y Asia la producción de leche con la variante A₂ se ha mantenido alta a diferencia del lado occidental que prevalece la variante A₁ (Pasin, 2017).

El codón original de la variante A₂ del gen de la β -caseína que forma el aminoácido Prolina es el CCT, este se modifica a CAT dando como resultado a la Histidina de la variante A₁ dentro de la cadena polipeptídica de la β -caseína en la posición 67 (Oleński et al., 2012). Este cambio en la variante A₂, podría modificar la estructura de la proteína en su conformación secundaria, afectando las micelas de la Caseína y causando vulnerabilidad en la digestión enzimática (Pons, 2015).

En la salud de los seres humanos, la variante A₂ del gen de la β -caseína tiene propiedades benéficas debido a que actúa como reductora de triglicéridos y Colesterol, en cambio el péptido bioactivo (BCM-7) que produce la variante A₁ afecta a los receptores opioides del sistema inmunológico, endócrino y nervioso debido a que tiene una actividad similar a la morfina (Sodhi et al., 2012).

En Estados Unidos, Australia y el norte de Europa, donde la producción láctea en su mayoría se da por las vacas de raza Holstein, tanto la β -caseína A₁ como la A₂ se encuentran presentes en cantidades iguales, más del 50 % de la raza Jersey presenta la variante A₂ de la β -caseína y en el ganado Guernsey la variante A₂ se encuentra presente en más del 90 % (Fatih & Çak, 2018). La frecuencia de los alelos A₁ y A₂ del gen de la β -caseína no es específica de la raza si no de la zona en la que se encuentran los animales, como la región o el país (EFSA, 2009), en ciertas regiones como en el norte de Europa y América del Norte se presenta una frecuencia génica de la variante A₁ de más del 90 % y en Alemania hay una frecuencia del 97 % para la variante A₂ de la β -caseína (Samad, 2016). Según (Mishra et al., 2009) la variante A₂ de la β -caseína se encuentra con mayor frecuencia en el ganado lechero nativo como los búfalos y la variante A₁ en el ganado exótico.

Para realizar la selección genética a favor de la variante A₁ o A₂ del gen de la β -caseína en una granja lechera se debe llevar a cabo un análisis para conocer las características

genéticas de cada uno de los animales del establecimiento o de los que se desee introducir en el hato, para elegir genotipos deseables (Jaiswal & Sarsavan, 2014).

La producción lechera bovina del Ecuador se asienta en un grupo de razas distribuidas en las regiones de la Costa, la Sierra y la Amazonia en dependencia de muchos factores como económicos, topográficos, zootécnicos y otros; sin embargo, no se han estudiado suficientemente los marcadores genéticos relacionados con la producción, características y la calidad de la leche. En las últimas dos décadas países como Nueva Zelanda y Australia han producido y comercializado leche con el genotipo A_2A_2 , debido a la importancia que se le ha dado en los últimos años al estudio de la leche con la variante A_2 ya sea en la parte productiva o de salud, por esta razón el objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de las variantes A_1 y A_2 de la β -caseína e identificar el cebador que muestre un mejor resultado.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

Evaluar la frecuencia de los alelos A_1 y A_2 de la β -caseína en 5 razas bovinas.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Comparar el uso de dos conjuntos de cebadores para la identificación de los alelos A_1 y A_2 del gen de la β -caseína.
- Identificar los alelos A_1 y A_2 en el gen de la β -caseína para contrastar la frecuencia alélica en razas bovinas Holstein Friesian, Jersey, Brown Swiss, Brahman y ganado Criollo Ecuatoriano.

Capítulo 2. Revisión Bibliográfica

2.1. Características y propiedades de la leche

La glándula mamaria bovina es una potente fábrica de grasas, carbohidratos, micronutrientes y síntesis de proteínas. La proteína de la leche tiene un alto valor nutricional y está compuesta por proteína del suero y Caseína, esta última con un 80 %, es uno de los principales parámetros para evaluar la calidad de ésta. La β -caseína constituye aproximadamente el 30 % de la Caseína total de la leche (Bionaz et al., 2012).

El componente graso de la leche es una compleja mezcla de lípidos, en el que el 30 % corresponde a ácidos grasos insaturados y el 70 % a ácidos grasos saturados (Pereira, 2014) estos últimos no son tan deseados ya que se asocia a algunas enfermedades como problemas cardiovasculares, hipercolesterolemia y obesidad (Palombo et al., 2018). No olvidar que también algunos ácidos grasos que constituyen la leche son nutrientes esenciales para la salud humana, ya que estos se incorporan en los fosfolípidos, importantes para la constitución de las membranas celulares (Pulina et al., 2017).

2.2. Caseínas

Se pueden formar un número considerable de polimorfismos a partir de los genes de las proteínas de la leche. En el cromosoma 6 existen los genes autosómicos CSN1S1 (α 1 - caseína), CSN1S2 (α 2 -caseína), CSN2 (β -caseína) y CSN3 (κ -caseína) que codifican a las caseínas y están organizadas en grupo en un tramo de ADN de aproximadamente 200 kb (Daniloski et al., 2022).

Existen reportes de por lo menos 39 variantes genéticas de Caseína bovina, 8 para α 1 - caseína (A, B, C, D, E, F, G y H), 4 para α 2-caseína (A, B, C y D), 15 para β -caseína (A₁, A₂, A₃, A₄, B, C, D, E, F, G, H₁, H₂, I, J, K), y 12 para κ -caseína (A, B, B₂, C, E, F₁, F₂, G₁, G₂, H, I, J) (Gazi et al., 2022) Figura 1. Existen notables diferencias en ocurrencia y frecuencia de las variantes según la especie y raza (Adamov et al., 2020).

Las variantes genéticas de las proteínas de la leche van a diferir por la secuencia de aminoácidos que también afecta el punto isoeléctrico y la carga de las proteínas lo que altera las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las mismas, así como también de la leche y los productos lácteos (Gai et al., 2021).

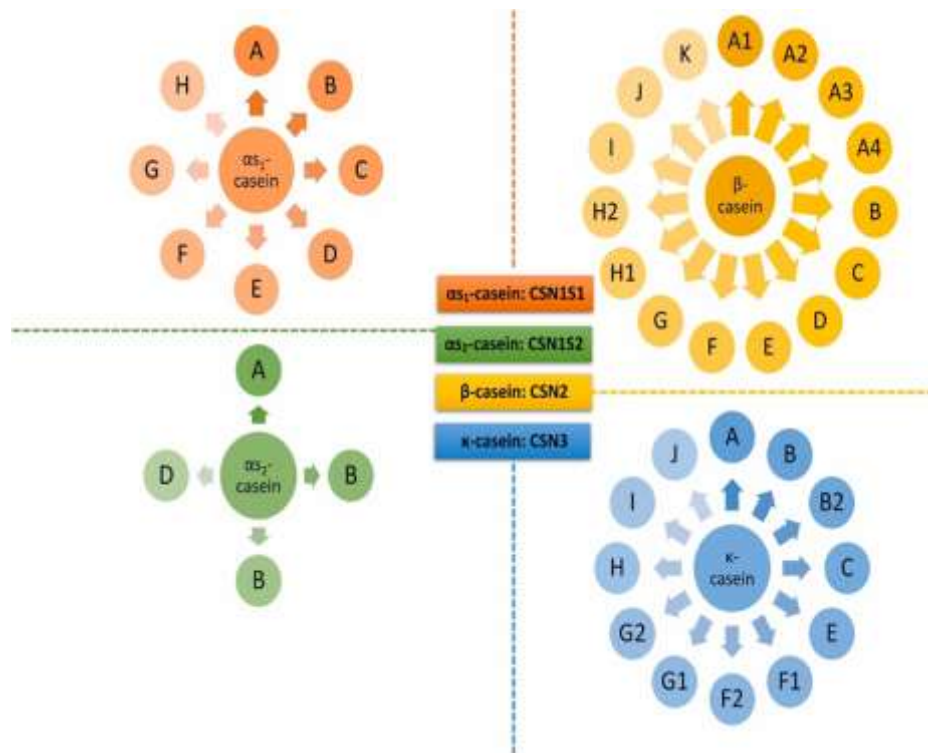


Figura 1. Variantes genéticas de las Caseínas de la leche bovina. Fuente: (Daniloski et al., 2022)

2.3. β -caseína

Del total de la Caseína de la leche, la β -caseína representa entre el 33 % y el 45 % y se considera una proteína intrínsecamente desordenada. Se menciona que la secuencia de aminoácidos de la variante A_2 de la β -caseína es la original, antes de que sucediera una mutación puntual y diera origen a la variante de β -caseína A_1 en algunos rebaños europeos hace miles de años (Daniloski et al., 2021).

La mutación está ubicada en el exón 7 y el sexto cromosoma del gen CSN2, la transferencia de Citosina a Adenina lleva a la sustitución de Prolina por Histidina en la posición 67 en la cadena polipeptídica (Sebastiani et al., 2022). La β -caseína A_1 y A_2 son las variantes secretadas con mayor frecuencia (Farrell et al., 2004).

La evolución de la proteoforma A_1 de β -caseína llevó a la agrupación de las variantes de la β -caseína, es decir, la familia A_2 con las variantes A_2 , A_3 e I de β -caseína, y la familia A_1 con las variantes A_1 , B, y variantes F de β -caseína (Daniloski, et al., 2022).

2.4. Beta-casomorfina-7 y sus repercusiones en la salud humana

La variante A_1 de la β -caseína tiene un aminoácido diferente a la variante A_2 en la posición 67 de la cadena peptídica, la Histidina está presente en la variante A_1 y la Prolina en la

variante A_2 (Jiménez et al., 2022). Este polimorfismo provoca una alteración en la estructura secundaria de la proteína β -caseína (McLachlan, 2001) y en el ADN en el segundo nucleótido del codón 67 hay un cambio de una Citosina de la variante A_2 (CCT) en Adenina de A_1 (CAT) (Summer et al., 2020) Figura 2.

Después de consumir leche con β -caseína A_1 , al momento de la digestión gastrointestinal, en el intestino delgado se libera un péptido bioactivo de 7 aminoácidos denominado Beta-casomorfina-7 (BCM-7) (Padilla & Zambrano, 2021) y cuando se consume leche con la variante A_2 se genera el péptido Beta-casomorfina-9 (BCM-9) que evita la descomposición debido a la presencia de la Prolina. Las Caseínas tienen una función biológica importante, estas transportan el Fosfato y el Calcio para formar un coágulo en el estómago y así tener una correcta digestión (Priyadarshini et al., 2018). Pero al estar presente la BCM-7 liberada por la variante A_1 de la β -caseína, aumenta el tiempo de tránsito del tracto gastrointestinal lo que altera la digestión e induce una respuesta inflamatoria intestinal (Barnett et al., 2014).

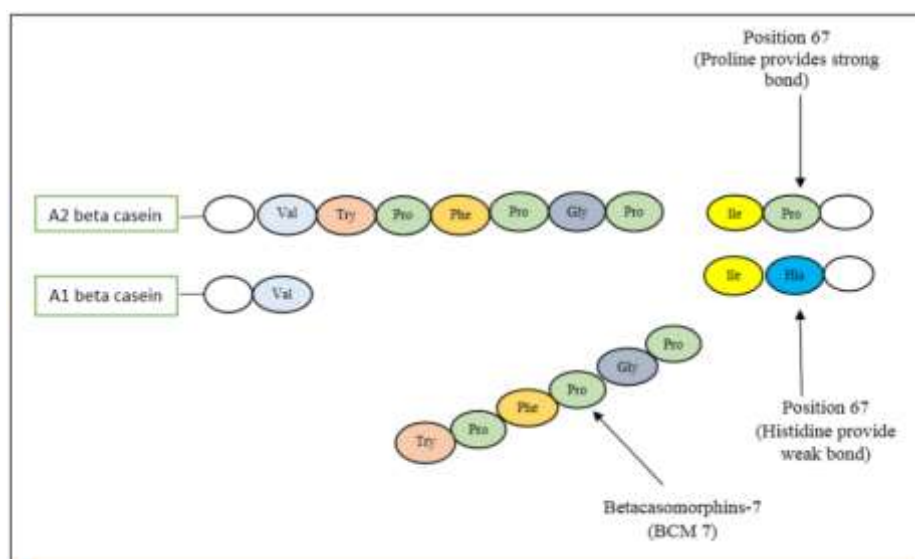


Figura 2. Formación de la Beta-casomorfina-7 Fuente:(Priyadarshini et al., 2018)

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria confirmó que al consumir leche con la variante A_1 que libera Beta-casomorfina, causa un desorden a nivel gastrointestinal, provocando diversos síntomas digestivos como el dolor abdominal, sensación de hinchazón y flatulencias (EFSA, 2009). La población en general relaciona la producción de mucosidad con el consumo de leche, ya que la presencia de la BCM-7 es inducir a la producción de mucinas (Zoghbi et al., 2006).

Se considera que la BCM-7 es la responsable de causar afecciones en la salud de los seres humanos por el consumo de la β -caseína A_1 , esta ocasiona cambios en el sistema endócrino,

inmunológico y nervioso ya que puede afectar a los receptores opioides de estos sistemas (Priyadarshini et al., 2018). La BCM-7 es un péptido opioide que se puede unir a receptores opioides tanto de tejidos neuronales como no neuronales (Jiménez et al., 2022).

La leche que contiene la variante A₁ de la β -caseína es un factor de riesgo para ciertas enfermedades en los seres humanos, como la Diabetes tipo 1, síndrome de muerte súbita, arteriosclerosis, enfermedad coronaria, esquizofrenia y autismo (Kadam et al., 2017; Priyadarshini et al., 2018).

2.5. Características de la leche A₂

Se espera que durante los próximos años el consumo mundial de leche y productos lácteos incremente por parte de la población (OCDE / FAO, 2017), aunque desde el año 1970 en ciertas zonas geográficas como la Unión Europea y Estados Unidos los habitantes han perdido el interés por la leche (Madigan & Washburn, 2016). Por esta razón el sector lácteo está buscando alternativas que sean novedosas para los consumidores y de esta manera aumentar la rentabilidad (Fernández et al., 2022), en el año 2003 se creó Nueva Zelanda A₂ Milk Company Limited, esta tiene como objetivo la producción de leche y productos lácteos únicamente con la variante A₂ de la β -caseína (Mayer et al., 2021), esto incentivó a los ganaderos alrededor del mundo a producir leche libre de la variante A₁ (Urrutia et al., 2019). Ciertos mamíferos como vacas, ovejas, cabras y los humanos tienen la presencia de la variante A₂ de la β -caseína codificada en su ADN (Fernández et al., 2022).

En el año 2022 se realizó un estudio de las características sensoriales y la composición fisicoquímica de la leche A₂ en comparación con la leche A₁ y la única diferencia que se encontró fue que la leche con la variante A₂ mostró un color que es más deseable para los consumidores, este es un color cercano al estándar de oro (de Vitte et al., 2022). Pero esta leche también tiene una característica negativa con relación a las propiedades de coagulación del cuajo (Amalfitano et al., 2019), debido a que la variante A₂ de la β -caseína es más soluble y menos hidrofóbica que la variante A₁ (Nguyen et al., 2015). Por esta razón, para la producción de la leche A₂ se debe tomar en cuenta que tiene una mayor rentabilidad al vender como leche entera, más no como productos derivados como yogurt o queso (Bisutti et al., 2022).

2.5.1. Precio de la leche A₂

En un estudio realizado en Italia a 1277 personas que consumen leche, se determinó que el 47 % de los encuestados que son habitantes de dicho país están dispuestos a pagar 1,99 euros por cada litro de leche A₂ (Bentivoglio et al., 2020) En Brasil se realizó una encuesta a

un grupo de discusión de 15 personas que consumen leche, en el cual se reveló que solo el 38 % está dispuesto a pagar un precio extra por la leche A_2 (Oliveira et al., 2019). La empresa “The A_2 milk company” que comercializa leche A_2 asegura que paga un seguro del 5 al 7 % a los proveedores agrícolas del Reino Unido, Australia y Nueva Zelanda (Anchor, 2022).

2.6. Selección genética

Si en una explotación se realiza selección genética para tener un genotipo A_2A_2 de la β -caseína en el hato, primero necesita un análisis de los animales (Yamada et al., 2021), y si se selecciona a favor de la variante A_2 y se elimina la presencia de la variante A_1 de la β -caseína se obtendría una explotación con una producción lechera únicamente A_2A_2 (Urrutia et al., 2019).

Para obtener mejores resultados en la selección con programas de mejoramiento genético se utiliza semen de toros con el genotipo A_2A_2 (Morris et al., 2005), y es una tendencia de mercado en Europa, América del Norte y China (Madigan & Washburn, 2016). Actualmente existen empresas dedicadas a comercializar únicamente este semen, ya que da un valor agregado a los productores y ganaderos (Fernández et al., 2022). Se considera que el uso del semen A_2A_2 es una de las estrategias más útiles para la reconversión de un rebaño, se puede utilizar semen sexado, incrementar la tasa de reposición voluntaria de vacas (Urrutia et al., 2019), así como también realizar la selección de terneros A_2 para reemplazo, de esta manera se tendría una reconversión más rápida del hato (Fernández et al., 2022).

Al momento de realizar la selección genética, si la frecuencia de la variante A_2 de la B-caseína se acerca al 50 % se considera que el animal es apto para la selección (Sebastiani et al., 2020). Si en el rebaño se tienen animales con un 12 % de frecuencia del genotipo A_2A_2 sin utilizar semen sexado se puede demorar aproximadamente 18 años para obtener un rebaño con este genotipo, en el caso de utilizar semen sexado para la reposición se tardará aproximadamente 9 años en tener animales con el genotipo A_2A_2 y se reduciría el tiempo a 6 años en el caso de duplicar la tasa de reposición de las vacas con el genotipo A_1A_1 y A_1A_2 en un 70 a 80 % (Urrutia et al., 2019).

2.7. Características de cada raza

2.7.1. Holstein Friesian

Esta raza es el resultado de la cruce de bovinos de color negro de Alemania con bovinos de color blanco de Holanda, las vacas Holstein Friesian son originarias de los Países Bajos hace unos 2.000 años aproximadamente (Elischer, 2014). Actualmente es una de las razas más

reconocidas por su alta producción lechera con un porcentaje menor de proteínas y grasa butírica a comparación de otras razas lecheras (Britannica, 2023). Con respecto a la frecuencia génica de la variante A₁ y A₂ de la β -caseína en la raza Holstein es un 50 % para cada uno de los alelos (Summer et al., 2020).

2.7.2. Jersey

Esta raza se originó hace más de 200 años en una isla británica llamada Jersey que se encuentra al sur del Canal de la Mancha, en esta isla todavía existen bovinos Jersey de raza pura y se tiene informes del ganado Jersey del año 1.771, esta es considerada una de las razas lecheras más antiguas (Huson et al., 2020). Esta raza bovina es muy apreciada por la cantidad de sólidos totales que contiene su leche, más no por la cantidad de leche que produce (Reynolds, 2020). Esta raza tiene una frecuencia alélica de la variante A₂ de la β -caseína del 60 % (Priyadarshini et al., 2018).

2.7.3. Brown Swiss

Esta raza es considerada una de las más antiguas a nivel mundial, es originaria de los Alpes Suizos aproximadamente en el año 4.000 a.C., era considerada como de triple propósito, para leche, carne y animal de tiro (BSA, 2014). Es una de las razas más populares debido a que su leche tiene alto contenido de grasa y proteínas, ideal para la elaboración de quesos (Elischer, 2016).

2.7.4. Brahman

Este ganado *Bos indicus* es originario de la India hace aproximadamente 4.000 años, esta raza es el resultado de la cruce de 4 razas cebú indias. Las vacas de la raza Brahman son consideradas como animales para producción de carne y se adaptan bien a climas subtropicales secos y tropicales húmedos (Leatherwood, 2016). Han sido muy empleadas en cruzamientos con Holstein y otras razas para mejorar la adaptación a climas cálidos (Gonzalez, 2016).

2.7.5. Criollo Ecuatoriano

El ganado Criollo Ecuatoriano es descendiente de ganado originario de distintos lugares y con una variable constitución genética, estos animales llegaron en el año 1.493 correspondiente al segundo viaje de Cristóbal Colón, este bovino fue traído por los españoles en el siglo XVI a América (Méndez et al., 2002). El ganado Criollo es un animal en el que no

se ha realizado ninguna mejora a nivel genético a lo largo de los años (Cevallos, 2012). INEC (2022) realizó una encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria y se analizó el número de cabezas de ganado vacuno por raza y muestra un resultado de que el ganado criollo predominó con un 23,33 % con respecto a las 5 razas restantes. En el Ecuador, los trabajos de investigación sobre el ganado criollo son muy escasos y, específicamente, en el tema de la β -caseína resultan nulos. Por lo tanto, es necesario abordar estudios sobre la frecuencia de ésta en el ganado Criollo.

2.8. Análisis de laboratorio

2.8.1. Extracción de ADN

Se puede utilizar distintos tejidos para la extracción de ADN como fluidos corporales, sangre, pelo, aspirado directo de citología con aguja fina, entre otros métodos. La extracción se realiza mediante métodos físicos y químicos con el objetivo de purificar el ADN, este método permite separar el ADN de las proteínas, membranas y otros componentes celulares mediante lisis celular y la solubilización del ADN. Existen varias técnicas para realizar extracción de ADN como el método de adsorción con membrana de gel de Sílice, el método orgánico de Fenol-Cloroformo y el inorgánico con salado y tratamiento con Proteinasa K; con cualquiera de las técnicas que se utilice se debe obtener una buena cantidad y calidad de ADN (Gupta, 2019).

2.8.2. Enzima *Taq ADN Polimerasa*

En el PCR la enzima *Taq ADN polimerasa* es la que más se utiliza por su termoestabilidad, para que tenga mayor efectividad se utiliza la concentración, entre 0,2 a 1,0 mM es la concentración que se usa con mayor frecuencia (Tamay de Dios et al., 2013). Pons (2015) en su estudio para la determinación de la frecuencia del alelo A_2 de la β -caseína en pajillas de toros lecheros de raza Holstein, en el PCR utilizó 0,2 U de la enzima DreamTaq Polimerasa.

2.8.3. Cebadores

Es un fragmento corto de ADN monocatenario fundamental para empezar la síntesis de ADN utilizado en el PCR ya que tiene la capacidad de replicar y amplificar el ADN de interés (Sourav, 2023). Para esta técnica se utilizan 2 cebadores, un cebador directo y un cebador inverso, el cebador directo va a ir en la dirección 3'-5' que corresponde a la hebra molde de elongación de ADN y el cebador inverso va a ir en sentido contrario, es decir, de 5'-3' , este va a guiar la síntesis de la cadena complementaria (Riveroll, 2022).

2.8.4. Reacción en cadena de polimerasa

Es una técnica eficaz y eficiente en la que se realiza una amplificación, que consta de copiar de forma rápida pequeñas secuencias específicas de ADN o ARN de interés para estudiarlo detalladamente, dentro de esta técnica se utilizan cebadores, que son fragmentos sintéticos cortos, que tiene como objetivo la amplificación del segmento deseado en varias sesiones de síntesis de ADN (Kosarikov, 2023).

2.8.5. Electroforesis

Técnica que utiliza corriente eléctrica con la finalidad de separar proteínas, ARN o ADN en función de su tamaño y carga eléctrica, desplazándolas a través de un gel ya sea de poliacrilamida o gel de agarosa o de otra matriz, permite que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las moléculas más grandes por los poros del gel (Smith, 2023). Se desplazan hacia el ánodo (+) las moléculas que poseen carga negativa y hacia el cátodo (-) las moléculas con carga positiva (Megía, 2022).

Para determinar la concentración de ADN se realiza la medición de la absorbancia de 230 a 320 nm mediante una espectrofotometría con luz UV. Los nucleótidos, el ARN, el ssDNA y el dsDNA se absorben a 260 nm que equivale aproximadamente 50g/ml de ADN de doble cadena. Para evaluar la pureza del ADN y ARN se realiza mediante una relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}) y en caso de que se mayor a esto podría considerar la presencia de proteínas, Fenol y otros contaminantes (Sousa, 2017).

Para estimar la abundancia relativa de moléculas de ADN en un gel, se puede evaluar mediante la intensidad relativa, es decir el grosor de las bandas observadas, ya que es proporcional a la cantidad de ADN y la tinción realizada. Una banda oscura y gruesa indica una gran cantidad de ADN en la muestra, mientras que una banda delgada y tenue muestra lo contrario. La presencia de múltiples bandas indica la presencia de varias moléculas, mientras que una sola banda indica una sola molécula de ADN en la muestra (Teixeira et al., 2020). Para considerar una muestra de ADN como íntegra, las bandas en el gel de agarosa deben ser definidas, y la pérdida de calidad se reflejaría en vestigios a lo largo del gel (Sousa, 2017).

2.9 Análisis genético y estadístico

2.9.1. Frecuencias génicas y genotípicas

Esto se denomina a todas las veces que observamos un alelo dentro de una población y se puede utilizar para describir la información genética existente dentro de una población (Rusell, 1993).

2.9.2. Heterocigosidad observada

Grupo de individuos con un par de alelos diferentes dentro de una población (Casalla, 2003). Es el cálculo de la proporción de organismos heterocigotos desde la observación de genotipos de una población en estudio (Tripp, 2009).

2.9.3. Heterocigosidad esperada

Hace referencia a la proporción de individuos que se espera que sean heterocigotos dentro de una población (Casalla, 2003). Es el cálculo de la probabilidad de que, al tomar 2 alelos al azar, estos sean diferentes (Hernández & Trejo, 2014).

2.9.4. Equilibrio Hardy-Weinberg

También conocido como equilibrio panmítico, este concepto fue descrito de forma independiente por el matemático inglés Godfrey Hardy y el obstetra Wilhelm Weinberg en 1908. Este cálculo permite pronosticar el futuro de una población a partir de su situación actual, así como interpretar la frecuencia de genotipos y alelos de generaciones anteriores (Duhovnikoff & Leventhal, 2016).

Cuando existe un elevado número de individuos dentro de una población, donde la reproducción permanezca aleatoria entre los mismos sin que exista intervención de ninguna fuerza evolutiva, van a permanecer estables las proporciones alélicas de generación en generación sin presencia de factores perturbadores, considerándose que esta población está en equilibrio (Edwards, 2008).

Entonces, el equilibrio de Hardy-Weinberg menciona que, si una población permanece bajo ciertas condiciones, persistirán constantes sus frecuencias alélicas a través del tiempo, para esto se debe cumplir con algunas condiciones: que exista un flujo genético, que no se den perturbaciones genéticas, que sea infinito el tamaño de la población, sobre todo que se efectúe entre los individuos una reproducción aleatoria y que sea una selección natural. Cuando en el equilibrio de Hardy-Weinberg p-valor es mayor a 0,05 significa que no hay diferencia significativa, esto quiere decir que no hay una fijación en sus alelos y que las poblaciones están en equilibrio. La frecuencia de su genotipo se mantendrá inmutable en el tiempo sin presentar alteraciones (Kalmes & Huret, 2001).

2.9.5. Estadísticos F de Wright

Uno de los estadísticos de Wright está representado por las siglas FST, con el cual se puede determinar la correlación existente y el grado de diferencia genética entre los genes de la población y subpoblación total (Balding et al., 2007), el valor resultante de FST debe estar

entre 0 y 1, el primer valor indica que en todas las poblaciones hay una frecuencia alélica igual y el valor de 1 se interpreta como que la población en estudio se encuentra fija en alelos diferentes (Piñero et al., 2008).

El estadístico FIS permite saber la correlación que existe entre los genes de la subpoblación y de cada individuo (Balding et al., 2007), en cambio FIT es un estadístico que permite partir el coeficiente de endogamia de una población que está subdividida (Wright, 1949).

2.9.6. Alelos nulos

Estos están presentes cuando la técnica de genotipado que se utiliza no muestra la presencia de los alelos verdaderos, esto sucede cuando las secuencias flanqueantes donde los cebadores se unen varían. Cuando se da esta situación, si es homocigoto aparece como dato faltante en la genotipificación o también puede aparecer como un aparente homocigoto cuando en realidad es heterocigoto con un alelo visible (De Meeûs, 2018).

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

Para llevar a cabo esta investigación se utilizaron materiales físicos, químicos y biológicos. Dentro de los materiales físicos utilizados fueron tubos con anticoagulante EDTA, equipo vacutainer, hielera, pipetas automáticas, puntas de pipeta, vortex mixer, tubos eppendorf (0,2 ml - 1,5 ml - 2 ml), centrifuga, baño maría, balanza, cámara de electroforesis, microondas, incubadora, termociclador, fotodocumentador, probeta y un matraz.

Como materiales químicos se utilizaron dos cebadores, como cebador “A” se utilizó el AS-PCR (BC – ASPCR1For) de 854 pares de bases y como cebador “B” se utilizó el Allele specific PCR (BC – ASPCR2Rev) de 244 pares de bases. Además, se utilizó agua destilada, agua grado biología molecular, la enzima Proteinasa K, Cloroformo, Isopropanol, Etanol al 70 %, agarosa, Tris acetato EDTA (Buffer TAE 1X), Bromuro de etidio, buffer de carga 6X, sulfato de magnesio, enhancer, dNTPs, enzima *Taq ADN polimerasa* y el marcador de peso molecular. Como materiales biológicos se utilizaron muestras sanguíneas de 5 razas bovinas para estudio, Holstein Friesian, Jersey, Brown Swiss, Brahman y de ganado Criollo Ecuatoriano.

3.2. Metodología

3.2.1. Obtención de las muestras

En la presente investigación se analizaron un total de 179 muestras sanguíneas de cinco razas bovinas, de las cuales 30 fueron de la raza Holstein Friesian, 27 de Jersey, 29 Brown Swiss, 37 Brahman y 56 de ganado Criollo Ecuatoriano de la sierra sur, tomadas aleatoriamente de ambos sexos y diferentes edades.

En cuanto a las razas, las muestras sanguíneas de Holstein Friesian fueron recolectadas en 10 granjas lecheras del cantón Cuenca de la provincia del Azuay; de la raza Brahman fueron recolectadas en el cantón Balao perteneciente a la provincia del Guayas; las muestras del ganado Criollo Ecuatoriano se obtuvieron de granjas de 8 sectores diferentes del páramo sur de la serranía ecuatoriana. En cuanto a la raza Jersey y Brown Swiss fueron recolectadas en 2 granjas ubicadas en la provincia de Cañar.

Se recogieron asépticamente las muestras sanguíneas (8 - 10 ml) mediante la utilización del equipo vacutainer, con una punción en la vena coccígea en animales grandes y de la vena yugular en terneros, recolectadas en tubos con anticoagulante EDTA y fueron transportadas en una hielera al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias

de la Universidad de Cuenca a una temperatura de 4 °C en un lapso menor a 24 horas. Todas las muestras fueron rotuladas y registradas con un número consecutivo, lugar, fecha y raza, se tomaron 500 µL de cada muestra en tubos eppendorf de 2 ml para su almacenamiento (-80 °C).

3.2.2. Extracción de ADN

El ADN genómico se aisló a partir de sangre total, se utilizó el método estándar de extracción con Fenol-Cloroformo. Las muestras sanguíneas fueron descongeladas y luego lavadas con 1 ml de agua destilada. A continuación, se homogeneizaron en el vórtex durante aproximadamente 5 segundos y se centrifugaron a 14.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación de 10 minutos, se eliminó el sobrenadante de los tubos y se dejó solo la pastilla. Este proceso se repitió para obtener la pastilla, al cual se le añadió buffer de lisis. Luego, se agregaron 50 µL de la enzima Proteinasa K (50 mg/ml) a cada muestra y se incubaron en baño maría a 70 °C durante una hora para permitir que la enzima actuara. Posteriormente, las muestras se mezclaron en el vórtex. Finalmente, se aumentó la temperatura a 95 °C durante 10 minutos y los tubos con las muestras se centrifugaron durante el mismo tiempo.

3.2.3. Aislamiento de ADN

Se tomó 1 ml de cada una de las muestras y se colocó en un tubo eppendorf, se añadió 700 µl de solvente (Cloroformo) con la finalidad de separar los contaminantes, luego las muestras fueron mezcladas en el vortex y centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante de estas muestras y al resultante se le adicionaron 480 µl de Isopropanol para precipitar el ADN, posteriormente se centrifugó y se desechó el líquido para obtener el ADN. Por último, a las muestras se les agregó Etanol al 70 % para retirar las partículas de sales y una vez más se centrifugó por un lapso de 5 minutos, el líquido fue desechado y se dejaron secar los tubos con contenido de ADN.

3.2.4. Ajuste de los cebadores a las condiciones para PCR

En el presente estudio se eligieron 10 muestras al azar de ADN de los animales de la raza Jersey, esta fue una mezcla de ADN genómico que se utilizó para identificar los dos alelos de la β -caseína con la finalidad de ajustar las condiciones de PCR para así obtener una mejor lectura en la electroforesis. Se utilizaron cinco diferentes temperaturas para cada uno de los cebadores para poder evaluar cuál dio una mejor amplificación y con qué temperatura.

Los cebadores que se utilizaron fue el cebador "A" que es el AS-PCR (BC-ASPCR1For) de 854 pares de bases, como cebador inverso para el alelo A₁ de 5'-

GATGTTTTGTGGGAGGCTGTTAT-3', cebador inverso para el alelo A₂ de 5'-GATGTTTTGTGG-GAGGCTGTTAG-3' y como cebador directo de 5'-GCCCAGAT-GAGAGAAGTGAGG-3' (Firouzamandi et al., 2018) y como cebador "B" se utilizó el Allele specific PCR (BC – ASPCR2Rev) de 244 pares de bases, como cebador directo para el alelo A₁ de 5'-CTTCCCTGGGCCCATCCA-3' y para el alelo A₂ de 5'-CTTCCCTGGGCCGATCCC-3' y como cebador inverso común de 5'-AGACTGGAGCAGAGGCAGAG-3' (Raja et al., 2023).

Se colocaron 50 µl de agua grado biología molecular a cada uno de los tubos que contenían las muestras. Se pusieron las muestras por un lapso de 10 minutos en la incubadora a 55 °C para que se disuelva el ADN y pueda mezclarse con el agua. Se colocaron 250 µl de agua grado biología molecular en cada tubo con el cebador que es la dilución recomendada por el fabricante, se centrifugó por un par de segundos para que se incorpore el contenido. Para desarrollar el posterior estudio (PCR), únicamente se utilizaron 50 µl del cebador diluido.

Cabe mencionar que cada conjunto de cebadores contiene 3 tubos, uno que es el cebador común, el otro para el alelo A1 y el siguiente para el alelo A2. Se procedió a mezclar el cebador común con el cebador para el alelo A1 y ese cebador común con el cebador para el alelo A2 y de la misma manera con el segundo conjunto de cebadores (B).

El cebador que se eligió para identificar los alelos de la β-caseína y utilizar durante todo el estudio es el cebador "A" y se descartó el cebador "B" debido a que no mostró una amplificación clara y se eligió la temperatura de 61.5 °C.

3.2.5. Contenido de la premezcla

En la siguiente tabla se detalla cada uno de los componentes que se utilizaron para la premezcla previo a la PCR.

Premezcla	
Reactivo	Cantidad
Agua grado biología molecular	80,75 µl
Buffer de reacción	12,5 µl
Potenciador	12,5 µl

Sulfato de magnesio	5 μ l
dNTPs	1,25 μ l

Tabla 1. Componentes para la elaboración de la premezcla previo a la PCR

De las 10 muestras que se escogieron de la raza Jersey se tomaron 5 μ l de cada una de ellas y se colocaron en un solo tubo, esto para asegurarnos que se amplifique con cada cebador; de esta mezcla solo se tomaron 10 μ l y se colocó en cada tubo donde estaba la premezcla, luego se adicionó 1 μ l de la enzima *Taq ADN Polimerasa*, esta se colocó al final por la alta sensibilidad de la enzima; finalmente se obtuvo ADN + Premezcla + Enzima. Esta mezcla final de ambos conjuntos de cebadores tanto para A₁ como para A₂ (4 mezclas) se dividió en 5 tubos y se compararon con 5 diferentes temperaturas (50 °C, 54.4 °C, 57.9 °C, 61.5 °C y 64 °C), para realizar la PCR durante una hora y media. El procedimiento se efectuó hasta encontrar una temperatura óptima para una mejor lectura de la corrida electroforética, Tabla 2.

Perfil de temperaturas de amplificación			
Pasos	Tiempo	Temperatura °C	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	4 minutos	94	-
Desnaturalización	30 segundos	94	35
Alineamiento	25 segundos	61,5	
Extensión	25 segundos	72	
Extensión final	5 minutos	72	-
Almacenamiento	-	37	-

Tabla 2. Perfil de temperatura empleado en los ensayos de PCR.

3.2.6. Preparación del gel de agarosa

Para visualizar los ensayos de PCR de cada una de las muestras se empleó electroforesis de geles de agarosa con una concentración de 1,2 % diluidos en 90 ml y de 30 ml de buffer TAE 1x, esto para realizar el análisis de ADN de los 179 animales en estudio.

Una vez aforada la cantidad necesaria de buffer TAE 1X se colocó en un matraz para luego ser mezclado con la agarosa, esto se calentó en el microondas en ciclos de 10 segundos hasta su completa disolución. Una vez que el contenido estuvo transparente y la temperatura de la solución bajó lo suficiente para sujetar el matraz con la mano se añadió 1 μ L de Bromuro

de etidio (Reactivo fluorescente) por cada 30 ml de buffer TAE 1X y se esperó aproximadamente 20 minutos hasta su solidificación.

3.2.7. Electroforesis

Para la electroforesis se preparó el gel de agarosa de 90 ml al 1,2 %, para preparar dicho gel se agregó 1,08 g de agarosa y 90 ml de buffer TAE 1X. Posteriormente se tomaron 5 μ L del buffer de carga 6X y se colocó en los tubos de PCR con las muestras, una vez colocado el buffer se centrifugó y se mezcló con la pipeta automática. Se tomaron 10 μ L de la mezcla de cada una de las muestras y fue colocado en cada pocillo del gel, al final de cada fila de muestras se colocaron 5 μ L del marcador de peso molecular. Una vez colocadas las muestras en los pocillos se procedió a realizar la electroforesis por un lapso de tiempo de 35 minutos a 100 Voltios. Pasados los 35 minutos se puso el gel de agarosa en el fotodocumentador para observar los resultados. Una vez que se obtuvo el producto de PCR corrido en electroforesis se decidió utilizar durante todo el estudio el cebador de 854 pares de bases a una temperatura de 61,5 °C.

Para interpretar los resultados del gel de agarosa se realizó un gel tanto para la variante A_1 como para la variante A_2 de la β -caseína. Si el carril se marca en el gel con el cebador para el alelo A_1 , se considera positivo para A_1 y negativo para A_2 y de la misma manera para la interpretación del gel con el cebador para el alelo A_2 , Tabla 3.

A_1	A_2	Interpretación
+	+	Heterocigoto
+	-	Homocigoto A_1
-	+	Homocigoto A_2

Tabla 3. Interpretación de los resultados de la electroforesis en el gel de agarosa

3.2.8. Análisis genético y estadístico

Se realizaron los análisis estadísticos para el alelo A_1 y el alelo A_2 en el gen de la β -caseína, en donde las frecuencias genotípicas y génicas se obtuvieron mediante la contabilización y cálculo directo. Los otros análisis estadísticos se ejecutaron en dos programas donde se evaluaron ciertos parámetros genéticos. Con el software Genepop versión 4.5 se realizó el análisis del equilibrio Hardy-Weinberg y de los alelos nulos. Con Genetix 4.05 se analizaron los estadísticos F de Wright, la heterocigosidad esperada y la heterocigosidad observada.

Capítulo 4. Resultados y Discusión

4.1. Comparación de cebadores

Mediante un análisis electroforético del conjunto de cebadores “A” y “B” se evaluó la capacidad de identificar de manera precisa y clara la presencia de los alelos A_1 y A_2 de la β -caseína, una vez que los fragmentos fueron separados se observó el resultado en el gel de agarosa, Figura 3 y se analizó la definición de cada una de las bandas que se encuentran en él, de esta manera se evaluó así el uso de dos cebadores para el alelo A_1 y el A_2 de la β -caseína.

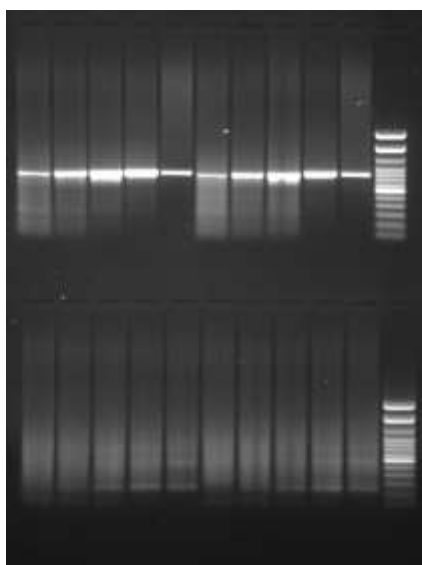


Figura 3. Gel de agarosa observado en el fotodocumentador para ambos cebadores y sus alelos.

Como han recomendado (Tamay de Dios et al., 2013) para determinar la especificidad de la reacción, el tamaño de las bandas se compara con el marcador de peso molecular.

Al observar el gel de agarosa, las bandas superiores pertenecientes al cebador “A” son más claras y mejor definidas. No obstante, para tener más claridad se analizó el mismo gel con una fotografía a escala de grises en la Figura 4.

En las 5 primeras bandas de la figura 4 (correspondientes a los carriles de las 5 temperaturas, Tabla 2), se observa el resultado del alelo A_1 y las siguientes para el alelo A_2 en cada uno de los cebadores. En la parte superior se ubica el cebador “A” y en la inferior el cebador “B”, se aprecia una clara diferencia entre los dos, el “A” es el que mostró un patrón de bandas mucho más claras y definidas.

El carril 4 con una temperatura de 61,5 °C tanto para el alelo A₁ como para el alelo A₂ correspondiente al cebador “A” (AS-PCR BC – ASPCR1For de 854 pares de bases) muestra un patrón de bandas más preciso para una mejor lectura, por esta razón se utilizó esta temperatura y cebador.

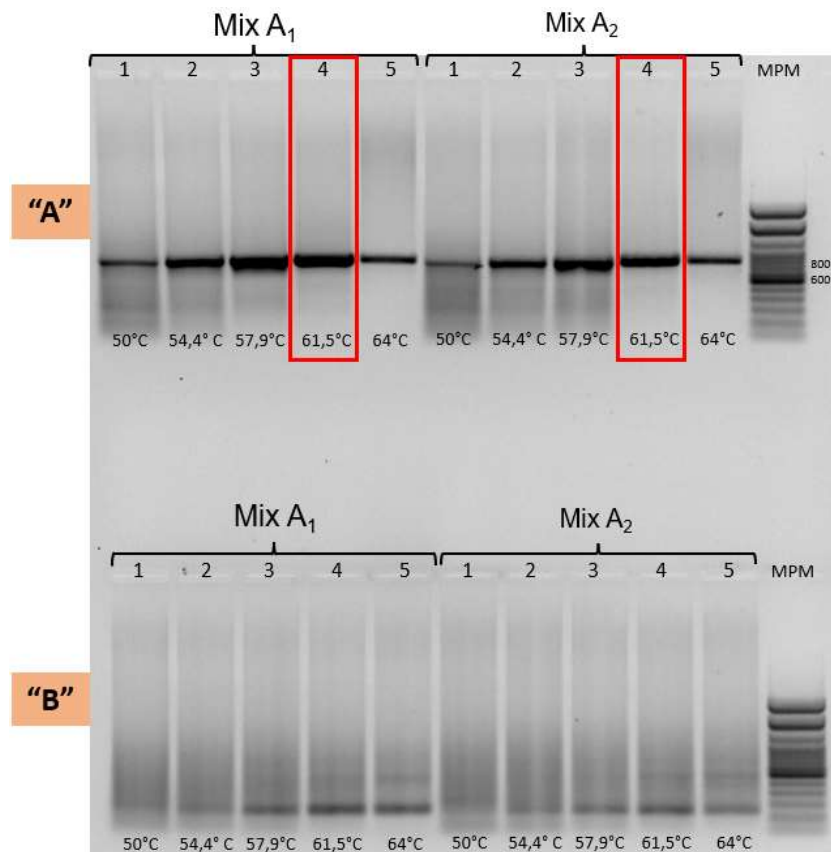


Figura 4. Gel de agarosa en escala de grises de la electroforesis con las reacciones de PCR, del cebador “A” y cebador “B” (con el mix para el alelo A₁ y el mix para el A₂) con la mezcla de 10 muestras de ADN genómico con las diferentes temperaturas. MPM (Invitrogen™ TrackIt™ 100 bp DNA Ladder Cat. No. 10488058).

Para una correcta selección de cebadores se toman en cuenta ciertos parámetros en los resultados de la electroforesis como el patrón de bandeo que se proyecta en la imagen del gel de agarosa tomada en el fotodocumentador (Manzano, 2017). Para considerar específico el ensayo de PCR se debe observar una banda clara en cada carril del gel y si las bandas no presentan una buena definición va a disminuir la calidad de las muestras y mostrará resultados equívocos (Sousa, 2017).

Los cebadores utilizados en el presente estudio difieren con los diseñados por (McLachlan, 2006) con su investigación “Vacas reproductoras y ordeñadoras para obtener leche libre de β-caseína A₁” y que ha sido descrito en diversas publicaciones como es el caso de (Pons,

2015) en “Pajillas de toros lecheros de la raza Holstein Friesian” para determinar la frecuencia del alelo A_2 de la β -caseína”, donde utilizaron como cebador delantero 5'-CTTCTTTCCAGGATGAACTCCAGG-3' y como cebador reverso 5'-GAGTAAGAGGAGGGATGTTTTGTGGGAGGCTCT-3' de 121 pares de bases.

En un análisis realizado por Giglioti et al (2020) para la detección del alelo A_1 de la β -caseína en muestras de leche A_2 con un método de alta sensibilidad, realizaron electroforesis en gel de agarosa al 2 % y Pons (2015) realizó electroforesis en gel de agarosa al 4 %, a diferencia de este estudio que se utilizó el 1,2 % de concentración.

4.2. Frecuencias genotípicas y génicas

Como se muestra en la Tabla 4, la frecuencia genotípica absoluta presentó un total de 164 heterocigotos y 15 homocigotos, sin presentar diferencia entre los homocigotos. En cuanto a la frecuencia génica absoluta se observó una cantidad similar tanto para el alelo A_1 como para el alelo A_2 .

	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Génica	
	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2	A_1	A_2
Frecuencia absoluta	8	164	7	180	178
Frecuencia relativa	0,045	0,916	0,039	0,503	0,497

Tabla 4. Frecuencias génicas y genotípicas generales

4.2.1. Frecuencias genotípicas

En esta investigación se obtuvieron los resultados de homocigotos y heterocigotos y existió una diferencia del 83,2 %, este difiere con Sebastiani et al. (2020) que presentó una diferencia del 10,97 %, de Yamada et al. (2021) con un 14 % y de (Şahin & Boztepe, 2022) que obtuvo un 8 %; todos ellos con una diferencia a favor de los homocigotos. Rivera et al. (2016) presentó un 56 % de diferencia a favor de los heterocigotos, estos valores se asemejan a este trabajo.

Según Ayaz et al. (2022), en un estudio realizado en Pakistán en ganado local, exótico y cruzado, se evaluó la raza Achai y Lohani y alcanzaron el 100 % para el genotipo A_2A_2 .

Como se muestra en la Tabla 4 donde se detallan los valores generales de las frecuencias, se puede evidenciar que existe una diferencia genotípica considerable a favor de los heterocigotos, no obstante, en cuanto a las frecuencias génicas son muy similares. Con estos

resultados nos podemos dar cuenta como se ha ido moldeando en el tiempo la diversidad genética en el ganado lechero.

Las frecuencias relativas para heterocigotos de las 5 razas bovinas que se muestran en la Tabla 5, presentaron resultados parecidos, con más del 90 % de heterocigosidad, a excepción del ganado Criollo Ecuatoriano que mostró un valor menor. El ganado Criollo Ecuatoriano difiere en un 8 % del Brahman y entre un 12 y 13 % de las otras razas *Bos taurus*. Cabe recalcar que el alelo A_2 es el alelo original y el alelo A_1 es una mutación con alta presencia en poblaciones de bovinos de origen europeo, es por esto que la expansión de la variante A_1 del gen de la β -caseína tuvo como objetivo inicial la producción láctea según las preferencias del mercado y las decisiones de cría selectiva del ganado (Zúñiga, 2022).

En cuanto a los homocigotos, la raza Jersey mostró un 4 %, Brown Swiss 3 %, Brahman un 8 %, Holstein Friesian 3 % y con un valor mayor el ganado Criollo Ecuatoriano con un 16 % de homocigosidad. Con respecto a las frecuencias génicas de cada una de las razas, se obtuvieron resultados semejantes entre ambos alelos como se muestra en la Tabla 5.

Razas	Frecuencias genotípicas						Frecuencias génicas			
	A_1		$A_1 A_2$		A_2		$A_1 (p)$		$A_2 (q)$	
	fi	hi	fi	hi	fi	hi	fi	hi	fi	hi
Holstein Friesian	0	0,00	29	0,97	1	0,03	29	0,48	31	0,52
Jersey	1	0,04	26	0,96	0	0,00	28	0,52	26	0,48
Brown Swiss	1	0,03	28	0,97	0	0,00	30	0,52	28	0,48
Brahman	2	0,05	34	0,92	1	0,03	38	0,51	36	0,49
Criollo Ecuatoriano	4	0,07	47	0,84	5	0,09	55	0,49	57	0,51

Tabla 5. Frecuencias absolutas y relativas en cinco razas bovinas estudiadas

En el estudio realizado por Sebastiani et al. (2020) en la raza Holstein Friesian italiana se evaluó el polimorfismo del gen de la β -caseína con una frecuencia genotípica A_2A_2 del 36,96 %, el genotipo A_1A_1 tuvo un 9,8 % y un 35,79 % de heterocigosidad. Yamada et al. (2021) probaron un ensayo de PCR Cycleave para detectar las variantes A_1 y A_2 del gen de la β -caseína a través del pelo en vacas Holstein donde se evidenció un 17 % del genotipo A_2A_2 , el 50 % de A_1A_1 y el 33 % de A_1A_2 . Así también en un análisis realizado en Turquía en ganado Holstein mostraron resultados de un 53 % para homocigotos y un 47 % para heterocigotos según Şahin & Boztepe (2022), a diferencia de lo que se evidenció en esta investigación, un

porcentaje menor de homocigotos y mayor cantidad de heterocigotos, resultados que se relacionan con la falta de interés hacia las ventajas que tiene la variante A_2 de la β -caseína, aunque no necesariamente se asocia con una mayor producción láctea en comparación con la β -caseína A_1 , esta puede tener otros impactos potenciales en la composición y las propiedades de la leche.

En los datos reportados por Ayaz et al. (2022) en diferentes regiones de la provincia de Khyber Pakhtunkhwa - Pakistán, el ganado de la raza Jersey presentó un 82 % de homocigosidad y una heterocigosidad del 18 %; al igual que Şahin & Boztepe (2022) que alcanzó el 63 % de homocigotos y 37 % de heterocigotos, en cuanto a la raza Brown Swiss llevada a cabo en la misma publicación, la frecuencia genotípica para A_2A_2 y A_1A_1 fue de un 41 % y 15 % respectivamente, estos valores son superiores a los resultados del presente estudio en homocigotos. También evaluó a la raza Simmental y obtuvo el 28 % para el genotipo A_2A_2 , un 16 % para A_1A_1 y 56 % para A_1A_2 .

En la región del Papaloapan - México Manzano (2017) analizó a 142 vacas de cruza de *Bos taurus* x *Bos indicus*, donde se mostró una diferencia del 20 % a favor de los homocigotos, pero genéticamente es similar al resultado de este trabajo. A diferencia de Pinheiro et al. (2021) en Brasil analizaron a 283 vacas de raza Guzarat y con un 80 % del genotipo A_2A_2 y un 90 % del alelo A_2 observándose claramente una predominancia de este alelo.

En un estudio realizado en la India en 618 animales de 15 razas distintas de ganado Cebú Indio solo se encontró el genotipo A_2A_2 y A_1A_2 sin la presencia del A_1A_1 , al igual que Rangel et al. (2017). La frecuencia genotípica de las 15 razas de ganado *Bos Indicus* para A_2A_2 fue de un 97 % y solo un 2 % del genotipo A_1A_2 . En Brasil se evaluó un total de 348 animales dirigido por Schettini et al (2019), todos de raza Sindhi (*Bos indicus*) donde reflejó una frecuencia genotípica de un 90 % para A_2A_2 , un 9 % para A_1A_2 y tan solo el 1 % para A_1A_1 , estos resultados son contrarios a lo encontrado en el presente estudio.

Según Rivera et al. (2016) en Ganado Criollo Lechero Tropical de México, la frecuencia genotípica de A_2A_2 fue del 13 %, para el genotipo A_1A_1 el 9 % y los A_1A_2 con un 78 %, estos datos son similares a la presente investigación, solo con un 6 % de diferencia tanto en heterocigotos como en homocigotos.

4.2.2. Frecuencias génicas

Rivera (2014) y Pons (2015) mencionan que a nivel mundial existe una tendencia con respecto al aumento de la frecuencia génica para el alelo A_2 en los hatos lecheros, esto difiere con una publicación de Irán, donde las frecuencias génicas fueron del 50 % para el alelo A_2 y

50 % para el alelo A_1 , (Cieślińska et al., 2019), semejante a los resultados génicos de esta investigación y en Turquía en la provincia de Konya y Kütahya (Şahin & Boztepe, 2022), se analizaron muestras de ganado de la raza Holstein, con frecuencias génicas idénticas a las de la Tabla 5.

Como mencionan Sebastiani et al. (2020) en la raza Holstein Friesian italiana para el alelo A_2 su frecuencia fue del 60,65 %, el alelo A_1 con una frecuencia del 30,39 % y el porcentaje restante fue de las otras variantes alélicas de la β -caseína; A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , B, C e I. El alelo A_2 superó en un 8 % y el alelo A_1 fue inferior en un 18 % a lo encontrado en este trabajo. Una situación similar se presenta en el trabajo de Ayaz et al. (2022) donde obtuvieron una frecuencia génica de A_2 del 64 % y la de A_1 del 36 %, semejante a datos de Polonia, Dinamarca, Italia y Países Bajos (Cieślińska et al., 2019).

Según Şahin & Boztepe (2022) en el ganado Jersey, encontraron una frecuencia génica de A_2 del 79 % y para el alelo A_1 del 21 %, estos difieren con los valores de la presente investigación con un 30 % más del alelo A_2 y un 31 % menos del alelo A_1 . También evaluaron a la raza Brown Swiss que presentó una frecuencia génica de A_2 del 63 % y del 37 % de A_1 , de igual manera presenta una mayor frecuencia en el alelo A_2 a comparación de los datos presentados en la Tabla 5.

En las frecuencias génicas publicadas por Schettini et al. (2020), en ganado Sindhi, el alelo A_2 presentó un 94 % y un 6 % para el alelo A_1 , así mismo Mishra et al. (2009) encontraron una frecuencia génica del 99 % para A_2 y el 1 % para el alelo A_1 en ganado Cebú hindú. Estos valores son similares a las razas cebú anteriormente citadas, pero difieren del Brahman estudiado.

En México en Ganado Criollo Lechero Tropical obtuvieron un 48 % para el alelo A_1 y el 52 % para el alelo A_2 , (Rivera et al., 2016), estos valores son similares a los resultados en el ganado Criollo Ecuatoriano, los resultados de esta raza comparada con las otras en estudio, presenta un valor más alto en el gen A_2 esto puede deberse a que los bovinos criollos no están bajo un sistema de selección genética (Zúñiga, 2022).

4.3. Análisis estadístico

4.3.1. F de Wright

El índice de fijación de Wright en cada uno de los valores de F presenta signo negativo como se muestra en la Tabla 6, esto indica un exceso de heterocigotos (Pardo et al., 2015). El promedio encontrado del estadístico Fis fue de -0,832, este valor indica que hay un exceso de heterocigotos dentro de cada población. El estadístico Fit muestra la cantidad de

heterocigotos en el total de la población en estudio y mostró un promedio de -0,835 y el estadístico F_{st} con un promedio de -0,0013 indica que no existe diferenciación genética. Los resultados de F que se encuentran en la Tabla 6 indican que no hay consanguinidad entre estas poblaciones estudiadas.

Estadísticos F de Wright			
Razas	Fis	Fit	Fst
Holstein Friesian	-0,809	-0,812	-0,0018
Jersey	-0,813	-0,815	-0,0015
Brown Swiss	-0,810	-0,813	-0,0016
Brahman	-0,828	-0,831	-0,0013
Criollo Ecuatoriano	-0,901	-0,902	-0,0005

Tabla 6. Índice de fijación de Wright

4.3.2. Heterocigosidad esperada y observada

Cuando la heterocigosidad esperada es mayor a la heterocigosidad observada se considera que existe un exceso de heterocigotos (Tripp 2009). Esto coincide con los datos expuestos en la Tabla 7.

4.3.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Cuando la p - valor es mayor a 0,05 en el equilibrio de Hardy-Weinberg nos indica que no hay diferencia significativa y por lo tanto las poblaciones se encuentran en equilibrio ya que no hay una fijación alélica. Al estar estas en equilibrio, nos da el indicio de que tanto su genotipo como la frecuencia se mantendrán constantes en el tiempo, sin presentar mutaciones (Kalmes,2001).

4.3.4. Alelos nulos

Al realizar el análisis de los resultados de los alelos nulos Tabla 7, se observa que 3 de las razas en estudio muestran valores diferentes a 0, estos resultados indican que existen alelos que no se amplificaron en el PCR por dificultades técnicas o por mutaciones (Shaw et al., 1999). Estos valores pueden causar una subvaloración de la heterocigosidad, ya que pueden existir alelos nulos que se amplifiquen como homocigotos y que realmente sean heterocigotos, esto puede dar resultados equívocos (Carlsson, 2008).

Población	He	Ho	EHW (P-valor)	Frecuencia estimada de alelos nulos
Holstein Friesian	0,499	0,967	1,000	0,183
Jersey	0,499	0,963	1,000	0,000
Brown Swiss	0,499	0,966	1,000	0,000
Brahman	0,500	0,919	1,000	0,164
Criollo Ecuatoriano	0,500	0,839	1,000	0,299

Tabla 7. Heterocigosidad observada y esperada; Equilibrio de Hardy-Weinberg; Frecuencia de alelos nulos.

Conclusiones

En conjunto cada uno de los datos que se obtuvo en este trabajo de investigación ha mostrado información relevante sobre la población ganadera del Ecuador, en cuanto a la frecuencia de las variantes de la β -caseína de las razas seleccionadas para el análisis de datos.

El trabajo reveló que la población estudiada está en equilibrio de Hardy Weinberg, debido a que la frecuencia fue la misma para los dos alelos, sin existir superioridad de un alelo sobre otro, pero hubo un predominio de heterocigotos A_1A_2 del gen de la β -caseína en toda la población analizada.

El cebador A descrito por Firouzamandi et al. (2018) fue el que nos permitió obtener resultados claros y bien definidos en la electroforesis para la identificación de los alelos analizados del gen de la β -caseína.

En las 5 razas consideradas en este trabajo investigativo se presentaron valores más altos de heterocigosidad observada que de heterocigosidad esperada, con una distancia mínima entre ellas, sin encontrar endogamia entre cada una de las razas. En cuanto a los alelos nulos, se observó que el ganado criollo ecuatoriano presentó una frecuencia superior con relación a las otras razas.

Recomendaciones

Se recomienda utilizar el cebador A descrito por Firouzamandi et al. (2018) para la identificación de los alelos A₁ y A₂ del gen de la β -caseína.

En una ganadería, al tener identificado el alelo A₁ y A₂, permite realizar mejoras genéticas y un programa de selección para mejorar el alelo que se desea, con el fin de obtener progenies homocigotas para el alelo seleccionado. Se sugiere excluir la variante A₁ del gen de la β -caseína debido a los problemas que causa en la salud humana y se recomienda estudiar la variante A₂ con relación a la producción y calidad de la leche.

Para la identificación de los alelos A₁ y A₂ de la β -caseína, se podría considerar el uso de la técnica ARMS-PCR, utilizada en el trabajo de investigación de Vigolo et al. (2022), ya que es una técnica rápida menos costosa y que requiere menos experiencia técnica

Referencias

- Adamov, N., Atanasov, B., Ilievska, K., Nikolovski, M., Dovenska, M., Petkov, V., & Dovenski, T. (2020). Allele and Genotype Frequencies of the Kappa-Casein (CSN3) Locus in Macedonian Holstein-Friesian Cattle. *Macedonian Veterinary Review*, *43*(1), 45–54. <https://doi.org/10.2478/macvetrev-2020-0013>
- Amalfitano, N., Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., Malacarne, M., Summer, A., & Bittante, G. (2019). Milk protein fractions strongly affect the patterns of coagulation, curd firming, and syneresis. *Journal of Dairy Science*, *102*(4), 1–15. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15524>
- Anchor. (2022). *The A2 Milk™ difference*. The A2 Milk Company Investor Website. <https://a2milk.nz/about-us/>
- Ayaz, Muhammad, S., Ahmad, I., Tariq, M., Khan, R., Ijaz, A., Ahmad, I., Hasnain, M., Ali, F., Khan, K., & Khan, A. (2022). Detection of A2A2 genotype of beta casein protein (CSN2) gene in local, exotic and cross bred cattle in Pakistan. *Animal Biotechnology*. <https://doi.org/10.1080/10495398.2022.2031204>
- Balding, D., Bishop, M., & Cannings, C. (2007). Handbook of Statistical Genetics. In *Genes, Brain and Behavior* (Third edit, Vol. 7, Issue 7). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1111/j.1601-183x.2008.00424_7.x
- Barnett, M., McNabb, W., Roy, N., Woodford, K., & Clarke, A. (2014). Dietary A1 β -casein affects gastrointestinal transit time, dipeptidyl peptidase-4 activity, and inflammatory status relative to A2 β -casein in Wistar rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *65*(6), 720–727. <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.898260>
- Bentivoglio, D., Finco, A., Bucci, G., & Staffolani, G. (2020). Is there a promising market for the A2 milk? Analysis of Italian consumer preferences. *Sustainability*, *12*(17), 1–16. <https://doi.org/10.3390/SU12176763>
- Bionaz, M., Hurley, W., & Looor, J. (2012). Milk Protein Synthesis in the Lactating Mammary Gland: Insights from Transcriptomics Analyses. In W. Hurley (Ed.), *Milk Protein* (pp. 286–324). InTech. <https://doi.org/10.5772/46054>
- Bisutti, V., Pegolo, S., Giannuzzi, D., Mota, L., Vanzin, A., Toscano, A., Trevisi, E., Ajmone, P., Brasca, M., & Cecchinato, A. (2022). The β -casein (CSN2) A2 allelic variant alters milk protein profile and slightly worsens coagulation properties in Holstein cows. *Journal*

of Dairy Science, 105(5), 3794–3809. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21537>

Britannica. (2023). Holstein-Friesian. In *Encyclopedia Britannica*. The Editors of Encyclopaedia. <https://www.britannica.com/animal/Holstein-Friesian>

BSA. (2014). *The history of Brown Swiss*. Brown Swiss Association. <https://www.brownswissusa.com/Breed/History/tabid/89/Default.aspx>

Casalla, R. (2003). *Medición de distancias genéticas en poblaciones de camarón blanco* [Escuela Superior Politécnica del Litoral]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/8664/D-60597CasallaDaza.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Cevallos, O. (2012). *Caracterización morfoestructural y faneróptico del bovino Criollo en la provincia de Manabí, Ecuador* [Universidad de Córdoba]. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/raza_criolla/71-criollo_ecuador.pdf

Cieślińska, A., Fiedorowicz, E., Zwierzchowski, G., Kordulewska, N., Jarmołowska, B., & Kostyra, E. (2019). Genetic Polymorphism of β -Casein Gene in Polish Red Cattle—Preliminary Study of A1 and A2 Frequency in Genetic Conservation Herd. *Animals*, 9(377), 1–5. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani9060377>

Daniloski, D., Cunha, N., McCarthy, N., O'Callaghan, T., McParland, S., & Vasiljevic, T. (2021). Health-related outcomes of genetic polymorphism of bovine β -casein variants: A systematic review of randomised controlled trials. *Trends in Food Science and Technology*, 111, 233–248. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.073>

Daniloski, D., McCarthy, N. A., Huppertz, T., & Vasiljevic, T. (2022). What is the impact of amino acid mutations in the primary structure of caseins on the composition and functionality of milk and dairy products? *Current Research in Food Science*, 5, 1701–1712. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.09.026>

Daniloski, D., McCarthy, N., Markoska, T., Auldish, M., & Vasiljevic, T. (2022). Conformational and physicochemical characteristics of bovine skim milk obtained from cows with different genetic variants of β -casein. *Food Hydrocolloids*, 124, 107186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107186>

De Meeûs, T. (2018). Revisiting FIS, FST, Wahlund Effects, and Null Alleles. *Journal of Heredity*, 109(4), 446–456. <https://doi.org/10.1093/jhered/esx106>

- de Vitte, K., Kerziene, S., Klementavičiūtė, J., de Vitte, M., Mišeikienė, R., Kudlinskienė, I., Čepaitė, J., Dilbiene, V., & Stankevičius, R. (2022). Relationship of β -casein genotypes (A1A1, A1A2 and A2A2) to the physicochemical composition and sensory characteristics of cows' milk. *Journal of Applied Animal Research*, 50(1), 161–166. <https://doi.org/10.1080/09712119.2022.2046005>
- Douhovnikoff, V., & Leventhal, M. (2016). The use of Hardy-Weinberg Equilibrium in clonal plant systems. *Ecology and Evolution*, 6(4), 1173–1180. <https://doi.org/10.1002/ece3.1946>
- Edwards, A. (2008). Anecdotal, historical and critical commentaries on genetics. *Genetics*, 179(3), 1143–1150.
- EFSA. (2009). Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. In *EFSA Scientific Report* (Vol. 7, Issue 2). <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2009.231r>
- Elischer, M. (2014). *History of dairy cow breeds: Holstein*. Michigan State University Extension. https://www.canr.msu.edu/news/history_of_dairy_cow_breeds_holstein
- Elischer, M. (2016). *History of dairy cow breeds: Brown Swiss*. Michigan State University Extension. https://www.canr.msu.edu/news/history_of_dairy_cow_breeds_brown_swiss
- Farrell, H., Jimenez, R., Bleck, G., Brown, E., Butler, J., Creamer, L., Hicks, C., Hollar, C., Ng-Kwai-Hang, K., & Swaisgood, H. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641–1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
- Fatih, A., & Çak, B. (2018). Discussions of Effect A1 and A2 Milk Beta-Casein Gene on Health. *Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences*, 3(2), 216–221. <https://doi.org/10.31031/apdv.2018.03.000556>
- Fernández, S., Mondragón, A. del C., López, A., Cardelle, A., Regal, P., Lamas, A., Ibarra, I., Cepeda, A., & Miranda, J. (2022). A2 Milk: New Perspectives for Food Technology and Human Health. *Foods*, 11(16), 1–20. <https://doi.org/10.3390/foods11162387>
- Firouzmandi, M., Gholami, M., Toloui, M., & Eshghi, D. (2018). Genetic Variation of β -Casein Gene Using AS-PCR and ARMS-PCR Techniques in Bovine Populations. *Russian Journal of Genetics*, 54(11), 1352–1357. <https://doi.org/10.1134/S1022795418110054>
- Gai, N., Uniacke-low, T., O'regan, J., Faulkner, H., & Kelly, A. (2021). Effect of protein

- genotypes on physicochemical properties and protein functionality of bovine milk: A review. *Foods*, 10(10), 1–23. <https://doi.org/10.3390/foods10102409>
- Gazi, I., Buhelt, L., & Huppertz, T. (2022). Heterogeneity, Fractionation, and Isolation. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 881–893. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00278-6>
- Giglioti, R., Gutmanis, G., Morita, L., Hiromi, C., Oliveira, M., & Vercesi, A. F. 6. (2020). New high-sensitive rhAmp method for A1 allele detection in A2 milk samples. *Food Chemistry*, 313. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126167>
- Gonzalez, K. (2016). *Raza de ganado Holstein Historia de la raza bovina Holstein*. Zoo Vet Es Mi Pasión. https://zoovetesmipasion.com/ganaderia/razas-bovina/raza-bovina-holstein#Cruces_con_el_ganado_Holstein
- Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J Cytol*, 36(2), 116–117. https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18
- Hernández, A., & Trejo, F. de M. (2014). Estudio genético poblacional de frecuencias alélicas para 15 marcadores str presentes en la población del estado de zacatecas aplicado a la práctica forense. *IMedPub Journals*, 10(1), 1–24. <https://doi.org/10.3823/1209>
- Huson, H., Sonstegard, T., Godfrey, J., Hambrook, D., Wolfe, C., Wiggans, G., Blackburn, H., & VanTassell, C. (2020). A Genetic Investigation of Island Jersey Cattle, the Foundation of the Jersey Breed: Comparing Population Structure and Selection to Guernsey, Holstein, and United States Jersey Cattle. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00366>
- INEC. (2022). Encuesta de superficie y producción continua. In *ESPAC - Instituto Nacional de Estadística y Censos*. [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2021/Principales resultados-ESPAC_2021.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2021/Principales_resultados-ESPAC_2021.pdf)
- Jaiswal, K., & Sarsavan, A. (2014). Review on bovine beta-casein (A1, A2) gene polymorphism and their potentially hazardous on human health. *International Journal Of Environment & Animal Conservation*, 1(01), 1–12. <https://www.researchgate.net/publication/306401373>
- Jiménez, L., Alfonso, L., Mendizabal, J., & Urrutia, O. (2022). Worldwide Research Trends on Milk Containing Only A2 β -Casein: A Bibliometric Study. *Animals*, 12, 2–17.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani12151909> Academic

Kadam, B., Ambadkar, R., Rathod, K., & Pandiyan, C. (2017). A1 / A2 Milk and Human Health : a Brief Review. *Journal of Environment and Bio-Sciences*, 31(2), 357–362.

Kalmes, R., & Huret, J. (2001). *Modelo de Hardy-Weinberg*. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. <http://atlasgeneticsoncology.org/teaching/30100/modelo-de-hardy-weinberg>

Kosarikov, D. (2023). *¿Qué es la PCR?* Hoffmann-La Roche Ltd. <https://diagnostics.roche.com/es/es/article-listing/what-is-pcr.html>

Leatherwood, A. (2016). *Brahman Cattle*. Texas State Historical Assoiation. <https://www.tshaonline.org/handbook/entries/brahman-cattle#:~:text=The Brahman%2C Bos indicus%2C is,resistant to disease and insects>

Madigan, J., & Washburn, S. (2016). ADSA-SAD (Student Affiliate Division) Undergraduate Student Oral Competition: Dairy Foods. *Journal of Animal Science*, 94, 18–18. <https://doi.org/10.2527/jam2016-0037>

Manzano, E. (Universidad de P. (2017). *Identificación de las frecuencias alélicas A1 y A2 del gen CSN2 en bovinos de la región del Papaloapan, mediante qPCR*. Universidad de Papaloapan.

Marin, C., Delgado, J., Mclean, A., León, J., & Navas, F. (2020). Estudio de las distancias genéticas de Nei y conexión entre ganaderías en la raza equina Hispanoárabe. *Conference: XXI Simposio Iberoamericano Sobre Conservación y Uso de Recursos Zootenéticos Locales*, 2–3. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.11527.11684>

Mayer, H., Lenz, K., & Halbauer, E. (2021). “A2 milk” authentication using isoelectric focusing and different PCR techniques. *Food Research International*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110523>

McLachlan, C. (2001). β -casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Medical Hypotheses*, 56(2), 262–272. <https://doi.org/10.1054/mehy.2000.1265>

McLachlan, Corran. (2006). *Breeding and milking cows for milk free of b-casein A* (Patent No. US 7,094,949 B2).

Megía, R. (2022). *Electroforesis: ¿Qué es y para qué sirve?* El Blog de Genotipia. <https://genotipia.com/electroforesis/>

- Méndez, M., Serrano, J., Ávila, R., Rosas, M., & Méndez, N. (2002). Caracterización morfológica del bovino Criollo Mixteco. *Archivos de Zootecnia*, 51(194), 217–221. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49519425>
- Mishra, B., Mukesh, M., Prakash, B., Sodhi, M., Kapilas, R., Kishore, A., Kataria, R., Josh, B., Bhasin, V., Rasool, T., & Bujarbaruah, K. (2009). Status of milk protein, β -casein variants among Indian milch animals. *Indian Journal of Animal Sciences*, 79(7), 72–75.
- Morris, C., Hickey, S., Cullen, N., Prosser, C., Anderson, R., & Tate, M. (2005). Associations between β -casein genotype and milk yield and composition in grazing dairy cows. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 48(4), 441–450. <https://doi.org/10.1080/00288233.2005.9513678>
- Nguyen, D., Buseti, F., Johnson, S., & Solah, V. (2015). Identification and quantification of native beta-casomorphins in Australian milk by LC-MS/MS and LC-HRMS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.08.009>
- OCDE / FAO. (2017). *Perspectivas Agrícolas 2017-2026* (L. Valencia & S. Garcia (eds.); p. 154). ACDE, París. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2017-es
- Oleński, K., Cieślińska, A., Suchocki, T., Szyda, J., & Kamiński, S. (2012). Polymorphism in coding and regulatory sequences of beta-casein gene is associated with milk production traits in Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 30(1), 5–12.
- Oliveira, M., Ferreira, M., & Jéssica, F. (2019). A2A2 milk: Brazilian consumers' opinions and effect on sensory characteristics of Petit Suisse and Minas cheeses. *Food Science and Technology*, 108, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.064>
- Padilla, J., & Zambrano, J. (2021). Estructura, propiedades y genética de las caseínas de la leche: una revisión. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 16(3), 62–95. <https://doi.org/10.21615/cesmvz.5231>
- Palombo, V., Milanesi, M., Sgorlon, S., Capomaccio, S., Mele, M., Nicolazzi, E., Ajmone, P., Pilla, F., Stefanon, B., & D'Andrea, M. (2018). Genome-wide association study of milk fatty acid composition in Italian Simmental and Italian Holstein cows using single nucleotide polymorphism arrays. *Dairy Science*, 101(12), 11004–11019. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14413>
- Pasin, G. (2017). *A2 Milk Facts: What is A2 Milk?* <https://crimsonpublishers.com/apdv/fulltext/APDV.000556.php>

- Pereira, P. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30(6), 619–627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>
- Piñero, D., Eguiarte, L., Barahona, A., & Rocha, A. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *Conocimiento Actual de La Biodiversidad*, 1, 415–435. <file:///C:/Users/USEREA~1/AppData/Local/Temp/2008Cap14Lavariabilidadgeneticadela sespeciesPiero...-1.pdf>
- Pinheiro, D., Bermal, R., & Ferreira, G. (2021). Guzerat indicine cattle and A2 milk production. *Animal Biotechnology*, 34, 467–469. <https://doi.org/doi:10.1080/10495398.2021.1962336>
- Pons, A. (2015). *Determinación de la frecuencia del alelo A2 de la beta- caseína (CSN2) en pajillas de toros lecheros de la raza Holstein*. Universitat de Girona Escola Politècnica Superior.
- Priyadarshini, P., Mishra, C., Mishra, B., Swain, K., Rout, M., & Prasad, M. (2018). Impact of milk protein on human health: A1 verses A2. *International Journal of Chemical Studies*, 6(1), 531–535.
- Pulina, G., Dias, A., Stefanon, B., Sevi, A., Calamari, L., Lacetera, N., Dell’Orto, V., Pilla, F., Ajmone, P., Mele, M., Rossi, F., Bertoni, G., Crovetto, G., & Ronchi, B. (2017). Sustainable ruminant production to help feed the planet. *Italian Journal of Animal Science*, 16(1), 140–171. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2016.1260500>
- Raja, A., Rajendran, R., & Ganapathi, P. (2023). Detection of A1 and A2 Alleles at Beta-casein Locus in Bargur and Umblachery (Indian Zebu) Cattle Breeds by Allele-specific PCR. *Indian Journal of Animal Research*, 57, 1–5. <https://doi.org/10.18805/ijar.b-4273>
- Rangel, A., Zaros, L., Lima, T., Borba, L., Novaes, L., Mota, L., & Silva, M. (2017). Polymorphism in the Beta Casein Gene and analysis of milk characteristics in Gir and Guzerà dairy cattle. *Genetics and Molecular Research*, 16(2). <https://doi.org/10.4238/gmr16029592>
- Reynolds, C. (2020). Nutrición de las vacas Jersey: ¿pequeñas vacas Holstein o una raza aparte? In *NutriNew.com*. <https://nutrinews.com/nutricion-de-las-vacas-jersey-pequenas-vacas-holstein-o-una-raza-aparte/?reload=yes>
- Rivera, D., Valdovinos, A., Morales, A., Vázquez, G., Ponce, R., & Pérez, B. (2016).

- Frecuencias genotípicas y alélicas de la b-caseína en el bovino Criollo Lechero Tropical de México. *Archivos de Zootecnia*, 65(251), 409–411. <https://doi.org/10.21071/az.v65i251.704>
- Riveroll, F. (2022). *Diseño De Primers Para PCR*. Friveroll.Github.io. <https://friveroll.github.io/posts/diseño-de-primers-para-pcr/>
- Rusell, P. (1993). *Fundamentals of Genetics* (Thrid Edit). Harper Collins Publishers.
- Şahin, Ö., & Boztepe, S. (2022). Assessment of A1 and A2 variants in the CNS2 gene of some cattle breeds by using ACRS-PCR method. *Animal Biotechnology*. <https://doi.org/10.1080/10495398.2022.2036176>
- Samad, A. (2016). *A1-A2 beta casein milk : Is the controversy relevant to India ?* Vet Helpline India (P) Ltd. <https://www.vethelplineindia.co.in/a1-a2-beta-casein-milk-is-the-controversy-relevant-to-india/>
- Smith, M. (2023). *Electrophoresis*. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Electrophoresis>
- Schettini, G., Lambert, S., Paraná, B., Costa, R., & Ferreira, G. (2020). Genetic potential of Sindhi cattle for A2 milk production. *Animal Production Science*, 60, 893–895. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/AN18677>
- Sebastiani, C., Arcangeli, C., Ciullo, M., Torricelli, M., Cinti, G., Fisichella, S., & Biagetti, M. (2020). Frequencies evaluation of β -Casein gene polymorphisms in dairy cows reared in central Italy. *Animals*, 10(2), 1–7. <https://doi.org/10.3390/ani10020252>
- Sebastiani, C., Arcangeli, C., Torricelli, M., Ciullo, M., D'avino, N., Cinti, G., Fisichella, S., & Biagetti, M. (2022). Marker-assisted selection of dairy cows for β -casein gene A2 variant. *Italian Journal of Food Science*, 34(2), 21–27. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v34i2.2178>
- Sodhi, M., Manishi, M., Kataria, R., Mishra, B., & Joshii, B. (2012). Milk proteins and human health: A1/A2 milk hypothesis. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16(5), 856. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.100685>
- Sourav, B. (2023). *Primer: definición, diseño de primer, tipos, herramientas en línea, usos*. Microbiologynote.Com. <https://microbiologynote.com/es/primer-definition-primer-design-types-online-tools-uses/>
- Sousa, C. (2017). *Identificación de la especie de origen en productos lácteos comerciales:*

comparación de dos métodos de extracción de ADN [Universidad de Extremadura]. <http://dehesa.unex.es/handle/10662/8528>

Summer, A., Di Frangia, F., Ajmone, P., De Noni, I., & Malacarne, M. (2020). Occurrence, biological properties and potential effects on human health of β -casomorphin 7: Current knowledge and concerns. *Food Science and Nutrition*, 60(21), 1–19. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1707157>

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 2, 70–78. <http://www.medigraphic.com/rid%0APalabras>

Teixeira, L. P. R., Lopes, F. E. de M., Antunes, A. S. L. M., Alves, M. S., Miranda, A. M., Neto, S. G., Martins, L. T., de Oliveira, A. C., & Simiano, K. C. (2020). Application of a cost-effective DNA extraction protocol for screening transgenic and CRISPR-edited primary goat cells. *PLoS ONE*, 15(9), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239435>

Tripp, M. (2009). Análisis de la estructura genética poblacional del Dorado (*Coryphaena hippurus*; Linnaeus, 1758) en el noroeste del Pacífico mexicano y golfo de California mediante el uso de microsatélites. In *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste*, S.C. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/263>

Urrutia, O., Mendizabal, J., & Alfonso, L. (2019). Reconversión de las explotaciones de vacuno de leche a la producción A2. *Revista Frisona Española*, 232, 88–90. <https://www.revistafrisona.com/Noticia/reconversion-de-las-explotaciones-de-vacuno-de-leche-a-la-produccion-a2>

Vigolo, V., Franzoi, M., Cendron, F., Salvadore, G., Penasa, M., Cassandro, M., & De Marchi, M. (2022). Characterization of the genetic polymorphism linked to the β -casein A1/A2 alleles using different molecular and biochemical methods. *Journal of Dairy Science*, 105(11), 8946–8955. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22136>

Wright, S. (1949). The genetical structure of populations. *Annals of Human Genetics*, 15(1), 323–354. <https://doi.org/10.2307/2407273>

Yamada, A., Sugimura, M., & Kuramoto, T. (2021). Genetic polymorphism of bovine beta-casein gene in Japanese dairy farm herds. *Animal Science Journal*, 92(1), 1–4. <https://doi.org/10.1111/asj.13644>

Zoghbi, S., Trompette, A., Claustre, J., El Homsy, M., Garzón, J., Jourdan, G., Scoazec, J.-Y.,

& Plaisancié, P. (2006). β -Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a μ -opioid pathway. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(6), 1105–1113. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00455.2005>

Anexos

Anexo A. Toma y recolección de muestras



Anexo B. Organización de las muestras en el laboratorio



Anexo C. Pastilla de ADN



Anexo D. Cebadores utilizados



Anexo E. Termociclador



Anexo F. Preparación del gel de agarosa al 1,2 % teñido con Bromuro de etidio



Anexo G. Gel de agarosa para electroforesis



Anexo H. Fotodocumentador



Anexo I . Resultados de la electroforesis

