



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de Ciencias e Ingeniería

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS α S1-
CASEÍNA Y α S2-CASEÍNA EN VACUNOS *BROWN SWISS*, *HOLSTEIN*,
CRIOLLOS DE APURÍMAC Y AMAZONAS”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA

CLAUDIA LILIANNIE OCAMPO ACUÑA

LIMA-PERÚ

2024

JURADO DE TESIS

Dr. Jose Espinoza Babilon

Presidente del Jurado

Dr. Ivan Lozada Requena

Vocal

Med. Esp. Susana Zurita Macalupu

Secretario

Asesor

Patricia Sheen Cortavarria, PhD.

Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular - Laboratorios de Investigación y Desarrollo,
Facultad de Ciencias e Ingeniería, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú

DEDICATORIA

A mi familia por su amor y apoyo infinito e incondicional

a mi zootecnista de cabecera

a mis amigos del INIA

a mi *alma mater* UPCH

a Vindi y Pikabú

a las vaquitas criollas

a los pequeños y medianos criadores de ganado

y a la comunidad científica.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, padre y hermanos por su apoyo y amor incondicional.

A la dra. Claudia Yalta Macedo por su amistad, tiempo, conocimientos y apoyo constante en el desarrollo de esta tesis.

A mi asesora PhD. Patricia Sheen Cortavarria por el apoyo en mi Tesis.

Al Ingeniero Julio Tolentino por su apoyo constante y conocimientos para el desarrollo de esta Tesis.

Al equipo de Biotecnología Animal y Vegetal, a Mechita, Wendy y Lenin, al Ingeniero Eudosio Veli Amancio y a la Directora General de la Dirección Recursos Genéticos y Biotecnología PhD. Dina Gutiérrez Reynoso del Instituto Nacional de Innovación Agraria.

Y a Vindi y Pikabú.

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS α S1-CASEÍNA Y α S2-CASEÍNA EN VACUNOS BROWN SWISS, HOLSTEIN, CRIOLLOS DE APURÍMAC Y AMAZONAS

INFORME DE ORIGINALIDAD

11 %	10 %	5 %	2 %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	pgc-snia.inia.gob.pe:8080 Fuente de Internet	2 %
2	www.koreascience.kr Fuente de Internet	1 %
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1 %
4	Ana Victoria Suescún, Juan Rodrigo Cubillos, María Mercedes Zambrano. "Genes involucrados en la biogénesis de fimbrias afectan la formación de biopelículas por parte de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ", Biomédica, 2006 Publicación	<1 %
5	accedacris.ulpgc.es Fuente de Internet	<1 %
6	Submitted to Universidade de Sao Paulo Trabajo del estudiante	<1 %
7	repositorio.urp.edu.pe Fuente de Internet	

ÍNDICE

Resumen

Abstract

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo general	11
3.2. Objetivos específicos	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1. Muestras de ADN vacuno	12
4.2. Aspectos éticos	13
4.3. Genotipificación de las proteínas lácteas α 1-caseína y α 2-caseína por la técnica de curvas de disociación de alta resolución (HRM)	14
4.3.1. Detalles de los controles de la genotipificación por HRM de las variantes genéticas de las proteínas α 1-caseína (CSN1S1* B y CSN1S1*C) y α 2-caseína (CSN1S2* A y CSN1S2*B)	14
4.3.2. PCR en tiempo real y análisis por HRM de las variantes genéticas de la proteína α 1-caseína	15
4.3.3. PCR en tiempo real y análisis por HRM de las variantes genéticas de la proteína α 2-caseína	16
4.3.4. Análisis de datos de genotipificación por HRM	16
4.4. Validación de los ensayos de HRM por secuenciamiento de Sanger	17
4.5. Análisis estadístico	19
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSIÓN	28
7. CONCLUSIONES	34
8. RECOMENDACIONES	34
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
10. ANEXOS	42

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Taxonomía del ganado taurino y cebuino	2
Figura 2. Centro de domesticación hipotéticos del vacuno y sus posibles rutas de migración	2
Figura 3. Rutas de distribución geográfica de vacunos en América	3
Figura 4. Organización genómica del cluster caseína.	5
Figura 5. Identificación de los genotipos de la proteína α 1-caseína mediante el análisis de curvas de disociación de alta resolución	20
Figura 6. Cromatogramas de las variantes genéticas de la proteína α 1-caseína	21
Figura 7. Identificación de los genotipos de la proteína α 2-caseína mediante el análisis de curvas de disociación de alta resolución	22
Figura 8. Cromatogramas de las variantes genéticas de la proteína α 2-caseína	23
Figura 9. Cromatogramas de los SNPs rs441966828 y rs460423501	23

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición química de la leche de vaca entre diferentes razas	5
Tabla 2. Variantes genéticas de la proteína α 1-caseína	7
Tabla 3. Variantes genéticas de la proteína α 2-caseína	9
Tabla 4. Frecuencias alélicas de las proteínas κ -caseína y β -caseína en poblaciones de ganado vacuno peruano	10
Tabla 5. Cantidad de individuos en las poblaciones en estudio	13
Tabla 6. Correspondencia de secuenciamiento y del análisis HRM respecto a las variantes de la proteína α 1-caseína	21
Tabla 7. Correspondencia HRM y secuenciación Sanger respecto a las variantes de la proteína α 2-caseína	24
Tabla 8. Frecuencias genotípicas (%) de las proteínas α 1-caseína y α 2-caseína	25
Tabla 9. Frecuencias alélicas, Test del equilibrio de Hardy-Weinberg estimado con Chi cuadrado y Coeficiente de endogamia de las proteínas α 1-caseína y α 2-caseína de cuatro poblaciones de vacunos	26
Tabla 10. Valores de Índice de Fijación (F_{ST}) de la proteína α 1-caseína de cuatro poblaciones de vacunos	27
Tabla 11. Valores de Índice de Fijación (F_{ST}) de la proteína α 2-caseína de cuatro poblaciones de vacunos	27

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
α 1-caseína	Proteína alfa(S1)-Caseína
α 2-caseína	Proteína alfa(S2)-Caseína
β -caseína	Proteína beta-Caseína
CENAGRO 2012	IV Censo Nacional Agropecuario
°C	Grado Celsius
CS	Control sintético
<i>CSN1S1</i>	Gen que codifica la proteína α 1-caseína
<i>CSN1S2</i>	Gen que codifica la proteína α 2-caseína
<i>CSN1S1</i> *B	Alelo B del gen <i>CSN1S1</i>
<i>CSN1S1</i> *C	Alelo C del gen <i>CSN1S1</i>
<i>CSN1S2</i> *A	Alelo A del gen <i>CSN1S2</i>
<i>CSN1S2</i> *B	Alelo B del gen <i>CSN1S2</i>
<i>CSN2</i>	Gen que codifica la proteína β -caseína
<i>CSN3</i>	Gen que codifica la proteína κ -caseína
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>f</i>	Coeficiente de endogamia
F_{ST}	Índice de Fijación
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg
HRM	Técnica de curvas de disociación de alta resolución
INIA	Instituto Nacional de Innovación Agraria
κ -caseína	Proteína kappa-Caseína
LD	Desequilibrio de ligamiento
MC	Muestra control
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mL	Mililitro
n.d.	No determinado
ng	Nanogramo
n.s.	No significativa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la polimerasa
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
TE	Tris:EDTA
U	Unidades
μ l	Microlitros
μ M	Micromolar
V	Voltios

RESUMEN

Mundialmente existe una preocupación por la pérdida de la diversidad del ganado vacuno, y el Perú no es ajeno a este problema, considerando que no existen programas de conservación del ganado vacuno y son pocos los estudios de caracterización genética. A su vez, conocer las variantes genotípicas de una población es crucial porque permite conocer sus características para tomar medidas de manejo que garanticen la seguridad alimentaria y la conservación.

En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo caracterizar genótipicamente las proteínas lácteas α 1-caseína y α 2-caseína en vacunos *Brown Swiss*, *Holstein*, criollos de Apurímac y Amazonas. Los genotipos de las proteínas α 1-caseína (*CSN1S1**BB, *CSN1S1**BC y *CSN1S1**CC) y α 2-caseína (*CSN1S2**AA, *CSN1S2**AB y *CSN1S2**BB) fueron determinados en 361 muestras de ADN de vacunos del Banco de ADN de la Dirección de Recursos y Biotecnología de la DRGB-INIA mediante ensayos de curvas de disociación de alta resolución (HRM, del inglés *High Resolution Melting*).

Las frecuencias del alelo *CSN1S1**B fueron 0.99, 0.92, 0.71 y 0.78 en *Holstein*, *Brown Swiss*, Criollos de Apurímac y Amazonas, de forma respectiva. Mientras que las frecuencias del alelo *CSN1S2**A fueron 1.0, 0.99, 0.98 y 0.94 en *Holstein*, *Brown Swiss*, Criollos de Apurímac y Amazonas, correlativamente. Los valores de F_{ST} en *CSN1S1* indicaron la existencia de mayor variación genética entre los vacunos criollos comparado con el vacuno de raza *Holstein*.

Palabras claves: Vacuno criollo, alfa1-caseína, alfa2-caseína, curvas de disociación de alta resolución, polimorfismo de nucleótido único.

ABSTRACT

There is worldwide concern about the loss of cattle diversity, and Peru is no stranger to this problem, considering that there are no cattle conservation programs and there are few genetic characterization studies. At the same time, knowing the genotypic variants of a population is crucial because it allows us to know its characteristics to take management measures that guarantee food security and conservation.

In this context, the present study aimed to genotypically characterize the dairy proteins α S1-casein and α S2-casein in Brown Swiss, Holstein, Creole cattle from Apurímac and Amazonas. The genotypes of the α s1-casein (CSN1S1*BB, CSN1S1*BC y CSN1S1*CC) y α s2-casein (CSN1S2*AA, CSN1S2*AB y CSN1S2*BB) proteins were determined in 361 vaccine DNA samples from the Bank of DNA from the Directorate of Resources and Biotechnology of INIA using high resolution dissociation curve assays (HRM, High Resolution Melting).

The frequencies of the CSN1S1*B allele were 0.99, 0.92, 0.71 and 0.78 in Holstein, Brown Swiss, Apurímac creole cattle and Amazonas creole cattle, respectively. While the frequencies of the CSN1S2*A allele were 1.0, 0.99, 0.98 and 0.94 in Holstein, Brown Swiss, Apurímac creole cattle and Amazonas creole cattle, correlatively. The F_{ST} values in CSN1S1 indicated the existence of greater genetic variation among the Creole cattle compared to the Holstein cattle breed.

Keywords: Creole cattle, *CSN1S1*, *CSN1S2*, High Resolution Melting, Single Nucleotide Polymorphism

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del ganado vacuno

Los vacunos han sido seleccionados artificialmente de forma intensiva para producir leche y carne (1), probablemente este proceso se llevó a cabo hace 7 000 - 10 000 años (2). Asimismo, existen dos especies de vacunos representativas: *Bos taurus* y *Bos indicus* (ver Figura 1), las cuales se diferenciaron a partir del Uro (*Bos primigenius*) en dos o tres eventos independientes de domesticación (ver Figura 2). El linaje taurino posiblemente fue domesticado en el Creciente fértil durante el neolítico (1) y el otro evento en el desierto oeste de Egipto (3). Mientras que, el linaje indicino fue domesticado en el valle del Indo (1), con características como una mayor tolerancia al estrés alimentario e hídrico y se han adaptado mejor al trópico que las razas taurinas (4).

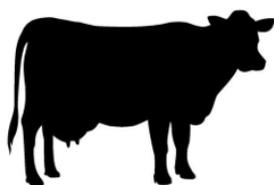
En cada linaje se han establecido razas con características particulares y con distribuciones geográficas diferentes; siendo reconocidas alrededor de 800 diferentes razas vacunas (5). Por ejemplo, tenemos a la raza vacuna *Holstein* la más distribuida geográficamente por su importancia económica, al poseer la más alta eficiencia de conversión de alimento en leche (6); sin embargo, el coste de la alta producción ha afectado su reproducción (6), su sistema inmunitario (7) y se ha reducido su longevidad (6).

Asimismo, otra raza taurina como *Brown Swiss* es distinguida por producir leche con un mayor contenido de proteínas y grasa que *Holstein* (8), su leche es considerada la mejor para la obtención de quesos (9) permitiendo producir 5% más queso por kilogramo y mayor cantidad de ácidos grasos como ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) comparado con vacas *Holstein* (10).

1.1.1. El ganado vacuno en el Perú

La ganadería vacuna en nuestro país se inició en la década de 1530-1540 (11) (ver Figura 3), llegando razas taurinas provenientes de España siendo estas: Retinta, Pajuna, Andaluza, Murciana, Berrendas y toros de Lidia (12). Posteriormente, se introdujeron otras razas taurinas como *Ayrshire*, *Jersey*, *Milking Shorthorn*, *Normande*, *Simmental* y a mediados del siglo pasado se introdujo razas *Holstein* y *Brown Swiss* (13); las primeras razas indicinas llegaron el año 1938 (14). Posteriormente, se suscitó el cruzamiento indiscriminado con estas razas introducidas (12) y la reproducción de estos descendientes dieron como resultado a los vacunos adaptados localmente presentes en nuestro

país; en consecuencia, en la actualidad el 64 % del total de vacunos presentes en el Perú son catalogados como criollos (15), refiriéndose a animales sin una raza definida (16).



Orden : Artiodactyla
Familia : Bovidae
Subfamilia : Bovinae
Género : Bos
Especie : *Bos taurus*
Nombre común : vaca

Orden : Artiodactyla
Familia : Bovidae
Subfamilia : Bovinae
Género : Bos
Especie : *Bos indicus*
Nombre común : cebú

Figura 1. Taxonomía del ganado taurino y cebuino

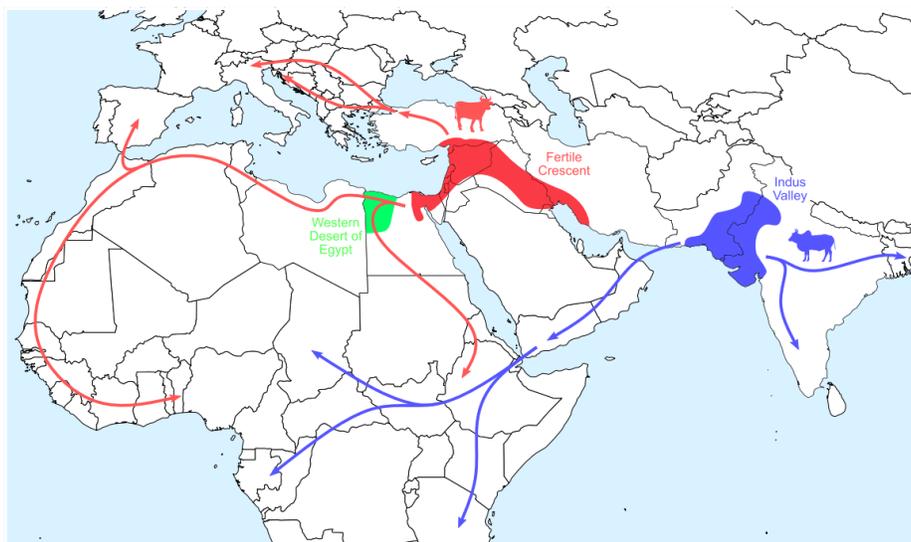


Figura 2. Centro de domesticación hipotéticos del vacuno y sus posibles rutas de migración.
Fuente: Pitt (2019)(3)



Figura 3. Rutas de distribución geográfica de vacunos en América. Fuente: Armstrong *et al.* (2022) (17)

1.1.2. El vacuno criollo peruano

El último censo agropecuario CENAGRO 2012 estimó que los vacunos criollos representan el 64% del total de vacunos en nuestro territorio (15); en relación con sus principales características destacan por su rusticidad, longevidad, prolificidad (12), resistencia a enfermedades tropicales y parasitosis (18), así como, adaptación a diferentes climas (tropical, templado, seco y frío) (19) y a condiciones extremas de regiones altoandinas (20).

Los vacunos criollos tienen una función económico-sociocultural (21), siendo su crianza una actividad económica primaria por la producción y venta de carne, leche y derivados, así como fuerza de trabajo en el arado de terrenos de cultivo (16). Asimismo, forman parte de rituales y festividades que mantienen la identidad de las comunidades campesinas, como la fiesta de Santiago, el *Yawar* Fiesta y el Torito de Pucará (21).

Un grupo importante de criadores de rebaños criollos (44%) se encuentran entre las categorías socioeconómicas pobres y pobres extremos (22), siendo su actividad de crianza para el autoconsumo y su sobrevivencia (22). Ellos realizan prácticas de manejo ganadero extensivo, donde el hacinamiento es mínimo, con adecuado bienestar animal y económicamente sostenible al alimentarlos con pastos naturales, rastrojos de cosechas y plantas medicinales (12).

En el Perú existe un largo camino para la valoración del vacuno criollo, a quién se le denomina de forma peyorativa como “chusco”(16), para relacionarlo con la falta de calidad productiva y mansedumbre (16); ocasionando de este modo distarlos negativamente del ganado de raza (23).

1.2. Proteínas lácteas del vacuno y sus variantes genéticas

La leche de vaca se compone en promedio de un 86.9% de agua, 3.7% de grasa y 3.5 % de proteína (24), esta composición puede variar entre las diferentes razas de vacunos (ver Tabla 1). Con respecto, al contenido proteico, las caseínas representan el 78.3% de la proteína total de la leche (25), son fosfoproteínas y se encuentran formando micelas (26). La función más importante de las micelas de caseínas es el transporte de calcio y fosfatos en la digestión (27), las caseínas se disocian en péptidos por acción de enzimas digestivas, los que funcionan como inmunomoduladores (28), antihipertensivos (29), antimicrobianos (30), antioxidativos (31) y presentan actividad opioide (32); a su vez, las caseínas permiten la absorción de minerales y el buen funcionamiento del epitelio intestinal (32). Asimismo, tienen gran valor comercial en la industria alimentaria, textil, papelería (33) y cosmética (34).

Tabla 1. Composición química de la leche de vaca entre diferentes razas

Componente	<i>Holstein</i>	<i>Brown Swiss</i>	Criolla Junín
Sólidos totales (%)	12.24	13.53 ^b	14.08 ^a
Proteína (%)	3.16	3.39 ^b	3.54 ^a
Grasa (%)	3.64	4.91 ^b	5.60 ^a

Fuente: Elaborado en base a datos de Ensminger (1977) (35) y Garcia (2008) (36)
a,b: letras diferentes muestran diferencia significativa $p < 0.05$

Existen cuatro tipos de caseínas, las cuales son α_1 -caseína, β -caseína, α_2 -caseína y κ -caseína; los genes que codifican estas caseínas, se encuentran en el denominado *cluster* caseína de 250 kb, ubicado en el cromosoma 6 y se presentan en el siguiente orden físico *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2*, *CSN3* (37) (Ver Figura 4). Todas éstas son genéticamente polimórficas y presentan herencia mendeliana (38); y se ha descrito que tanto las proteínas α_1 -caseína, α_2 -caseína, β -caseína se originaron de un gen en común mediante duplicaciones intergénicas e intragénicas (39).

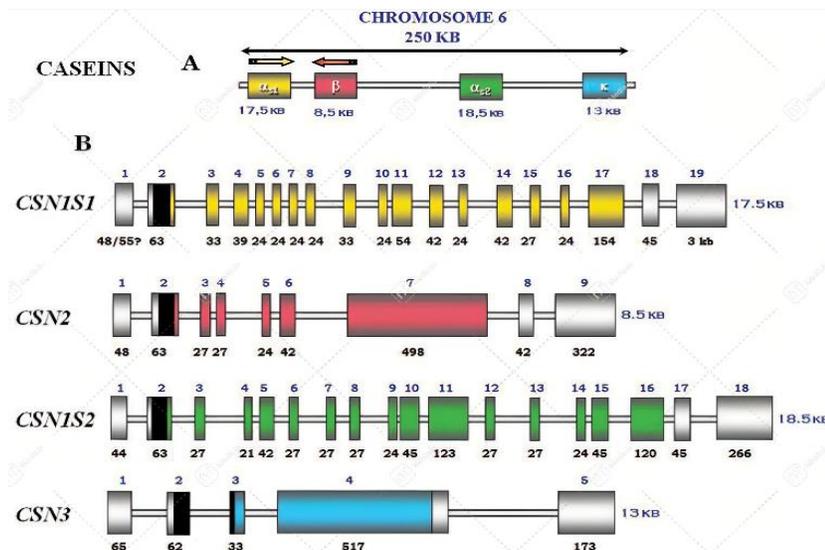


Figura 4. Organización genómica del cluster caseína. Fuente: Caroli *et al.* (2009)(37)

Entre los marcadores de selección asistida usados en los programas de crianza de ganado lechero se encuentran las variantes genéticas de las caseínas (40, 41), debido a que están relacionadas con características diferenciadas en la leche (42). Por ejemplo, se ha reportado que la variante genética de la κ -caseína *CSN3** BB está relacionada con mayor contenido de grasa y proteína (43) a su vez, el rendimiento quesero es 10% mayor que cuando está presente la variante genética *CSN3** AA (44).

Por otra parte, los genotipos de las caseínas se encuentran diferenciadas entre las razas vacunas. Así, por ejemplo, se ha reportado que las vacas de raza *Simmenthal* producen mayor cantidad de leche que en *Holstein* al tener presente el alelo $CSN2^*A_2$ de la β - caseína (45).

1.2.1. La proteína α 1-caseína y sus variantes genéticas

La proteína α 1-caseína representa el 40% del total de caseínas de la leche de vaca (46); es codificado por el gen *CSN1S1* de 17.5 kb presente en el cromosoma 6 vacuno (37); además, se han reportado 10 variantes genéticas (47) (Ver Tabla 2). En cuanto a la variante *CSN1S1^*A*, se caracteriza por la ausencia de 13 residuos hidrofóbicos en la posición 14 al 26 de la proteína (48); esta pérdida incluye a la secuencia aminoacídica Phe-Phe-Val la cual permite el clivaje de quimosina durante la producción del queso (49), debido a la presencia de esta variante se obtienen quesos menos consistentes (50), a su vez dicha variante, se ha encontrado en vacas de razas taurinas como: *Hosltein*, *Red Holstein* y *German Red cattle* (51, 52).

En relación, con las variantes *CSN1S1^*B* y *CSN1S1^*C* estas se diferencian por el polimorfismo de nucleótido simple (SNP) rs43703010, el cual se encuentra en el exón 17 del gen *CSN1S1* (47); el cual es una mutación puntual de transición de adenina por guanina; lo que conlleva un cambio aminoacídico de ácido glutámico por una glicina (53). En cuanto al alelo *CSN1S1^*B*, este es el más frecuente y predominante en *Bos Taurus*; mientras tanto, el alelo *CSN1S1^*C*, es más frecuente en *Bos indicus* (54, 55).

Las razas con altas frecuencias del genotipo *CSN1S1^* BB* son las razas taurinas *Ayrshire* (56), *Milking Shorthorn* (57) y *Holstein* (58); además, el genotipo *CSN1S1^* BB* está relacionado con mayor cantidad de leche y grasa que el genotipo *CSN1S1^*BC* (59); y este último está relacionado con mayor rendimiento quesero (60). Sin embargo, aun siendo predominante la frecuencia del alelo *CSN1S1^*B* en las razas taurinas, se puede encontrar en menor frecuencia el alelo *CSN1S1^*C* en razas taurinas como: *Shorthorn*, *Guernsey*, *Jersey* (56) y *Brown Swiss* (57).

Tabla 2. Variantes genéticas de la proteína α 1-caseína. (Adaptado a partir de *Kusnetsov et al.* (2022) (61)

Variantes	Mutación nucleotídica	Poblaciones y razas de ganado vacuno	Referencia
<i>CSN1S1</i> *A	Delección en la posición 14,891–14,929	<i>Hosltein, Red Holstein y German Red cattle</i>	(48, 49, 51, 52)
<i>CSN1S1</i> *B	Variante de referencia	Mayor frecuencia en <i>Bos taurus. Ayrshire</i> (56), <i>Milking Shorthorn</i> (57) y <i>Red Holstein</i> (58)	(56-58, 60)
<i>CSN1S1</i> *C	Transición A>G en la posición 26,181	Mayor frecuencia en <i>Bos indicus y Bos grunniens. Shorthorn, Guernsey, Jersey y Brown Swiss</i>	(47, 53, 55)
<i>CSN1S1</i> *D	Transición A>G en la posición 17,383	Razas de Francia, Italia y Jersey de Países Bajos	(46, 52, 62, 63)
<i>CSN1S1</i> *E	Transversión C>A en la posición 18,901 y transición A>G en la posición 26 181	<i>Bos grunniens</i>	(64, 65)
<i>CSN1S1</i> *F	Transición C>T en la posición 18 923	<i>German Black and White</i>	(46, 51)
<i>CSN1S1</i> *G	Inserción de 371 pares de bases (pb) en la posición 27,686–27,687	<i>Italian Brown, Carora cattle</i>	(46, 66-68)
<i>CSN1S1</i> *H	Delección en la posición 51-58	<i>Kuri y Baule</i>	(69)
<i>CSN1S1</i> *I	Transversión A>T en la posición 19,836	<i>Banyo Gudali</i>	(70)
<i>CSN1S1</i> *J	Transversión G>T en la posición 26,105	<i>Sarabi y Gyr</i>	(53)

Respecto a la variante *CSN1S1** D, esta se caracteriza por el cambio aminoacídico de alanina por treonina en la posición 53 (46); además la variante *CSN1S1** D se ha reportado en varias razas taurinas en : Francia (52), Italia(63) y Países Bajos (62). Mientras que la variante *CSN1S1**E difiere con la variante C en el cambio de glutamina por lisina en la posición 59 (64); asimismo, hasta el momento esta variante ha sido reportada en *Bos grunniens* (65).

En el caso de la variante *CSN1S1** F, se caracteriza por el cambio de leucina por serina en la posición 66 (46); esta variante se ha reportado en la raza taurina *German Black and White* (51). En cuanto a la variante *CSN1S1**G, tiene la misma secuencia de aminoácidos que la variante de referencia *CSN1S1**B, sin embargo, la presencia de una inserción de 371 pares de bases en el exón 19 (68),

genera que produzca 55% menos de la proteína α 1-caseína (46, 66) y se ha reportado esta variante en la raza taurina *Italian Brown* (67).

En relación a la variante *CSN1S1*H* se caracteriza por la ausencia de ocho aminoácidos en la posición 51-58 (69); y se ha reportado esta variante en la raza *Kuri* (69). Mientras tanto, la variante I se caracteriza por el cambio del aminoácido glutamina por asparagina en la posición 84 de la proteína y se ha encontrado en la raza *Banyo Gudali* (70). Por último, la variante J se caracteriza por el cambio de aminoácido de valina por fenilalanina en la posición 182 de la proteína (53); y se ha identificado en la raza taurina *Sarabi* y en la raza indicina *Gyr* (53).

1.2.2. La proteína α 2-caseína y sus variantes genéticas

La α 2-caseína representa el 10% del total de caseínas de la leche de vaca (46). El gen que la codifica (*CSN1S2*) tiene 5 variantes genéticas (A, B, C, D, E) (71) (ver Tabla 3). Los alelos más frecuentes son *CSN1S2*A* y *CSN1S2*B* que se diferencian por el SNP rs441966828 en el exón 3 del gen (47, 55), el cual es una mutación puntual de transición de citosina por timina, que conlleva un cambio aminoacídico de serina por fenilalanina en la posición 23 de la proteína (53). La variante *CSN1S2*A* es la más frecuente en *Bos taurus* (46); mientras tanto la variante *CSN1S2*B*, es más frecuente en *Bos indicus* y se usa como marcador genético para buscar ascendencia cebú en razas vacunas europeas (55).

Respecto a la variante *CSN1S2*C*, esta se caracteriza por presentar 3 cambios aminoacídicos en las posiciones 33 (glutamina por glicina), 47 (alanina por treonina) y 130 (treonina por isoleucina) (37); a su vez dicha variante, se ha encontrado en yaks de Nepal y Mongolia (*Bos grunniens*) (64). En el caso de la variante *CSN1S2*D*, se caracteriza por la delección de 9 aminoácidos en la posición 51 a 59 de la proteína (46); a su vez esta variante, está relacionado con menor contenido de caseínas en la leche (72) y se ha reportado en vacas de razas taurinas *Vosgienne*, *Montbeliarde* (52) y Asturiana (73). Por último, la variante *CSN1S2*E* caracterizada por el cambio aminoacídico de valina por isoleucina en la posición 22 de la proteína, la cual se ha identificado en la raza taurina *Sarabi* (53).

Tabla 3. Variantes genéticas de la proteína α 2-caseína. (Adaptado a partir de Kusnetsov (2022) (61)

Variantes	Mutación nucleotídica	Poblaciones y razas de ganado vacuno	Referencia
<i>CSN1S2</i> *A	Variante de referencia	<i>Bos taurus</i>	(46)
<i>CSN1S2</i> *B	Transición C>T en la posición 6,227	<i>Bos indicus</i>	(55)
<i>CSN1S2</i> *C	Transición A>G en la posición 7,568, transición G>A en la posición 8,401 y transición C>T en la posición 11,018	<i>Bos grunniens</i>	(37)
<i>CSN1S2</i> *D	Delección en la posición 8,853-8,879 y transversión G>T en la posición 8,879	<i>Vosgienne, Montbeliarde, Asturiana</i>	(46, 52, 72, 73)
<i>CSN1S2</i> *E	Transición G>A en la posición 6,223	Sarabi	(53)

1.3. Caracterización genética de las caseínas en poblaciones de vacunos peruanos

En nuestro país se han realizado estudios de caracterización genética de caseínas en diferentes poblaciones de vacunos de razas y criollos (ver Tabla 4); así, por ejemplo, se han estudiado las variantes genéticas de las proteínas κ -caseína (74-77) y β -caseína (78).

Respecto a las variantes de la proteína κ -caseína, se realizaron estudios en poblaciones de vacunos criollos del departamento de Junín, donde se encontró frecuencias de las variantes *CSN3**A y *CSN3**B de 0.59 y 0.41, respectivamente (75); mientras, en el departamento de Ancash se encontró frecuencias de las variantes *CSN3**A de 0.64 y *CSN3**B de 0.5, en las comunidades de *Huashcao* y *Ticlllos*, respectivamente (77); así mismo, en Ayacucho se obtuvo frecuencias de las variantes *CSN3**A y *CSN3**B de 0.37 y 0.63, respectivamente (76); y en Cajamarca se reportó frecuencias de las variantes *CSN3**A de 0.55 y *CSN3**B de 0.45 (74).

Por otro lado, respecto a la proteína β -caseína en vacunos criollos de Apurímac, se reportó que la frecuencia de las variantes *CSN2**A₁ de 0.29 y *CSN2**A₂ de 0.71; a su vez, en la raza *Holstein* se encontró una frecuencia de las variantes *CSN2**A₁ de 0.43 y *CSN2**A₂ de 0.57 (78).

En este contexto, se realizó este estudio con el propósito de caracterizar genotípicamente las variantes de las proteínas α 1-caseína y α 2-caseína en cuatro poblaciones de ganado vacuno.

Tabla 4. Frecuencias alélicas de las proteínas κ -caseína y β -caseína en poblaciones de ganado vacuno peruano

Proteína/gen	Poblaciones de vacunos	Frecuencias alélicas	Referencia
κ -caseína/ CSN3	Criollos Cajamarca	A: 0.55 B:0.45	(74)
	Criollos Junín	A: 0.59 B: 0.41	(75)
	Criollos Ayacucho	A: 0.37 B: 0.63	(76)
	Criollos Ancash ¹	A: 0.64 B:0.36	(77)
	Criollos Ancash ²	A: 0.50 B:0.50	(77)
β -caseína/ CSN2	Criollos Apurímac	A ₁ : 0.29 A ₂ : 0.71	(78)
	<i>Holstein</i> La Libertad	A ₁ : 0.43 A ₂ : 0.57	(78)

1: Comunidad de *Huashcao*, 2: Comunidad de *Ticillos*

2. HIPÓTESIS

Las frecuencias genotípicas de las proteínas lácteas α 1-caseína y α 2-caseína, son diferentes en cuatro poblaciones de vacunos *Brown Swiss*, *Holstein*, criollos de Apurímac y Amazonas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Caracterizar genotípicamente las proteínas lácteas α 1-caseína y α 2-caseína, en cuatro poblaciones de vacunos *Brown Swiss*, *Holstein*, criollos de Apurímac y Amazonas.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes genéticas de las proteínas lácteas α 1-caseína y α 2-caseína, en cuatro poblaciones de vacunos *Brown Swiss*, *Holstein*, criollos de Apurímac y Amazonas.
- Estimar estadísticamente el análisis de la desviación del equilibrio de *Hardy-Weinberg*, el índice de Fijación (F_{ST}) y el coeficiente de Endogamia(f).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de realizar la caracterización genotípica de las proteínas α 1-caseína y α 2-caseína en cuatro poblaciones de vacunos *Brown Swiss*, *Holstein*, criollos de Apurímac y Amazonas, se utilizó la técnica de HRM para identificar los genotipos *CSN1S1** BB, *CSN1S1**BC y *CSN1S1**CC de la proteína α 1-caseína y los genotipos *CSN1S2** AA, *CSN1S2**AB y *CSN1S2**BB de la proteína α 2-caseína. Asignados los genotipos por cada individuo, se realizaron los cálculos de las frecuencias genotípicas y alélicas; seguidamente, se evaluó el Equilibrio de *Hardy-Weinberg* y F_{ST} de cada una de las poblaciones (Ver flujograma Anexo E).

4.1. Muestras de ADN vacuno

Las muestras de ADN de vacunos criollos de Apurímac y Amazonas y de raza *Brown Swiss*, *Holstein* procedieron del Banco de ADN de Animales de Granja de la Dirección de Recursos y Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) (Ver Anexo A). El Banco de ADN de Animales de Granja del INIA entre sus principales funciones es preservar material genético que represente la realidad de los recursos zoogenéticos de nuestro país.

Para calcular el tamaño muestral se utilizó la fórmula propuesta por *Kish* (1982) (79), considerando un nivel de confianza del 90%, se consideró un p de 0.5 (al tratarse de marcadores genéticos bialélicos, se asume que los dos alelos de cada marcador genético se encuentran en la misma proporción) y un error absoluto permitido del 10%; empleando la fórmula que se detalla a continuación.

Siendo:

$$n = \frac{z^2 * p * (1 - p) * N}{N * e^2 + z^2 * p * (1 - p)}$$

N= tamaño poblacional

n = tamaño muestral

p = probabilidad a favor o proporción que se espera encontrar

z = desviación estándar para lograr el nivel de confianza deseado

e= error absoluto permitido

La caracterización genotípica se realizó utilizando muestras de ADN de cuatro poblaciones de vacunos, las cuales estuvieron conformadas por: 96 muestras pertenecientes a la raza *Holstein* y 97 a *Brown Swiss*; mientras que las de ganado vacuno criollo 99 muestras provinieron del departamento de Apurímac y 69 de Amazonas (ver Tabla 5).

En cuanto a las características de los vacunos criollos, su crianza es extensiva al pastoreo, existe intercambio de animales y problemas de abigeato. Además, su reproducción es natural y los ganaderos no emplean registros productivos ni genealógicos, lo que hace que se desconozcan las características productivas y de parentesco de los individuos.

En el presente estudio, se eligió a las razas *Holstein* y *Brown Swiss* por ser las razas con mayor distribución en nuestro país; en cuanto, a la elección de vacunos del departamento de Apurímac, se eligió dicha región por tener el mayor porcentaje de vacunos criollos (87.90%) por departamento (Ver Anexo C). En el caso del departamento de Amazonas se eligió por presentar uno de los menores porcentaje de criollos y porque son escasos los estudios de caracterización de los vacunos de este departamento (Ver Anexo C).

Por el contrario, los vacunos de raza son de pastoreo intensivo, su reproducción está controlada por inseminación artificial y tienen un registro productivo y genealógico.

Tabla 5. Cantidad de individuos en las poblaciones en estudio

Población	Tamaño poblacional*	Tamaño muestral calculado	Tamaño muestral utilizado
<i>Holstein</i> La Libertad	31,124	67	96
<i>Brown Swiss</i> La Libertad	18,012	67	97
Criollo Apurímac	290,381	67	99
Criollo Amazonas	153,092	67	69

*A partir del IV Censo Nacional Agropecuario de 2012 se obtuvo la información sobre el tamaño de la población.

4.2. Aspectos éticos

El proyecto de investigación, con código de inscripción SIDISI: 208426, fue presentado y aprobado por el Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana

Cayetano Heredia (UPCH), bajo la categoría de revisión EXPEDITA registrada en la constancia 041-09-2022 (Ver Anexo B).

Asimismo, al tratarse de animales de granja que no son originarios de Perú, no fue necesario tener el permiso de autorización de acceso a los recursos genéticos aprobado por el Ministerio del Ambiente en coordinación con el Instituto Nacional de Innovación Agraria.

Cabe indicar que el Banco de ADN de Animales de granja del INIA, obtuvo el material genético presente en su banco mediante procedimientos estandarizados y respetando el bienestar animal. A su vez, la labor de la colecta de material biológico y extracción de sangre fue realizada por zootecnistas especializados en animales de granja, que trabajan en el INIA y las Estaciones Experimentales de este último, en los departamentos de Apurímac y Amazonas. Asimismo, la información del ganado vacuno y de sus propietarios es de acceso reservado.

4.3. Genotipificación de las proteínas lácteas α 1-caseína y α 2-caseína por la técnica de curvas de disociación de alta resolución (HRM)

La técnica de HRM es un análisis post-PCR que permite genotipificar polimorfismos de nucleótido simple mediante el análisis de la disociación de las cadenas de ADN. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador de tiempo real *QuantStudio 5 (Applied Biosciences, India)* y con un colorante fluorescente que intercala en la doble hebra de ADN, al aumentar la temperatura las cadenas dobles sintetizadas se separaron emitiéndose fluorescencia captada por el equipo, y a su vez, estos datos producidos permitieron la construcción de las curvas de HRM.

4.3.1. Detalles de los controles de la genotipificación por HRM de las variantes genéticas de las proteínas α 1-caseína (*CSN1S1* B* y *CSN1S1*C*) y α 2-caseína (*CSN1S2* A* y *CSN1S2*B*)

a) Controles de genotipificación de las variantes genéticas de la proteína α 1-caseína (genotipos *CSN1S1* BB*, *CSN1S1*BC* y *CSN1S1*CC*)

Para la realización del ensayo de HRM se utilizaron como controles muestras que por secuenciamiento previamente fueron genotipificados y se las denominó muestras-control (ver Anexo D); donde las muestras-control se obtuvieron por amplificación por PCR convencional haciendo uso de los cebadores *CSN1S1-F223: 5` CAC TGT TGC TTT TTC AAT GGT C 3`* y *CSN1S1-R223:*

5` AAG GCA ACA ATA TGC AGT CAT TT 3`; diseñados por *Jann et al.* (2002) (80), obteniendo un producto de amplificación de 225 pares de bases.

La reacción procedió con 0.02 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 0.3 μM cebadores en el termociclador convencional *Vapo.protect* (*Eppendorf, EEUU*) con ciclos de temperatura iniciando la denaturación a 94 °C por 5 minutos; seguido por 15 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 40 segundos a 66 °C y 1 minuto a 72 °C; luego 10 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 40 segundos a 56 °C y 1 minuto a 72 °C y una extensión final de 10 minutos a 72°C

Posteriormente las muestras-control se purificaron agregando 1:1 v/v de isopropanol helado, 1:4 v/v acetato de sodio 3M pH 5 y 1:4 v/v de EDTA, se mezcló por inversión e incubó por 20 minutos a -80 °C, y se centrifugó por 20 minutos a 13 000 rpm con rampa suave a 4°C; posteriormente se realizaron dos lavados con 1:10 v/v de etanol 95% y un lavado con 1:10 v/v de etanol 70%, seguidamente se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en buffer TE 10:1 para su uso. Por último, se realizaron diluciones seriadas de las muestras-control y se determinó usar en una dilución 1:1000 v/v en los ensayos de HRM.

b) Controles de genotipificación de las variantes genéticas de la proteína α₂-caseína (genotipos *CSN1S2 AA, *CSN1S2**AB y *CSN1S2**BB)**

Para la realización del ensayo de HRM se utilizaron como controles fragmentos sintetizados de ADN de doble cadena *gBlocks Gene Fragments* (*Integrated DNA Technologies, EEUU*), a los cuales se les denominó controles-sintéticos (ver Anexo D); que fueron resuspendidos en agua de grado molecular, según las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la cuantificación espectrofotométrica de los controles-sintéticos, haciendo uso del *Nanodrop* (*ThermoFisher, EEUU*) y se diluyó a una concentración de 5 ng/μL para su uso como controles de los genotipos *CSN1S2** AA y *CSN1S2**BB; asimismo, en el caso del genotipo heterocigoto se usó una mezcla 1:1 v/v de los dos genotipos homocigotos.

4.3.2. PCR en tiempo real y análisis por HRM de las variantes genéticas de la proteína α₁-caseína

La reacción de PCR del ensayo HRM procedió en un volumen final de 15 μL, conteniendo en una concentración final de 2.5 X MeltDoctor™ HRM Master Mix (*ThermoFisher, USA*) 0.3 μM cebadores y 1 μL de DNA 20 ng/μL y haciendo uso de los cebadores diseñados usando el programa Primer3, siendo estos α₁HRM-F: 5'- TGA CAT CCC TAA TCC CAT T-3' y α₁HRM-R: 5'-TTG ATA AGG CAA CAA

TAT GCT T-3'. Los ciclos de temperatura del PCR iniciaron con la denaturación a 95 °C por 10 minutos; seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C.

Posteriormente para el ensayo HRM post-PCR, se subió la temperatura a 95 °C por 10 segundos y disminuyendo a una tasa de 0.5 °C/ciclo la temperatura hasta 56 °C, luego se volvió a elevar la temperatura a 95 °C por 15 segundos, la cual fue disminuyendo a una tasa de 0.5 °C/ciclo hasta 60°C adquiriendo de forma continua la fluorescencia por cada cambio en la temperatura.

4.3.3. PCR en tiempo real y análisis por HRM de las variantes genéticas de la proteína α 2-caseína

La reacción de PCR del ensayo HRM procedió en un volumen final de 15 μ L, conteniendo en una concentración final de 2.5 X MeltDoctor™ HRM Master Mix (Thermofisher, USA) 0.3 μ M cebadores y 1 μ L de DNA 20 ng/ μ L y haciendo uso de los cebadores diseñados usando el programa Primer3, α S2HRM-F: 5'-TTG CTT TTG TTT GTA GAC GA-3' y α S2HRM-R: 5'-GGT CAT ATT CTG TTT TTA CTA ACC T-3'. Los ciclos de temperatura del PCR iniciaron con la denaturación a 95 °C por 10 minutos; seguido por 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 58 °C.

Posteriormente para el ensayo HRM post-PCR, se subió la temperatura a 95 °C por 10 segundos y disminuyendo a una tasa de 0.5 °C/ciclo la temperatura hasta 56 °C, luego se volvió a elevar la temperatura a 95 °C por 15 segundos, la cual fue disminuyendo a una tasa de 0.5 °C/ciclo hasta 60°C adquiriendo de forma continua la fluorescencia por cada cambio en la temperatura.

4.3.4. Análisis de datos de genotipificación por HRM

Las curvas *melting* del HRM fueron analizadas usando la herramienta *HRM analysis* de la plataforma *CloudDashboard Thermoscientific* (Disponible en URL: <https://apps.thermofisher.com/apps/spa/>). En este programa se realizó la normalización de la data cruda, la identificación de la Temperatura *Melting* (T_m) y la construcción de las curvas de identificación de los genotipos.

a) Construcción de las curvas de identificación de los genotipos de la proteína α 1-caseína

Para la construcción de las curvas de identificación de los genotipos *CSN1S1** BB, *CSN1S1**BC y *CSN1S1**CC, se usó como referencia las muestras-control; los cuales permitieron el agrupamiento de los genotipos homocigotos y heterocigotos representados con curvas unimodales y sinusoidal, respectivamente. Asimismo, se posicionó a la muestra-control homocigoto AA (*CSN1S1**BB) en el eje X de la gráfica de identificación de los genotipos, lo cual permitió que la muestra-control

homocigoto GG (*CSN1S1**CC) se disponga por encima de la gráfica y la muestra-control heterocigoto AG (*CSN1S1**BC) se disponga como una curva oscilante; y el resto de las muestras agruparon con cada una de las muestras-control.

b) Construcción de las curvas de identificación de los genotipos de la proteína α 2-caseína

Para la construcción de las curvas de identificación de los genotipos *CSN1S2** AA, *CSN1S2**AB y *CSN1S2**BB, se usó como referencia los controles-sintéticos; los cuales permitieron el agrupamiento de los genotipos homocigotos y heterocigotos representados con curvas unimodales y sinusoidal, respectivamente. Asimismo, se posicionó al control-sintético homocigoto TT (*CSN1S2**BB) en el eje X de la gráfica de identificación de los genotipos, lo cual permitió que el control-sintético homocigoto CC (*CSN1S2**AA) se disponga por encima de la gráfica y el control-sintético heterocigoto se disponga como una curva oscilante; y el resto de las muestras agruparon con cada uno de los controles-sintéticos.

4.4. Validación de los ensayos de HRM por secuenciamiento de Sanger

Para optimizar el método de HRM-PCR se realizó el secuenciamiento de Sanger se seleccionaron ciento doce (112) muestras para secuenciar el exón 17 del gen *CSN1S1*. El secuenciamiento de productos de amplificación por PCR de noventa y seis (96) muestras elegidas al azar se llevó a cabo en *Macrogen* (Korea) y dieciséis (16) muestras elegidas por conveniencia en el Laboratorio de Genómica y Biología Molecular del INIA.

Mientras que se seleccionaron sesenta y tres (63) muestras para secuenciar el exón 3 del gen de *CSN1S2*, en el Laboratorio de Genómica y Biología Molecular del INIA, de los cuales se eligieron al azar 40 correspondientes al genotipo *CSN1S2**AA y por conveniencia veintidós (22) con el genotipo *CSN1S2**AB y uno (1) con el genotipo *CSN1S2**BB.

En este último caso, se realizó amplificaciones por PCR, los amplicones se purificaron con lavados de isopropanol y etanol 70°C y se realizó la reacción de secuenciación haciendo uso de 1 μ L de los amplicones purificados, 0.0625 X *BigDye Terminator v3.1* y 0.15 μ M de uno de los 2 cebadores (*forward* o *reverse*) y una programación de ciclaje de 95 °C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 96 °C por 10 s, 50 °C por 30 s y 60 °C por 150 segundos. Esta reacción fue purificada haciendo uso de los reactivos del *MCLAB's BigDye sequencing Clean up kit* (MCLAB, EEUU) siguiendo el protocolo sugerido por el kit; y los productos fueron separados en el analizador genético ABI 3500XL.

Seguidamente, los cromatogramas obtenidos fueron analizados haciendo uso del software bioinformático *Unipro UGENE*(81) y del software *Codon Aligner* (*CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts*). A continuación, se detallan las condiciones de la amplificación por PCR que se llevó a cabo para secuenciar las muestras de ADN y confirmar los resultados del HRM

a) Amplificación por PCR para secuenciar los genotipos de las variantes de la proteína α 1-caseína

Condición 1. Noventa y seis (96) muestras que fueron elegidas al azar se amplificaron por PCR utilizando los cebadores α 1HRM-F: 5'- TGA CAT CCC TAA TCC CAT T-3' y α 1HRM-R: 5'-TTG ATA AGG CAA CAA TAT GCT T-3'. La reacción de PCR procedió con 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de MgCl₂, 0.3 μ M de cebadores y 0.08 U de Taq DNA polimerasa (*Invitrogen, USA*); con ciclos de temperatura de denaturación a 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 30 s, temperatura de alineamiento 56 °C por 40 s y 72 °C por 30 s y un ciclo de extensión de 72 °C por 15 minutos.

Condición 2. Dieciséis (16) muestras que fueron elegidas por conveniencia se amplificaron por PCR utilizando los cebadores diseñados por Jann *et al.* 2002 (80); siendo estos CSN1S1-F: 5` CAC TGT TGC TTT TTC AAT GGT C 3`y CSN1S1-R: 5` AAG GCA ACA ATA TGC AGT CAT TT. La reacción de PCR procedió con 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de MgCl₂, 0.3 Mm, 0.08 U de Taq DNA polimerasa (*Invitrogen, USA*) y 20 ng de ADN; con ciclos de temperatura de denaturación a 95 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 30 s, temperatura de alineamiento de 56 °C por 30 s y 72 °C por 1 minuto y un ciclo de extensión de 72 °C por 10 minutos.

b) Amplificación por PCR para secuenciar los genotipos de las variantes de la proteína α 2-caseína

Para la amplificación por PCR del exón 3 del gen *CSN1S2* se utilizaron cebadores diseñados por *Ibeagha-Awemu et al.* 2007 (55), siendo estos B α S2_6090F: 5'-CCT AAA AGT CTC TTG CCA TC-3'y B α S2_6342R: 5' ACA GTT CTA GAC TCA CTG GAG A 3'. La reacción de PCR procedió con 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de MgCl₂, 0.3 μ M de cebadores y 0.08 U de Taq DNA polimerasa (*Invitrogen, USA*), con ciclos de temperatura de denaturación de 95 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 30 s, temperatura de alineamiento de 60 °C por 30 s y 72 °C por 1 minuto y un ciclo de extensión de 72 °C por 10 minutos.

4.5. Análisis estadístico

La relación entre el genotipo (*CSN1S1** BB, *CSN1S1**BC, *CSN1S1**CC, *CSN1S2** AA, *CSN1S2**AB y *CSN1S2**BB) y el tipo de población (Vacunos de raza Holstein, Brown Swiss, Criollos de Apurímac y Amazonas) fue estimado mediante Chi-cuadrado. A partir de estas frecuencias genotípicas se determinó las frecuencias alélicas usando el código de *Lárusson* (2021) (82) y la desviación del Equilibrio de *Hardy-Weinberg* fue calculada mediante la prueba de Chi cuadrado usando el paquete *HardyWeinberg* en R.

El índice de Fijación (F_{ST}) y el coeficiente de endogamia (f) fueron calculados con el software *Genealex* (83), según lo planteado por *Wright* (1965) (84); asimismo, para la interpretación de los valores del F_{ST} se tomó en cuenta las categorías de diferenciación genética según los valores que toma el F_{ST} como: poca diferenciación genética ($0 < F_{ST} < 0.05$), diferenciación genética moderada ($0.05 \leq F_{ST} < 0.15$), gran diferenciación genética ($0.15 \leq F_{ST} < 0.25$) y diferenciación genética muy grande ($0.25 \leq F_{ST}$) (84). Para interpretar los valores del coeficiente de endogamia (f) es necesario tomar en cuenta los valores de la Heterocigocidad observada (H_o) y Heterocigocidad esperada (H_e), en el caso de valores de $f=0$ ($H_e = H_o$) no hay endogamia y las frecuencias genotípicas no presentan desviación del HWE; mientras que valores de $f>0$ ($H_e > H_o$) representa que las frecuencias genotípicas presentan desviación del HWE por un exceso de homocigotos y en el caso de $f<0$ ($H_e < H_o$) representa que las frecuencias genotípicas presentan desviación del HWE por un exceso de heterocigotos (85).

5. RESULTADOS

5.1. Genotipificación de las proteínas lácteas α 1-caseína y α 2-caseína, por la técnica de curvas de disociación de alta resolución (HRM) Genotipificación de las variantes genéticas de la proteína α 1-caseína (genotipos *CSN1S1** BB, *CSN1S1**BC y *CSN1S1**CC)

En la Figura 5, se muestra las curvas de identificación de los genotipos de la proteína α 1-caseína, distinguiéndose los genotipos homocigotos representados con curvas unimodales, siendo el genotipo *CSN1S1**BB (curvas de color verde claro) y *CSN1S1**CC (curvas de color violeta) con mayor y menor tamaño de curva, respectivamente. Mientras que, el genotipo heterocigoto *CSN1S1**BC se representa con curvas de forma sinusoidal (curvas de color verde oscuro).

En la Figura 6, se muestran los cromatogramas de las secuencias de los genotipos de la proteína α 1-caseína, corroborando así el resultado de genotipificación por individuo, que previamente ha sido determinado por el método HRM (ver Tabla 6). Además, se observa la posición del SNP rs43703010

(ícono triangular) en cada secuencia; es así que en esta posición existe un solo pico correspondiente al nucleótido adenina en el caso del genotipo *CSN1S1**BB. Mientras que en el genotipo *CSN1S1**CC se presenta un pico correspondiente al nucleótido guanina y se observan dos picos en el cromatograma del genotipo *CSN1S1**BC correspondiente a los nucleótidos adenina y guanina (ver Figura 6).

Las muestras secuenciadas por Sanger fueron ciento doce (112), las cuales correspondieron a los genotipos determinados por HRM, lo cual indica que la genotipificación por esta técnica permite discriminar los tres genotipos (ver Tabla 6).

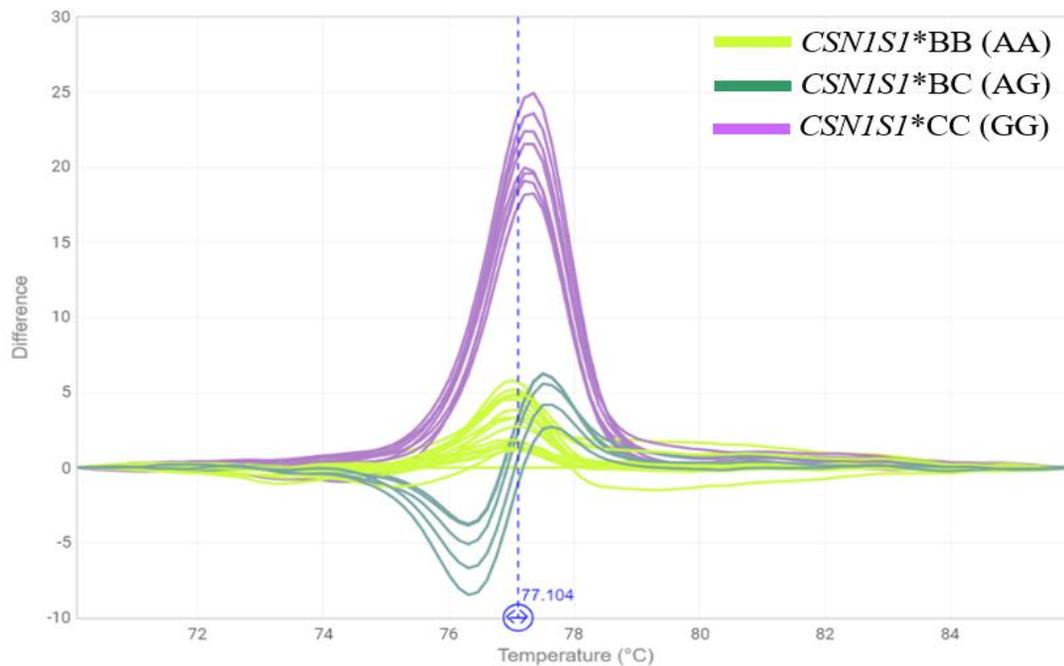


Figura 5. Identificación de los genotipos de la proteína $\alpha 1$ -caseína mediante el análisis de curvas de disociación de alta resolución.

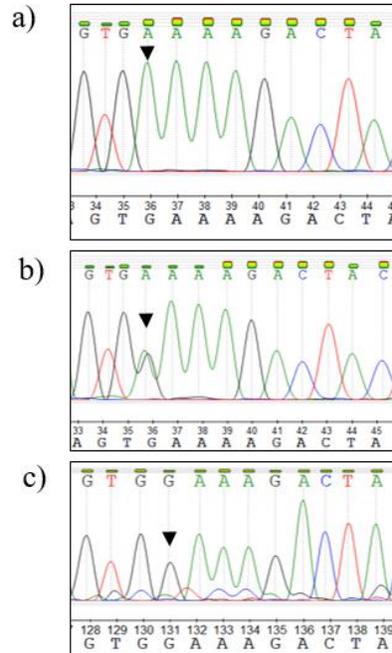


Figura 6. Cromatogramas de las variantes genéticas de la proteína α 1-caseína.

a) genotipo CSN1S1*BB, b) genotipo CSN1S1*BC y c) genotipo CSN1S1*CC

▼ : posición del SNP rs43703010

Tabla 6. Correspondencia de secuenciamiento y del análisis HRM respecto a las variantes de la proteína α 1-caseína

Variantes <i>CSN1S1</i> (rs43703010)						Total
BB		BC		CC		
HRM	Sec. Sanger	HRM	Sec. Sanger	HRM	Sec. Sanger	
95	95	10	10	7	7	112

b) Genotipificación de las variantes genéticas de la proteína α 2-caseína (genotipos *CSN1S2 AA, *CSN1S2** AB y *CSN1S2** BB)**

En la Figura 7, se muestra las curvas de identificación de los genotipos de la proteína α 2-caseína, es así que el genotipo homocigoto *CSN1S2**AA está representado como una curva unimodal (curvas de color anaranjado), el genotipo *CSN1S2**BB está representado con curvas paralelas al eje “x” (curvas de color violeta) y el genotipo heterocigoto *CSN1S2**AB se representa con curvas de forma sinusoidal (curvas de color azul).

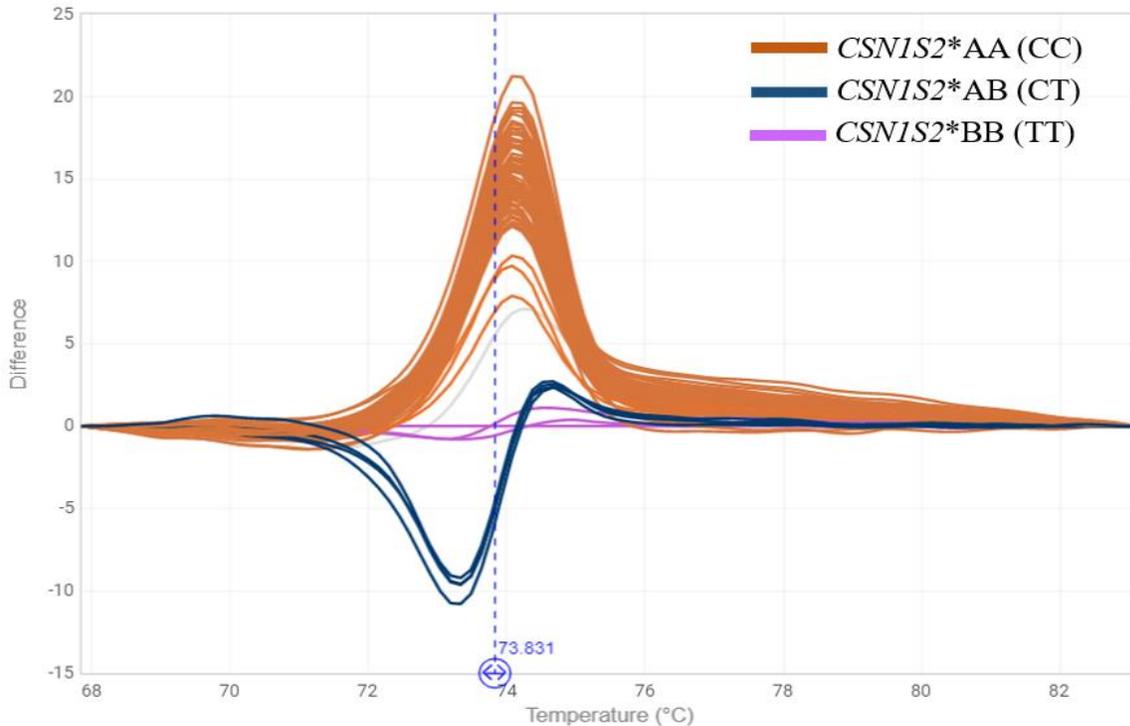


Figura 7. Identificación de los genotipos de la proteína α 2-caseína mediante el análisis de curvas de disociación de alta resolución

En la Figura 8, se muestran los cromatogramas de las secuencias de los genotipos de la proteína α 2-caseína. En cada uno de estos se observa la posición del SNP rs441966828 (ícono triangular); es así que en esta posición existe un solo pico correspondiente al nucleótido citosina en el caso del genotipo *CSN1S2*AA*, de igual forma se presenta el nucleótido timina para el genotipo *CSN1S2*BB*; por otra parte, se observa dos picos en el cromatograma del genotipo *CSN1S2*AB* correspondiente a los nucleótidos citosina y timina.

El secuenciamiento por Sanger confirmó los resultados de los genotipos *CSN1S2*AA* y *CSN1S2*BB*, obtenidos por HRM. Sin embargo, en el caso de los heterocigotos *CSN1S2*AB* genotipados por HRM, solo 13 corresponden al genotipo *CSN1S2*AB* para el SNP rs441966828; por el contrario, los otros 9 son heterocigotos en la posición del SNP rs460423501 que se encuentra al lado del SNP en estudio en el mismo codón (ver Figura 9). Por lo que se determinó que esos 9 individuos tendrían el genotipo *CSN1S2*AA* (Ver Tabla 7), siendo estas muestras de individuos de la raza *Holstein*.

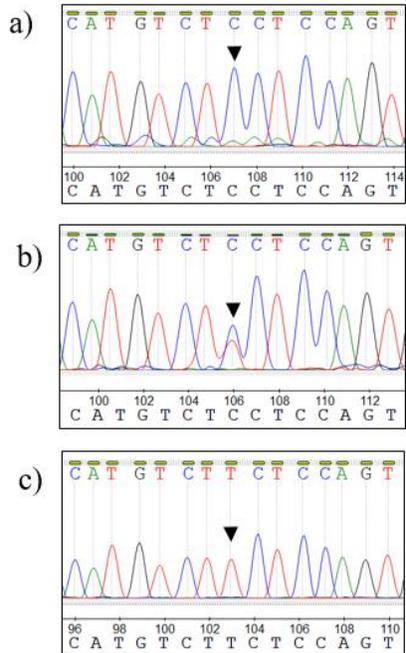


Figura 8. Cromatogramas de las variantes genéticas de la proteína α 2-caseína.
 a) genotipo *CSN1S2**AA, b) genotipo *CSN1S2**AB y c) genotipo *CSN1S2**BB
 ▼ : posición del SNP rs441966828

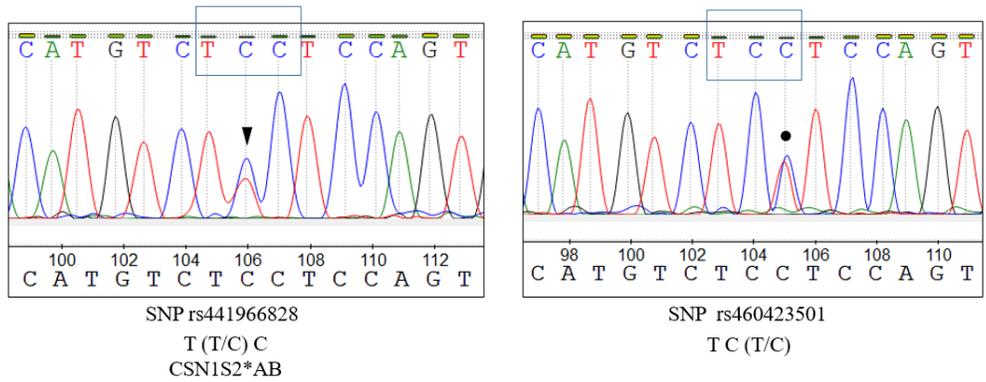


Figura 9. Cromatogramas de los SNPs rs441966828 y rs460423501.
 ▼ : posición del SNP rs441966828, ● : posición del SNP rs460423501

Tabla 7. Correspondencia HRM y secuenciación Sanger respecto a las variantes de la proteína α 2-caseína

Población de vacunos	Variantes <i>CSN1S2</i> (rs441966828)						Total
	AA		AB		BB		
	HRM	Sec. Sanger	HRM	Sec. Sanger	HRM	Sec. Sanger	
<i>Holstein</i>			9	0*			9
<i>Brown Swiss</i>	3	3	2	2			5
Criollo Apurímac	23	23	3	3	1	1	27
Criollo Amazonas	14	14	8	8			22

5.2. Frecuencias genotípicas, alélicas y determinación de la desviación de HWE

En la Tabla 8 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes genéticas (*CSN1S1**BB, *CSN1S1**BC, *CSN1S1**CC, *CSN1S2**AA, *CSN1S2**AB, *CSN1S2**BB) en cada una de las cuatro poblaciones. Con respecto a las variantes genéticas de la proteína α 1-caseína, la raza *Holstein* presentó la mayor frecuencia del genotipo *CSN1S1**BB con 99 %, a diferencia de los vacunos criollos de Apurímac y Amazonas con 53.5 y 56.5 %, respectivamente. Sin embargo, se observó que los vacunos criollos de Amazonas y Apurímac presentaron mayor frecuencia de heterocigotos *CSN1S1**BC con 42.0 y 33.3 %, respectivamente, en comparación a los vacunos de raza (*Holstein* y *Brown Swiss*) con menos del 15.5 %.

En cuanto a las variantes genéticas de la proteína α 2-caseína, el genotipo *CSN1S2**AA es el más frecuente; la raza *Holstein* presentó una frecuencia de 100%, siendo esta la mayor frecuencia encontrada en *Brown Swiss*, Apurímac y Amazonas con 97.9, 96 y 88.4 %, respectivamente. Por el contrario, respecto al genotipo heterocigoto *CSN1S2**AB, los vacunos criollos de Amazonas, Apurímac y *Brown Swiss* presentaron frecuencias de 11.6, 3.0 y 2.1 %, respectivamente, a diferencia del ganado *Holstein*, en el que no se encontraron heterocigotos.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas (%) de las proteínas α 1-caseína y α 2-caseína

Proteína Gen	<i>Holstein</i> (%) n=96	<i>Brown Swiss</i> (%) n=97	Apurímac (%) n=99	Amazonas (%) n=69
--------------	-----------------------------	--------------------------------	----------------------	----------------------

α 1-caseína	BB	BC	CC	BB	BC	CC	BB	BC	CC	BB	BC	CC
<i>CSN1S1</i>	99.0	1.0	0.0	83.5	15.5	1.0	53.5	33.3	13.1	56.5	42.0	1.4

$R^2 = 69.62$, $df = 4$, $p < 0.05$, $p\text{-value} = 2.736 \times 10^{-14}$

α 2-caseína	AA	AB	BB	AA	AB	BB	AA	AB	BB	AA	AB	BB
<i>CSN1S2</i>	100	0.0	0.0	97.9	2.1	0.0	96.0	3.0	1.0	88.4	11.6	0.0

$R^2 = 9.66$, $df = 4$, $p < 0.05$, $p\text{-value} = 0.04$

Por lo que se refiere a las frecuencias alélicas (ver Tabla 9), en la proteína α 1-caseína, el alelo *CSN1S1**B es el más frecuente en las cuatro poblaciones; en particular, los vacunos de raza *Holstein* y *Brown Swiss* presentaron frecuencias alélicas de 0.99 y 0.92, respectivamente; en contraste con los vacunos criollos de Amazonas y Apurímac con frecuencias de 0.78 y 0.70, de forma respectiva. Ahora bien, en cuanto al alelo *CSN1S1**C se encontró que en vacunos de raza *Brown Swiss* y *Holstein* es menos frecuente con 0.08 y 0.01, correspondientemente; mientras, que en los vacunos criollos de Apurímac y Amazonas se obtuvo frecuencias de 0.30 y 0.22, en el orden dado. En relación con la proteína α 2-caseína, el alelo *CSN1S2**A es el más frecuente en las cuatro poblaciones de ganado *Holstein*, *Brown Swiss*, criollos de Apurímac y Amazonas con frecuencias cercanas a la fijación de 1.00, 0.99, 0.97 y 0.94, correspondientemente.

Por otro lado, al analizar la desviación del equilibrio *Hardy-Weinberg* (HWE) en las cuatro poblaciones mencionadas (ver Tabla 9) mediante el cálculo de Chi cuadrado, respecto a la proteína α 1-caseína las poblaciones de vacunos de raza *Holstein*, *Brown Swiss* y criollos de Amazonas no presentaron desviación del equilibrio de HWE no significativa ($P > 0.05$); sin embargo, la población de vacunos criollos de Apurímac presentó desviación del equilibrio de HWE significativa ($P < 0.05$), que se debe a que la H_o es menor que H_e lo que indica exceso de homocigotos.

A su vez, en relación con la proteína α 2-caseína solo la población de vacunos criollos de Apurímac presentó desviación del equilibrio de HWE altamente significativa ($P < 0.001$); asimismo, los valores del coeficiente de endogamia f fueron significativos en las poblaciones de ganado criollo de Apurímac y Amazonas fueron 0.38 ($p < 0.01$) y -0.06 ($p < 0.001$), respectivamente; indicando exceso de homocigotos en los vacunos criollos de Apurímac (y exceso de heterocigotos en el caso de los vacunos criollos de Amazonas (ver Tabla 9).

Tabla 9. Frecuencias alélicas, Test del equilibrio de Hardy-Weinberg estimado con Chi cuadrado y Coeficiente de endogamia de las proteínas α 1-caseína y α 2-caseína de cuatro poblaciones de vacunos

<i>α1-caseína</i>								
Poblaciones	Frecuencias alélicas		HWE		Coeficiente de endogamia (<i>f</i>)			
	<i>CSN1S1*B</i>	<i>CSN1S1*C</i>	χ^2	p-valor	H_o	H_e	<i>f</i>	p-valor
<i>Holstein</i>	0.99	0.01	0	0.96 ^{n.s.}	0.01	0.01	0.00	0.85 ^{n.s.}
<i>Brown Swiss</i>	0.92	0.08	0.11	0.75 ^{n.s.}	0.15	0.16	0.03	0.79 ^{n.s.}
Criollos Apurímac	0.7	0.3	4.09	0.04 ^{**}	0.33	0.42	0.20	0.07 ^{n.s.}
Criollos Amazonas	0.78	0.22	2.94	0.09 ^{n.s.}	0.42	0.35	-0.21	0.15 ^{n.s.}
<i>α2-caseína</i>								
Poblaciones	Frecuencias alélicas		HWE		Coeficiente de endogamia (<i>f</i>)			
	<i>CSN1S2*A</i>	<i>CSN1S2*B</i>	χ^2	p-valor	H_o	H_e	<i>f</i>	p-valor
<i>Holstein</i>	1	0	monomórfico	-	0.00	0.00	0.00	0.63 ^{n.s.}
<i>Brown Swiss</i>	0.99	0.01	0.01	0.92 ^{n.s.}	0.02	0.02	0.00	0.39 ^{n.s.}
Criollos Apurímac	0.97	0.03	14.63	0.00 ^{***}	0.03	0.05	0.38	0.02 ^{**}
Criollos Amazonas	0.94	0.06	0.26	0.61 ^{n.s.}	0.12	0.11	-0.06	0.00 ^{***}

H_o : Heterocigosidad Observada, H_e : Heterocigosidad esperada, *f*: Coeficiente de endogamia, χ^2 : Chi cuadrado, n.s.= no significativo, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

5.3. Análisis del Índice de Fijación (F_{ST})

Los resultados del análisis del Índice de Fijación (F_{ST}) entre las cuatro poblaciones de vacunos (*Holstein*, *Brown Swiss*, criollos de Amazonas y Apurímac), indican diferentes grados de diferenciación genética por pares de poblaciones comparadas (ver Tabla 10 y 11). En relación con la proteína α 1-caseína, al comparar los valores de estadístico F_{ST} de los vacunos de la raza *Holstein* con los criollos de Apurímac y Amazonas se obtuvo valores altamente significativos ($P<0.01$) de 0.28 y 0.24, respectivamente (ver Tabla 10); indicando en ambos casos una gran diferenciación genética entre los vacunos criollos y la raza *Holstein*. Por otra parte, respecto de los vacunos de raza *Brown Swiss* comparada con los criollos de Apurímac y Amazonas se obtuvo valores altamente significativos

($P < 0.01$) de 0.13 y 0.07, correspondientemente: indicando una diferenciación genética moderada entre vacunos criollos y la raza *Brown Swiss*.

Por lo que se refiere entre vacunos de raza, al comparar *Holstein* con *Brown Swiss* se obtuvo un valor de F_{ST} altamente significativos ($P < 0.01$) de 0.07 (ver Tabla 10); lo que indica que es una diferenciación genética moderada; ahora bien, al comparar los vacunos criollos de Apurímac y Amazonas se obtuvo un valor de F_{ST} no significativo ($P > 0.05$) de 0.01.

Tabla 10. Valores de Índice de Fijación (F_{ST}) de la proteína $\alpha 1$ -caseína de cuatro poblaciones de vacunos

Poblaciones en comparación	F_{ST}	P-valor	Significancia
<i>Holstein-Brown Swiss</i>	0.07	0.01	**
<i>Holstein-Apurímac</i>	0.28	0.01	**
<i>Holstein-Amazonas</i>	0.24	0.01	**
<i>Brown Swiss-Apurímac</i>	0.13	0.01	**
<i>Brown Swiss-Amazonas</i>	0.07	0.01	**
Apurímac-Amazonas	0.01	0.17	n.s.

n.s.: no significativo. **: altamente significativo. Estimación del Índice de Fijación (F_{ST}) ($P < 0.01$)

Tabla 11. Valores de Índice de Fijación (F_{ST}) de la proteína $\alpha 2$ -caseína de cuatro poblaciones de vacunos

Poblaciones en comparación	F_{ST}	P-valor	Significancia
<i>Holstein-Brown Swiss</i>	0.01	0.500	n.s.
<i>Holstein-Apurímac</i>	0.02	0.070	n.s.
<i>Holstein-Amazonas</i>	0.06	0.001	*
<i>Brown Swiss-Apurímac</i>	0.00	0.420	n.s.
<i>Brown Swiss-Amazonas</i>	0.03	0.020	*
Apurímac-Amazonas	0.01	0.160	n.s.

n.s.: no significativo. *: significativo. Estimación del Índice de Fijación (F_{ST}) ($P < 0.05$)

Con respecto, a la proteína $\alpha 2$ -caseína, al comparar los valores de estadístico F_{ST} del ganado vacuno criollo de Amazonas con los de raza *Holstein* y *Brown Swiss* se obtuvo valores significativos ($P < 0.05$) de 0.06 y 0.03, respectivamente (ver Tabla 11); indicando en ambos casos una diferenciación

genética moderada entre el ganado criollo de Amazonas y los de raza. Mientras tanto al comparar los valores F_{ST} entre vacunos de raza y/o criollos se obtuvieron valores de F_{ST} no significativos ($P>0.05$).

6. DISCUSIÓN

Las variantes genéticas de la proteína láctea $\alpha 1$ -caseína, son excelentes marcadores de selección relacionados con el contenido de grasa y proteína en la leche (59, 60); mientras que las variantes genéticas de la proteína láctea $\alpha 2$ -caseína, son utilizados como marcadores genéticos para determinar introgresión genética y trazar las historias evolutivas de las razas vacunas del género *Bos* (86). En ese sentido, las variantes genéticas de las proteínas $\alpha 1$ -caseína y $\alpha 2$ -caseína, fueron caracterizadas en cuatro poblaciones de vacunos, donde se optó por ganado de raza *Holstein* y *Brown Swiss* por ser entre las razas de mayor propagación en el Perú (15); asimismo, se consideró los denominados criollos o de raza no definida, debido a que este tipo de ganado en nuestro país representan el 64 % del total de vacunos; todavía cabe señalar, que se consideraron a los vacunos criollos de Amazonas y Apurímac por ser de la selva y la sierra, correspondientemente, con altitud, latitud y climas diferentes.

Respecto a la proteína $\alpha 1$ -caseína, en las cuatro poblaciones caracterizadas se obtuvo que el genotipo más frecuente fue *CSN1S1*BB*. Particularmente, existen diferencias en las frecuencias genotípicas entre las cuatro poblaciones estudiadas; donde se observa en el ganado *Holstein* una frecuencia del 99 % para el genotipo *CSN1S1*BB* y 1 % para el genotipo *CSN1S1*BC*; lo encontrado se corresponde con lo reportado por Meier *et al.*(2019) donde reportaron una frecuencia de *CSN1S1*BB* de 0.995 para ganado *Holstein* (87); asimismo, se ha descrito que es raro encontrar en *Holstein* al alelo *CSN1S1*C* en homocigosis (59), como en el presente estudio.

En el caso de la raza *Brown Swiss*, se obtuvo una frecuencia de 83.5 % del genotipo *CSN1S1*BB*, 15.5 % de heterocigotos y 1% del genotipo *CSN1S1*CC*; de igual forma Meier *et al.*(2019) han reportado, frecuencias del genotipo *CSN1S1*BB* mayor al 80 % y 1 % del genotipo *CSN1S1*CC* en vacunos *Brown Swiss* (87); por lo que lo encontrado en el presente estudio coincide con lo reportado.

En el caso de los criollos de Apurímac y Amazonas se obtuvo frecuencias del genotipo *CSN1S1*BB* del 53.5 y 56.6 %, respectivamente. Cabe mencionar que hasta el momento no se han caracterizado genéticamente estas dos poblaciones y mucho menos se han caracterizado las proteínas lácteas α 1-caseína y α 2-caseína.

En relación con las frecuencias alélicas de la proteína α 1-caseína, se encontró que los vacunos de raza *Holstein* y *Brown Swiss* presentan mayor frecuencia del alelo *CSN1S1*B* de 0.99 y 0.92, correspondientemente, comparados con los vacunos criollos de Amazonas y Apurímac con frecuencias de 0.78 y 0.70, correlativamente. Así, por ejemplo, en nuestro caso *Holstein* tiene una frecuencia cercana a la fijación, como lo reportado en vacunos *Holstein* de Alemania (51), Polonia y Dinamarca (88) de 0.99; asimismo, se ha reportado en *Holstein* frecuencias del alelo *CSN1S1*B* de 0.98 en Turquía (45), 0.94 en EE.UU (89) y Corea del Sur (90). Consideremos ahora las frecuencias alélicas de *CSN1S1*B* del vacuno de raza *Brown Swiss* que se obtuvo en este trabajo de investigación comparadas con las frecuencias de vacunos *Brown Swiss* de 0.90, 0.94 en Turquía (91, 92) y 0.97 en EE.UU (93).

En el caso de vacunos criollos de Apurímac y Amazonas, las frecuencias alélicas de *CSN1S1*B* fueron de 0.70 y 0.78, correlativamente; asimismo, las frecuencias del alelo *CSN1S1*C* de las dos poblaciones antes mencionadas fueron de 0.30 y 0.22, respectivamente. Es importante mencionar el origen de los vacunos criollos en el Perú, los cuales tienen información genética heredada de ganado vacuno de España, Portugal y África del virreinato (17, 94, 95); se asume que hay contribución genética de las poblaciones vacunas portuguesas en el criollo sudamericano (96). Al comparar los resultados obtenidos en esta Tesis con las frecuencias alélicas de *CSN1S1*B* en razas españolas *Asturian Mountain*, *Asturian Valley*, *Casta Navarra* y *Menorquina* se encuentran frecuencias de 0.61, 0.78, 0.83 y 0.85 respectivamente (97) y en razas portuguesas como: *Alentejana*, *Arouquesa*, *Barrosa*, *Cachena*, *Marinhoa*, *Maronesa*, *Mertolenga*, *Minhota*, *Mirandesa* y *Ramo Grande* en las que se encuentran frecuencias de 0.61, 0.74, 0.73, 0.69, 0.68, 0.71, 0.55, 0.80, 0.81, 0.77, respectivamente (96). Asimismo, es importante considerar que los vacunos criollos presentarían información genética de razas taurinas (p. ej. o *Holstein*, *Brown Swiss*) e indicinas (p. ej. o *Brahman* y *Gyr*) introducidas desde la mitad del siglo pasado (13, 98).

Es necesario recalcar que las frecuencias del alelo *CSN1S1*B* encontradas en vacunos son la consecuencia de la presión de selección dirigida a acentuar este marcador en la producción de leche,

es más se ha aseverado que la pérdida del alelo *CSN1S1**C ocurre con mayor frecuencia en razas vacunas altamente seleccionadas (99). Es así que, en muchas razas taurinas se encuentra fijado el alelo *CSN1S1**B como en: *Angler*, *German Yellow*, *Highland cattle*, *Limpurger* y *Shorthorn* (53); y tienden a la fijación como en *Ayrshire* de Finlandia (100), *Holstein* de Alemania (51) y *Simmental* (45). Cabe mencionar que la raza *Holstein* es reconocida como la raza bovina con mayor producción de leche comparadas con otras razas lecheras como la *Brown Swiss* (101); dado que, el genotipo *CSN1S1** BB está relacionado con mayor cantidad de leche(102) y presente en estas dos razas mencionadas (45, 51, 88-93); por lo que los resultados obtenidos en esta investigación se corresponden con lo referenciado.

En relación con alelo *CSN1S1**C, las frecuencias que se obtuvo en los vacunos criollos de Apurímac y Amazonas fueron similares a las encontradas en otras razas taurinas como: *Eringer*, *Pinzagger*, *Hungarian Grey Steppe*, *Jersey*, *Sarabi* con frecuencias de 0.23, 0.26, 0.28, 0.33 y 0.40, respectivamente (53). Habría que decir también, que el alelo *CSN1S1**C se encuentra en razas indicinas como: *Golpayegani*, *Gyr* y *Butana* con frecuencias de 0.48, 0.50 y 0.66, respectivamente (53, 103). Se debe agregar que, el genotipo *CSN1S1**CC está relacionado con mayor cantidad de grasa y proteína (104); de manera que, se puede conjeturar que los vacunos criollos presentan genotipos relacionados tanto con la habilidad de producir mayor cantidad de leche (alelo *CSN1S1**B) y mayor cantidad de proteína y grasa en leche (alelo *CSN1S1**C).

Por lo que se refiere, a la proteína α 2-caseína se obtuvo que el genotipo más frecuente fue *CSN1S2**AA en las cuatro poblaciones caracterizadas; el cual se ha reportado ser el más común dentro de los vacunos *Bos taurus* (46). Es así que, en *Holstein* el alelo *CSN1S2**A es monomórfico con una frecuencia de 1, mientras que en vacunos *Brown Swiss* y criollos de Apurímac y Amazonas se encontraron frecuencias cercanas a la fijación de 0.99, 0.97 y 0.94, respectivamente. Del mismo modo, han sido encontradas frecuencias cercanas a la fijación de 0.99 y 0.95 en vacunos de raza *Holstein* y *Brown Swiss*, de manera respectiva (87); asimismo, en el caso de razas portuguesas el alelo *CSN1S2**A está fijado en *Alentejana*, *Arouquesa*, *Barrosa*, *Cachena*, *Marinhao*, *Maronesa*, *Mirandesa* y *Ramo Grande* (96) y de la misma forma en las razas españolas *Asturian Mountain*, *Asturian Valley*, *Casta Navarra*, *Menorquina* y *Retinta* (53, 97).

Por lo que se refiere al alelo *CSN1S2**B, este es un marcador molecular que indica introgresión indicina y se encuentra mayoritariamente en vacunos *Bos indicus* (55), siendo así la presente

investigación encontró posible introgresión de *Bos indicus* en vacunos Brown Swiss y criollos de Apurímac y Amazonas con frecuencias alélicas de 0.01, 0.03 y 0.06, respectivamente. En el caso de *Brown Swiss* se ha reportado introgresión indicina (105), pudiendo ser encontrado el alelo *CSN1S2*B* en esta raza en una frecuencia 0.05 (87). Asimismo, se ha encontrado el alelo *CSN1S2*B* en otras razas taurinas como: *Hungarian Grey Steppe*, *Sarabi* y *Pinzgauer* en frecuencias de 0.05, 0.09 y 0.26, correlativamente (53). Mientras que en razas indicinas el alelo *CSN1S2*B* se ha reportado en *Gyr*, *Golpayegani* y *Sistani* con frecuencias de 0.29, 0.13 y 0.6, respectivamente (53). Entre las razones por las que se encuentra en menor frecuencia el alelo *CSN1S2*B* se debe a la deriva génica (106) por la presión de selección en el ganado vacuno.

Mientras que en vacunos criollos sudamericanos, la presencia alelo *CSN1S2*B* se deba a una posible ancestría indicina de introgresión genética en los vacunos *Bos taurus* llegados en el siglo XV (1, 105, 107), por eventos recientes del cruzamiento con *Brown Swiss* y razas cebuinas que llegaron a nuestro país a partir del año 1938 (14). En particular, los criollos de Apurímac posiblemente tengan ancestría indicina, por la contribución genética en la época colonial y/o por el cruzamiento que ha existido durante años con *Brown Swiss* y razas cebuinas (108). Asimismo, en el caso de los criollos de Amazonas, la ancestría indicina estaría relacionada por el cruzamiento de razas introducidas; tales como *Brown Swiss*, *Simmental* y cebuinos (108, 109), así como también ha ingresado material genético (semen congelado y embriones) de *Angus* (110); en los cuales se han encontrado frecuencias del alelo *CSN1S2*B* de 0.39, 0.37, 0.08, 0.05 y 0.002 en *Nelore*, *Brahman*, *Angus*, *Brown Swiss* y *Simmental*, respectivamente (55, 87, 107).

Ahondando en la historia colonial en el vacuno criollo cabe mencionar las diferentes rutas por las que los vacunos se han dispersado en América, con la colonización española desde las Antillas se han establecido tres rutas; en la primera llegaron a Cuba, luego a México y posteriormente a Norteamérica, una segunda ruta llegó al Caribe siguió hacia Venezuela hasta Colombia y una tercera ruta desde Río de la Plata hacia Perú, Bolivia, Paraguay, Chile, Argentina y Uruguay. (111) Mientras que con la colonización portuguesa llegaron desde Portugal y Cabo Verde vacunos hacia Brasil.(112) Es importante mencionar que para llegar a América desde la Península Ibérica se realizaron paradas en Cabo Verde y las Islas Canarias lo que trajo consigo intercambio de animales (112), se menciona que por la proximidad entre las Islas Canarias y África, habrían llegado vacunos africanos al continente americano por las Islas Canarias (113) y se ha evidenciado que algunas vacas de la Península Ibérica presentarían ancestría taurina africana y ancestría indicina (1) por lo que es posible

que los bovinos criollos estarían presentando introgresión indicina de ese tiempo; y más aún cuando el alelo *CSN1S2*B* se ha reportado en razas portuguesas y españolas (53, 96, 97).

El siguiente punto a tratar es el análisis de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) que permite analizar la cantidad de variación genética en una población y se asumen similitud en las frecuencias alélicas entre sexos y el mismo éxito reproductivo, así como la ausencia de: selección, deriva génica, migración y mutación en una población sin desviación del HWE; además, las desviaciones de HWE indican endogamia, estratificación de la población, deriva génica o error de genotipado (114).

En el caso de la proteína α 1-caseína se estimó la desviación del HWE usando la prueba Chi cuadrado. En particular, los vacunos de raza *Holstein*, *Brown Swiss* y criollos de Amazonas no presentan desviación significativa ($p > 0.05$) de HWE. Mientras que en el caso de los criollos de Apurímac presentan desviación significativa ($p < 0.05$) de HWE por la falta de heterocigotos ($H_e > H_o$) y reflejado por el coeficiente de endogamia ($f = 0.20$). La continua presión de selección artificial por producción lechera contribuiría al exceso de homocigotos, se ha descrito que la reproducción predominante en Apurímac es con ganado vacuno de razas *Holstein*, *Brown Swiss* y cebú (108); como consecuencia el ganado vacuno criollo de la Sierra es del tipo lechero de acuerdo a los índices zootécnicos, anamórficos y pelvianos (12). Asimismo, es importante mencionar que un estudio realizado en ganado caprino criollo de Apurímac, se encontró que las poblaciones presentaron desviación del HWE por déficit de heterocigotos (115), el mismo patrón se encontró en un estudio realizado en ganado suino criollo de Apurímac (116) en donde el mismo estudio reportó que el 65% de los criadores prefieren comprar sus animales en el mismo distrito (116), esto podría reflejar las mismas prácticas pecuarias que genera este mismo patrón de déficit de heterocigotos en otros tipos de ganado criollo de esta misma región.

Teniendo en cuenta que, en razas con alta producción de cantidad de leche, el alelo *CSN1S1*B* está fijada (117) y hay pérdida del alelo *CSN1S1*C* en vacas lecheras altamente seleccionadas (42), como en el caso de *Holstein* y *Brown Swiss*, generando la desviación del HWE. Asimismo, en *Holstein* se ha reportado que los genotipos de la proteína α 1-caseína no se encuentra desviación del HWE (118), esto es debido a que las frecuencias de *CSN1S1*B* son cercanas a la fijación (45, 51, 88-90, 119). Asimismo, entre las razas ibéricas *Alentejana*, *Arouquesa*, *Barrosa*, *Cachena*, *Marinhosa*,

Maronesa, Mertolenga, Minhota, Mirandesa y Ramo Grande se ha encontrado que la proteína α 1-caseína presenta desviación de HWE (96).

Se debe agregar que el valor de baja frecuencia del alelo *CSN1S2*B* en las cuatro poblaciones estudiadas, es consecuencia de la fijación de su contraparte alélica (*CSN1S2*A*); tal como refiere Harlt *et al.* (1997) la pérdida de alelos indicarían deriva génica (120), la cual genera la fijación de un determinado alelo sobre otro, haciendo que se pierda el alelo no fijado y que la población sea homogénea para un único alelo, causando un impacto negativo en la diversidad genética (121, 122). Asimismo, Graffelman (2008) sugiere que en el caso de marcadores moleculares con uno de sus genotipos con frecuencias alélicas extremas (> 0.95) se consideren que no presentan desviación del HWE (123); es más, muchos investigadores evitan calcular la desviación del HWE al tener conteos menores a cinco individuos en alguno de los tres genotipos de marcadores bialélicos, por ejemplo Kolenda *et al.* (2021) no determinaron la desviación del HWE en la proteína α 2-caseína por la cantidad pequeña de individuos del genotipo *CSN1S2*BB* (119).

El siguiente punto trata del análisis de la diferenciación genética entre poblaciones, donde se calculó el índice de fijación (F_{ST}) de la proteína α 1-caseína en las cuatro poblaciones de vacunos (*Holstein, Brown Swiss*, criollos de Amazonas y Apurímac). De modo que al comparar el F_{ST} entre los vacunos de raza *Holstein* y *Brown Swiss* con los criollos de Amazonas y Apurímac se determinó que existe diferenciación genética significativa ($P < 0.01$). Mientras que en el caso de los valores de F_{ST} de la proteína α 2-caseína, se determinó diferenciación genética ($P < 0.05$) entre vacunos criollos de Amazonas y de las razas *Holstein* y *Brown Swiss*. De igual modo, Rosero (2009) encontró que hay diferenciación genética entre vacunos de razas y criollos, al comparar el índice de fijación (F_{ST}) de las proteínas lácteas *k-caseína*, *β -lactoglobulina* y *α -lactoalbumina* entre poblaciones de vacunos criollos colombianos con poblaciones de vacunos de raza (124).

En este estudio, se ha encontrado diferentes frecuencias genotípicas y alélicas de las proteínas α 1-caseína y α 2-caseína en cuatro poblaciones de vacunos (*Holstein, Brown Swiss*, criollos de Amazonas y Apurímac); así mismo, se obtuvo que los criollos de Apurímac presentaron desviación del equilibrio de HWE. Por otro lado, se encontró que hay diferenciación genética entre las poblaciones de vacunos de raza y vacunos criollos. Los resultados obtenidos permiten caracterizar genotípicamente cuatro poblaciones de vacunos y conocer un poco más de este recurso zogenético como parte de las estrategias que puedan permitir su conservación.

7. CONCLUSIONES

- Las frecuencias genotípicas y alélicas de las proteínas α 1-caseína y α 2-caseína fueron diferentes entre las cuatro poblaciones de vacunos (*Holstein*, *Brown Swiss*, criollos de Amazonas y Apurímac).
- Los genotipos *CSN1S1**BB de α 1-caseína y *CSN1S2**AA de α 2-caseína fueron los más frecuentes entre las cuatro poblaciones de vacunos.
- El alelo *CSN1S1**C fue el menos frecuente entre las cuatro poblaciones de vacunos.
- El alelo *CSN1S2**A se encuentra fijado o con tendencia a la fijación entre las cuatro poblaciones de vacunos.
- La población de criollos de Apurímac presenta desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg
- Los vacunos de raza *Holstein*, *Brown Swiss* y vacunos criollos de Amazonas y Apurímac presentaron diferenciación genética.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios de caracterización fenotípica y genotípica en los vacunos criollos.
- Realizar estudios de expresión genética de las variantes genéticas de las caseínas en la leche de vacas criollas
- Incluir dentro de los programas de mejoramiento genético del ganado vacuno peruano el uso de marcadores moleculares como es la proteína alfa-caseína 1.
- Realizar estudios de asociación entre la producción de leche y las variantes genotípicas en vacas criollas.
- Incentivar el trabajo conjunto de los pequeños y medianos criadores de ganado vacuno a través de asociatividad y cooperatividad, asimismo, fomentar el uso de registros productivos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McTavish EJ, Decker JE, Schnabel RD, Taylor JF, Hillis DM. New World cattle show ancestry from multiple independent domestication events. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(15):E1398-E406.
2. Perkins D. Fauna of Çatal Hüyük: evidence for early cattle domestication in Anatolia. *Science*. 1969;164(3876):177-9.
3. Pitt D, Sevane N, Nicolazzi EL, MacHugh DE, Park SD, Colli L, et al. Domestication of cattle: Two or three events? *Evolutionary applications*. 2019;12(1):123-36.
4. Frisch J, Vercoe JE. Food intake, eating rate, weight gains, metabolic rate and efficiency of feed utilization in *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred cattle. *Animal Science*. 1977;25(3):343-58.
5. Felius M. *Cattle breeds: An encyclopedia*: C Misset bv; 1995.
6. Fuquay JW, McSweeney PL, Fox PF. *Encyclopedia of dairy sciences*: Academic Press; 2011.
7. Dettleux J, Kehrl J, Stabel J, Freeman A, Kelley D. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1995;44(3-4):251-67.
8. Gebremariam W. Characterization of the global Brown Swiss cattle population structure. 2013.
9. Penasa M, Tiezzi F, Sturaro A, Cassandro M, De Marchi M. A comparison of the predicted coagulation characteristics and composition of milk from multi-breed herds of Holstein-Friesian, Brown Swiss and Simmental cows. *International Dairy Journal*. 2014;35(1):6-10.
10. De Marchi M, Bittante G, Dal Zotto R, Dalvit C, Cassandro M. Effect of Holstein Friesian and Brown Swiss breeds on quality of milk and cheese. *Journal of Dairy Science*. 2008;91(10):4092-102.
11. Gabai RV. *Francisco Pizarro and his brothers: the illusion of power in sixteenth-century Peru*: University of Oklahoma Press; 1997.
12. Rosemberg M. *Producción de ganado vacuno de carne y de doble propósito*. UNA La Molina Facultad de Zootecnia. 2000.
13. More Montoya MJ. *Caracterización faneróptica y morfométrica del vacuno criollo en Ayacucho, Puno y Cajamarca*. 2016.
14. Cubas Vinatea R. *Ganado Amazonas. Una solución peruana*. 1977:Capítulo1. La conquista de la selva.
15. Instituto Nacional de Estadística e Informática I. *Resultados finales del IV Censo Nacional Agropecuario (CENAGRO, 2012)*. Lima, Perú. 2013.
16. 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/Resources génétiques animales/Recursos genéticos animales*. 2007;40:33-42.
17. Armstrong E, Almeida FR, McIntosh M, Poli M, Cibils AF, Martínez-Quintana JA, et al. Genetic and productive background of Criollo cattle in Argentina, Mexico, Uruguay and the United States. *Journal of Arid Environments*. 2022;200:104722.
18. Pitt D, Bruford MW, Barbato M, Orozco-terWengel P, Martínez R, Sevane N. Demography and rapid local adaptation shape Creole cattle genome diversity in the tropics. *Evolutionary applications*. 2019;12(1):105-22.
19. Darío Martínez R. *Caracterización genética y morfológica del bovino criollo argentino de origen patagónico*. Tesis Doctoral Universidad Politécnica de Valencia. 2008.
20. Coaquira JEQ. *El bovino criollo del altiplano peruano: Origen, producción y perspectivas*. *Revista de Investigaciones Altoandinas-Journal of High Andean Research*. 2016;18(3):257-70.

21. Rischkowsky B, Pilling D. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura: FAO; 2010.
22. Instituto Nacional de Estadística e Informática I. Encuesta Nacional de Hogares sobre Condiciones de Vida y Pobreza (ENAHO, 2015). 2015.
23. Gamarra JC, Juan. Sistemas propios de manejo de tierras y animales en comunidades campesinas.
24. Iyengar GV. Elemental composition of human and animal milk. International Atomic Energy Agency, 1982.
25. Rowland SJ. 177. The protein distribution in normal and abnormal milk. *Journal of Dairy Research*. 1938;9(1):47-57.
26. O'Mahony J, Fox P. Milk: an overview. *Milk proteins*. 2014:19-73.
27. Jaiswal L, Worku M. Recent perspective on cow's milk allergy and dairy nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022;62(27):7503-17.
28. Bennett LE, Crittenden R, Khoo E, Forsyth S. Evaluation of immune-modulatory properties of selected dairy peptide fractions. *Australian journal of dairy technology*. 2005;60(2):106.
29. López-Fandiño R, Otte J, Van Camp J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*. 2006;16(11):1277-93.
30. Pan Y, Rowney M, Guo P, Hobman P. Biological properties of lactoferrin: an overview. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2007;62(1):31.
31. Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International dairy journal*. 2006;16(11):1306-14.
32. Meisel H, FitzGerald RJ. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition*. 2000;84(S1):27-31.
33. Audic J-L, Chaufer B, Daufin G. Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Le Lait*. 2003;83(6):417-38.
34. Rehan F, Ahemad N, Gupta M. Casein nanomicelle as an emerging biomaterial—A comprehensive review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;179:280-92.
35. Ensminger ME. Producción bovina para leche. 1977.
36. García Orellana M. Efecto de dietas con diferente nivel nutricional sobre la producción y composición de leche y perfil metabólico en vacas criollas y Brown Swiss. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Perú). Escuela de Postgrado ..., 2008.
37. Caroli A, Chessa S, Erhardt G. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of dairy science*. 2009;92(11):5335-52.
38. Ng-Kwai-Hang K, Hayes J, Moxley J, Monardes H. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. *Journal of dairy science*. 1984;67(4):835-40.
39. Groenen M, Dijkhof R, Verstege A, Van der Poel J. The complete sequence of the gene encoding bovine α 2-casein. *Gene*. 1993;123(2):187-93.
40. Alim M, Dong T, Xie Y, Wu X, Zhang Y, Zhang S, et al. Effect of polymorphisms in the CSN3 (κ -casein) gene on milk production traits in Chinese Holstein Cattle. *Molecular biology reports*. 2014;41:7585-93.
41. Sebastiani C, Arcangeli C, Torricelli M, Ciullo M, D'avino N, Cinti G, et al. Marker-assisted selection of dairy cows for β -casein gene A2 variant. *Italian Journal of Food Science*. 2022;34(2):21-7.
42. Lien S, Gomez-Raya L, Steine T, Fimland E, Rogne S. Associations between casein haplotypes and milk yield traits. *Journal of dairy science*. 1995;78(9):2047-56.

43. Freyer BG, Liu Z, Erhardt G, Panicke L. Casein polymorphism and relation between milk production traits. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 1999;116(2):87-97.
44. Azevedo A, Nascimento C, Steinberg R, Carvalho M, Peixoto M, Teodoro R, et al. Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genetics and Molecular Research*. 2008;7(3):623-30.
45. Çardak A. Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition of milk from Holstein-Friesian and Simmentaler cows. *South African Journal of Animal Science*. 2005;35(1):41-7.
46. Farrell Jr H, Jimenez-Flores R, Bleck G, Brown E, Butler J, Creamer L, et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *Journal of dairy science*. 2004;87(6):1641-74.
47. Vanvanhossou S, Giambra I, Yin T, Brügemann K, Dossa L, König S. First DNA Se-quencing in Beninese Indigenous Cattle Breeds Captures New Milk Protein Variants. *Genes* 2021, 12, 1702. s Note: MDPI stays neu-tral with regard to jurisdictional claims in ...; 2021.
48. Mohr U, Koczan D, Linder D, Hobom G, Erhardt G. A single point mutation results in A allele-specific exon skipping in the bovine α 1-casein mRNA. *Gene*. 1994;143(2):187-92.
49. Mulvihill DM, Fox PF. Proteolytic specificity of chymosin on bovine α 1-casein. *Journal of Dairy Research*. 1979;46(4):641-51.
50. Sadler A, Kiddy C, McCann RE, Mattingly W. Acid production and curd toughness in milks of different α 1-casein types. *Journal of Dairy Science*. 1968;51(1):28-30.
51. Erhardt G. A new α 1-casein allele in bovine milk and its occurrence in different breeds. *Animal Genetics*. 1993;24(1):65-6.
52. Grosclaude F. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relations avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait. *Productions animales*. 1988;1(1):5-17.
53. Gallinat J, Qanbari S, Drögemüller C, Pimentel E, Thaller G, Tetens J. DNA-based identification of novel bovine casein gene variants. *Journal of dairy science*. 2013;96(1):699-709.
54. Eigel W, Butler J, Ernststrom C, Farrell Jr H, Harwalkar V, Jenness R, et al. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *Journal of Dairy Science*. 1984;67(8):1599-631.
55. Ibeagha-Awemu E, Prinzenberg E-M, Jann O, Lühken G, Ibeagha A, Zhao X, et al. Molecular characterization of bovine CSN1S2* B and extensive distribution of zebu-specific milk protein alleles in European cattle. *Journal of dairy science*. 2007;90(7):3522-9.
56. Zakizadeh S, Prinzenberg E, Reissmann M, Miraei Ashtiani S, Reinecke P, Erhardt G. CSN1S1 Gene: Allele Frequency, and the Relationship with Milk Production Traits in Three Indigenous Cattle Breeds and Holstein. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 2013;3(3).
57. Van Eenennaam A, Medrano JF. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. *Journal of dairy science*. 1991;74(5):1730-42.
58. Balteanu VA, Vlaic A, Suteu M, Carsai TC. A comparative study of major milk protein polymorphism in six Romanian cattle breeds. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Animal Science and Biotechnologies*. 2010;67(1-2).
59. Aleandri R, Buttazzoni L, Schneider J, Caroli A, Davoli R. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *Journal of dairy science*. 1990;73(2):241-55.
60. Ng-Kwai-Hang K, Hayes J, Moxley J, Monardes H. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *Journal of dairy science*. 1986;69(1):22-6.
61. Kuznetsov S, Solodneva E, Semina M, Beketov S, Turbina I, Stolpovsky YA. New Combinations of Alleles in the Variants of the Cluster of Bovine Casein Genes and Revision of the Nomenclature of These Genes. *Russian Journal of Genetics*. 2022;58(8):915-26.

62. Corradini C. Distribution of the genetic variants of alphas1-, beta-and kappa-casein in milk from Jersey cows in the Netherlands. *Nederlands melk-en zuiveltijdschrift*. 1969.
63. Mariani P, Russo V. Varianti genetiche delle α proteine del latte nella razza Rendena. *Riv Zootec Vet*. 1975;3:345-8.
64. Grosclaude F, Marie-Françoise M, Mercier J, Bonnemaire J, Teissier J, editors. POLYMORPHISME DES LACTOPROTÉINES DE BOVINÉS NÉPALAIS I.-MISE EN EVIDENCE, CHEZ LE YAK, ET CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DE DEUX NOUVEAUX VARIANTS: β LACTOGLOBULINE DYak ET CASÉINE α 1E. *Annales de génétique et de sélection animale*; 1976: EDP Sciences.
65. Grosclaude F, Marie-Françoise M, Mercier J, Bonnemaire J, Teissier J, editors. POLYMORPHISME DES LACTOPROTÉINES DE BOVINÉS NÉPALAIS II.-POLYMORPHISME DES CASÉINES « α B-MINEURES»»; LE LOCUS α 2-Cn EST-IL LIE AUX LOCI α 1-Cn, β -Cn ET κ -Cn? *Annales de génétique et de sélection animale*; 1976: EDP Sciences.
66. Caroli A, Chessa S, Chiatti F, Rignanese D, Melendez B, Rizzi R, et al. Carora cattle show high variability in α s1-casein. *Journal of dairy science*. 2008;91(1):354-9.
67. Mariani P, Summer A, Anghinetti A, Senese C, Di Gregorio P, Rando P, et al. Effects of the α s1-CN G allele on the percentage distribution of caseins α s1-, α S2-, β -, and κ -in Italian Brown cows. *Ind. Latte*. 1995;31:3-13.
68. Rando A, Di Gregorio P, Ramunno L, Mariani P, Fiorella A, Senese C, et al. Characterization of the CSN1AG allele of the bovine α s1-casein locus by the insertion of a relict of a long interspersed element. *Journal of dairy science*. 1998;81(6):1735-42.
69. Mahé M-F, Miranda G, Queval R, Bado A, Zafindrajaona PS, Grosclaude F. Genetic polymorphism of milk proteins in African *Bos taurus* and *Bos indicus* populations. Characterization of variants α s1-Cn H and κ -Cn J. *Genetics, Selection, Evolution: GSE*. 1999;31(3):239.
70. Lühken G, Caroli A, Ibeagha-Awemu E, Erhardt G. Characterization and genetic analysis of bovine α s1-casein I variant. *Animal genetics*. 2009;40(4):479-85.
71. Fan X, Gao S, Fu L, Qiu L, Miao Y. Polymorphism and molecular characteristics of the CSN1S2 gene in river and swamp buffalo. *Archives Animal Breeding*. 2020;63(2):345-54.
72. Ibeagha-Awemu EM, Kgwatalala P, Zhao X. A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mammalian Genome*. 2008;19(9):591-617.
73. Osta R, Marcos S, Rodellar C. A MnlI polymorphism at the bovine α s2-casein gene. *Animal genetics (Print)*. 1995;26(3).
74. Almeyda M, Rosadio R, Maturrano L. Genotipos del gen Kappa-Caseína en ganado bovino criollo del distrito de Bambamarca, Cajamarca, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2016;27(1):82-90.
75. Veli E, Rivas E. Caracterización genética de Kappa caseínas y Beta lactoglobulinas del bovino criollo de cuatro comunidades andinas del Perú. *Animal Genetic Resources/Resources génétiques animales/Recursos genéticos animales*. 2010;46:67-72.
76. Veli Rivera EA, Rivas Palma V, Rivas Seoane E, Gutiérrez Reynoso GA, Pastor S, Altamirano Yaros S. Estudio preliminar de la variabilidad genética del gen de kappa caseína en bovinos criollos de la CC Qochapunco, Ayacucho. 2004.
77. Veli Rivera EA, Rivas Seoane E, Rivas Palma V, Verastegui M, Pastor S. Evaluacion de la variabilidad de genes de kappa caseína en poblaciones de bovinos criollos de Ticllos y Huashao, Region Ancash. 2004.
78. Zúñiga Aranibar D. 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. 2022.
79. Kish L. Muestreo de encuestas. 3a reimpresión. Trillas, México DF. 1982.

80. Jann O, Prinzenberg E-M, Brandt H, Williams JL, Ajmone-Marsan P, Zaragoza P, et al. Intragenic haplotypes at the bovine CSN1S1 locus. *ARCHIV FÜR TIERZUCHT*. 2002;45(1):13-22.
81. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, Team U. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166-7.
82. Láruson ÁJ, Reed FA. *Population Genetics with R: An Introduction for Life Scientists*: Oxford University Press, USA; 2021.
83. Peakall R, Smouse PE. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*. 2006;6(1):288-95.
84. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 1965:395-420.
85. Hamilton MB. *Population genetics*: John Wiley & Sons; 2021.
86. Ward TJ, Honeycutt RL, Derr JN. Nucleotide sequence evolution at the κ -casein locus: evidence for positive selection within the family bovidae. *Genetics*. 1997;147(4):1863-72.
87. Meier S, Korcuć P, Arends D, Brockmann GA. DNA sequence variants and protein haplotypes of casein genes in German Black Pied Cattle (DSN). *Frontiers in genetics*. 2019;10:1129.
88. Poulsen N, Bertelsen H, Jensen H, Gustavsson F, Glantz M, Månsson HL, et al. The occurrence of noncoagulating milk and the association of bovine milk coagulation properties with genetic variants of the caseins in 3 Scandinavian dairy breeds. *Journal of Dairy Science*. 2013;96(8):4830-42.
89. Li FH, Gaunt SN. A study of genetic polymorphisms of milk β -lactoglobulin, α s1-casein, β -casein, and κ -casein in five dairy breeds. *Biochemical genetics*. 1972;6(1):9-20.
90. Han S, Lee K. Studies on the genetic polymorphism in milk proteins [in cattle], 1: genetic variants of alphaS1-casein and K-casein. *Korean Journal of Animal Sciences (Korea R)*. 1984.
91. DOĞAN M, ÜSTDAL M, DEMİRCİ M. Milk Protein Polymorphism in The Population of Brown Swiss Cattle in Türkiye. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 1999;23(7):51-6.
92. Ozdemir M, Dogru U. Relationships between Alfa-casein polymorphism and production traits in Brown Swiss and Holstein. *Journal of Applied Animal Research*. 2004;25(1):5-8.
93. Kiddy C, Johnston J, Thompson M. Genetic polymorphism in caseins of cow's milk. I. Genetic control of α s-casein variation. *Journal of Dairy Science*. 1964;47(2):147-51.
94. Ginja C, Gama LT, Cortés O, Burriel IM, Vega-Pla JL, Penedo C, et al. The genetic ancestry of American Creole cattle inferred from uniparental and autosomal genetic markers. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-16.
95. Ginja C, Penedo M, Melucci L, Quiroz J, Martinez Lopez O, Revidatti M, et al. Origins and genetic diversity of New World Creole cattle: inferences from mitochondrial and Y chromosome polymorphisms. *Animal genetics*. 2010;41(2):128-41.
96. Beja-Pereira A, Erhardt G, Matos C, Gama L, Ferrand N. Evidence for a geographical cline of casein haplotypes in Portuguese cattle breeds. *Animal Genetics*. 2002;33(4):295-300.
97. Jann OC, Ibeagha-Awemu EM, Özbeyaz C, Zaragoza P, Williams JL, Ajmone-Marsan P, et al. Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus. *Genetics Selection Evolution*. 2004;36(2):1-15.
98. De Alba Martínez J. *El libro de los bovinos criollos en América: COLEGIO DE POSTGRADUADOS*; 2011.
99. Lien S, Kantanen J, Olsaker I, Holm LE, Eythorsdottir E, Sandberg K, et al. Comparison of milk protein allele frequencies in Nordic cattle breeds. *Animal Genetics*. 1999;30(2):85-91.
100. Ikonen T, Ruottinen O, Erhardt G, Ojala M. Allele frequencies of the major milk proteins in the Finnish Ayrshire and detection of a new K-casein variant. *Animal Genetics*. 1996;27(3):179-81.
101. Park YW. *Bioactive components in milk and dairy products*: John Wiley & Sons; 2009.

102. Gurcan EK. Association between milk protein polymorphism and milk production traits in Black and White dairy cattle in Turkey. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(6):1044-8.
103. Ahmed AS, Rahmatalla S, Bortfeldt R, Arends D, Reissmann M, Brockmann G. Milk protein polymorphisms and casein haplotypes in Butana cattle. *Journal of Applied Genetics*. 2017;58(2):261-71.
104. Hristov JP, Teofanova D, Georgieva A, Radoslavov G. Effect of genetic polymorphism of β S1-casein gene on qualitative and quantitative milk traits in native Bulgarian Rhodopean cattle breed. *Genetics and Molecular Research*. 2018;17(1).
105. Barbato M, Hailer F, Upadhyay M, Del Corvo M, Colli L, Negrini R, et al. Adaptive introgression from indicine cattle into white cattle breeds from Central Italy. *Scientific reports*. 2020;10(1):1-11.
106. Caroli A, Rizzi R, Lühken G, Erhardt G. Milk protein genetic variation and casein haplotype structure in the Original Pinzgauer cattle. *Journal of dairy science*. 2010;93(3):1260-5.
107. Abdala A, Alvarez I, Brossel H, Calvinho L, Carignano H, Franco L, et al. BLV: lessons on vaccine development. *Retrovirology*. 2019;16(1):1-6.
108. Tellez Villena JG. Manual para engorde intensivo de vacunos. 1987:25.
109. Salazar Flores JL. Caracterización del sistema de producción de ganado de la raza Brown Swiss distrito Florida Pomacochas, provincia de Bongará-Amazonas, 2015. Tesis Universidad Nacional de Cajamarca. 2016.
110. Murga Valderrama NL. Efecto del estadio embrionario y la raza de la receptora en la tasa de preñez con embriones frescos in vivo, Amazonas-Perú. Tesis Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. 2018.
111. Rodero Serrano E, Rodero Franganillo A, Delgado-Bermejo J. Primitive andalusian livestock and their implications in the discovery of America. 1992.
112. Primo AT. América: conquista e colonização: a fantástica história dos conquistadores ibéricos e seus animais na era dos descobrimentos: Movimento; 2004.
113. Speller CF, Burley DV, Woodward RP, Yang DY. Ancient mtDNA analysis of early 16th century Caribbean cattle provides insight into founding populations of New World creole cattle breeds. *PLoS One*. 2013;8(7):e69584.
114. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *The American Journal of Human Genetics*. 2005;76(5):887-93.
115. Urviola NCG, Ferrando A, Jordana J. Caracterización genética de la población de cabras autóctonas de la región Apurímac de Perú. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal-AICA*. 2011;1(1).
116. Luna Muñoz RG. Etnozootecnia y diversidad genética del Cerdo Criollo (*Sus scrofa domestica*) de los departamentos de Apurímac y Ayacucho utilizando marcadores microsatelitales. 2021.
117. Caroli A, Bolla P, Vivona G, Gandini G. Milk protein polymorphisms in the Reggiana cattle. *Italian Journal of Animal Science*. 2003;2(sup1):52-4.
118. Ardicli S, Soyudal B, Samli H, Dincel D, Balci F. Effect of STAT1, OLR1, CSN1S1, CSN1S2, and DGAT1 genes on milk yield and composition traits of Holstein breed. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2018;47.
119. Kolenda M, Sitkowska B. The Polymorphism in Various Milk Protein Genes in Polish Holstein-Friesian Dairy Cattle. *Animals*. 2021;11(2):389.
120. Hartl DL, Clark AG, Clark AG. Principles of population genetics: Sinauer associates Sunderland; 1997.

121. Hohmann LG, Weimann C, Scheper C, Erhardt G, König S. Genetic diversity and population structure in divergent German cattle selection lines on the basis of milk protein polymorphisms. *Archives Animal Breeding*. 2021;64(1):91-102.
122. Lehocká K, Kasarda R, Olšanská B, Moravčíková N. Assessment of genetic drift and migration in six cattle breeds. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*. 2020;23(5).
123. Graffelman J. Hardy-Weinberg Equilibrium and the Ternary Plot. 2008.
124. Rosero Alpala JA. Polimorfismo de los genes k-caseína, β -lactoglobulina y α -lactoalbumina en razas bovinas criollas colombianas 2009.

10. ANEXOS

Anexo A. Carta del Banco de ADN del INIA



Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología
Subdirección de Biotecnología

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"
"Año del Bicentenario del Congreso de la República del Perú"

La Molina, 07 de setiembre de 2022

CARTA N° 002 -2022-MIDAGRI-INIA-DRGB/SDB

Señorita
CLAUDIA LILIANNE OCAMPO ACUÑA
Egresada de la Universidad Peruana Cayetano Heredia
Presente. -

Asunto: Solicitud de muestras del Banco de ADN animales de granja del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica

Referencia: Solicitud s/n de fecha 01/097/2022

Es grato dirigirme a usted, para saludarla cordialmente y a la vez comunicarle que se ha procedido con la atención del documento de la referencia, en la que nos comunica que, viene realizando su trabajo de tesis para obtener el grado de licenciatura: "Evaluación de polimorfismos genéticos de dos proteínas lácteas en vacunos criollos y vacunos de raza", en donde ha contemplado el análisis de ADN de vacunos criollos para la caracterización genética de dos proteínas lácteas; solicitando se le brinde el acceso a 400 muestras de ADN de vacunos del Banco de ADN de Animales de Granja del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, con los requisitos descritos en el formato N°1.

Al respecto, se comparte el Informe Técnico N° 007-2022-DRGB-SDB-CEYM elaborado por la Analista en Biotecnología Animal, Blga. Claudia Esther Yalta Macedo, quien considera VIABLE brindarle el acceso solicitado, toda vez que los resultados que obtendrá permitirán fortalecer el propósito del Banco de ADN de animales de granja de la LBMYG de la DRGB, además de ampliar los conocimientos moleculares sobre el vacuno peruano importante para el sector agropecuario.

Sin otro particular, reitero mi saludo y consideración.

Atentamente,

Documento Firmado Digitalmente
Dina Lida Gutiérrez Reynoso, Ph.D.
Directora de la Subdirección de Biotecnología
Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología

CUT N° 17763-2022
c.c. DRGB

Av. La Molina 1981, La Molina
Central Telefónica: 240-2100 Anexo 295
www.gob.pe/inia
www.gob.pe/midagri



Firmado digitalmente por:
GUTIERREZ REYNOSO Dina
Lida FAU 20131305004 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 07/09/2022 10:13:21-0500



Anexo B. Carta CIEA



VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

CONSTANCIA 041-09-22

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética, bajo la categoría de revisión **EXPEDITA**. La aprobación será ratificada en la sesión del comité más próxima a la fecha de emisión de este documento.

Título del Proyecto : "Evaluación de polimorfismos genéticos de dos proteínas lácteas en vacunos criollos y vacunos de raza".

Código de inscripción : 208426

Investigadora : Ocampo Acuña, Claudia Liliannie

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. **Protocolo de investigación**, versión recibida el 06 de octubre del 2022.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **06 de octubre del 2023**. Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 07 de octubre del 2022.

Dr. Manuel Gasco Taniachico

Presidente

Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales

/mgg

Av. Honorio Delgado 430
San Martín de Porres
Apartado postal 4314
319 0000 Anexo CIEI: 201355
duict.cieh@oficinas-upch.pe
www.cayetano.edu.pe



CONSTANCIA CIEA-E-018-04-24

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el comité de ética aprobó la **ENMIENDA/MODIFICACIÓN** del proyecto de investigación señalado a continuación.

Título del Protocolo : "Caracterización genotípica de las proteínas lácteas α S1-caseína y α S2-caseína en vacunos Brown Swiss, Holstein, criollos de Apurímac y Amazonas".

Código SIDISI : 208426

Investigador(a) principal(es) : Ocampo Acuña, Claudia Lilliane

La **enmienda/modificación** corresponde a los siguientes documentos:

1. **Protocolo de Investigación**, versión recibida en fecha 01 de abril del 2024.

Lima, 24 de abril del 2024.



Dr. Manuel Gasco Tantachuco
Presidente
Comité Institucional de Ética para el uso de Animales

/ ssm

Anexo C. Representación de vacunos criollos por departamento

	Departamento	Población de vacunos por departamento	Población de vacunos criollos por departamento	Porcentaje de vacunos criollos por departamento (%)
1	San Martín	228,826	69,718	30.47
2	Amazonas	157,166	51,567	32.81
3	Tacna	21,713	7,256	33.42
4	Arequipa	235,092	79,353	33.75
5	Pasco	106,566	39,561	37.12
6	Ucayali	60,913	26,057	42.78
7	Madre de Dios	50,145	25,411	50.68
8	Junín	194,230	110,470	56.88
9	Lima	289,679	165,829	57.25
10	Loreto	46,646	28,172	60.40
11	Cusco	407,267	251,549	61.77
12	Huánuco	254,342	157,964	62.11
13	Puno	617,163	391,704	63.47
14	Moquegua	26,303	16,757	63.71
15	Ica	32,598	21,237	65.15
16	Lambayeque	95,061	63,239	66.52
17	Piura	208,181	142,057	68.24
18	Cajamarca	724,478	497,119	68.62
19	Tumbes	12,494	8,886	71.12
20	La Libertad	215,224	158,161	73.49
21	Ancash	275,292	211,425	76.80
22	Ayacucho	414,066	330,386	79.79
23	Huancavelica	184,267	160,793	87.26
24	Apurímac	298,214	262,120	87.90
	TOTAL	5,156,044		

Fuente: Cenagro 2012

Anexo D. Secuencia de controles

Tabla 12. Secuencias de cada muestra control (MC) usada en la genotipificación de la proteína α 1-caseína por HRM

Nombre del control del genotipo	Secuencia
MC-CSN1S1*BB	CAC TGT TGC TTT TTC AAT GGT CTT TCT CTC TAG CTT TTC AGA CAA TTC TAC CAG CTG GAT GCC TAT CCA TCT GGT GCC TGG TAT TAC GTT CCA CTA GGC ACA CAA TAC ACT GAT GCC CCA TCA TTC TCT GAC ATC CCT AAT CCC ATT GGC TCT GAG AAC AGT GAA AAG ACT ACT ATG CCA CTG TGG TGG TAA GTT CAT TTA AAT GAC TGC ATA TTG TTG CCT T
MC-CSN1S1*BC	CAC TGT TGC TTT TTC AAT GGT CTT TCT CTC TAG CTT TTC AGA CAA TTC TAC CAG CTG GAT GCC TAT CCA TCT GGT GCC TGG TAT TAC GTT CCA CTA GGC ACA CAA TAC ACT GAT GCC CCA TCA TTC TCT GAC ATC CCT AAT CCC ATT GGC TCT GAG AAC AGT G(A/G)A AAG ACT ACT ATG CCA CTG TGG TGG TAA GTT CAT TTA AAT GAC TGC ATA TTG TTG CCT T
MC-CSN1S1*CC	CAC TGT TGC TTT TTC AAT GGT CTT TCT CTC TAG CTT TTC AGA CAA TTC TAC CAG CTG GAT GCC TAT CCA TCT GGT GCC TGG TAT TAC GTT CCA CTA GGC ACA CAA TAC ACT GAT GCC CCA TCA TTC TCT GAC ATC CCT AAT CCC ATT GGC TCT GAG AAC AGT GGA AAG ACT ACT ATG CCA CTG TGG TGG TAA GTT CAT TTA AAT GAC TGC ATA TTG TTG CCT T

Tabla 13. Secuencias de cada control sintético (CS) usado en la genotipificación de la proteína α 2-caseína por HRM

Nombre del control del genotipo	Secuencia
CS-CSN1S2*AA	GAT AAA AAC AAA ACA AAA TAG TGA GAT ACC TTG GCA TTT TAA ATC TAC CAT AAA ACT GAG AAC TGT ATT TGC TTT TGT TTG TAG ACG ATG GAA CAT GTC TCC TCC AGT GAG GTA AGA TAC TTT AGT ATC AAC AGA AAA TCT TTT AGG TTA GTA AAA ACA GAA TAT GAC CTA AAC TAT TGT CTT TAA AAT AAT TTT TCT CCA
CS-CSN1S2*AB	GAT AAA AAC AAA ACA AAA TAG TGA GAT ACC TTG GCA TTT TAA ATC TAC CAT AAA ACT GAG AAC TGT ATT TGC TTT TGT TTG TAG ACG ATG GAA CAT GTC T(C/T)C TCC AGT GAG GTA AGA TAC TTT AGT ATC AAC AGA AAA TCT TTT AGG TTA GTA AAA ACA GAA TAT GAC CTA AAC TAT TGT CTT TAA AAT AAT TTT TCT CCA
CS-CSN1S1*BB	GAT AAA AAC AAA ACA AAA TAG TGA GAT ACC TTG GCA TTT TAA ATC TAC CAT AAA ACT GAG AAC TGT ATT TGC TTT TGT TTG TAG ACG ATG GAA CAT GTC TTC TCC AGT GAG GTA AGA TAC TTT AGT ATC AAC AGA AAA TCT TTT AGG TTA GTA AAA ACA GAA TAT GAC CTA AAC TAT TGT CTT TAA AAT AAT TTT TCT CCA

Anexo E. Flujograma de trabajo

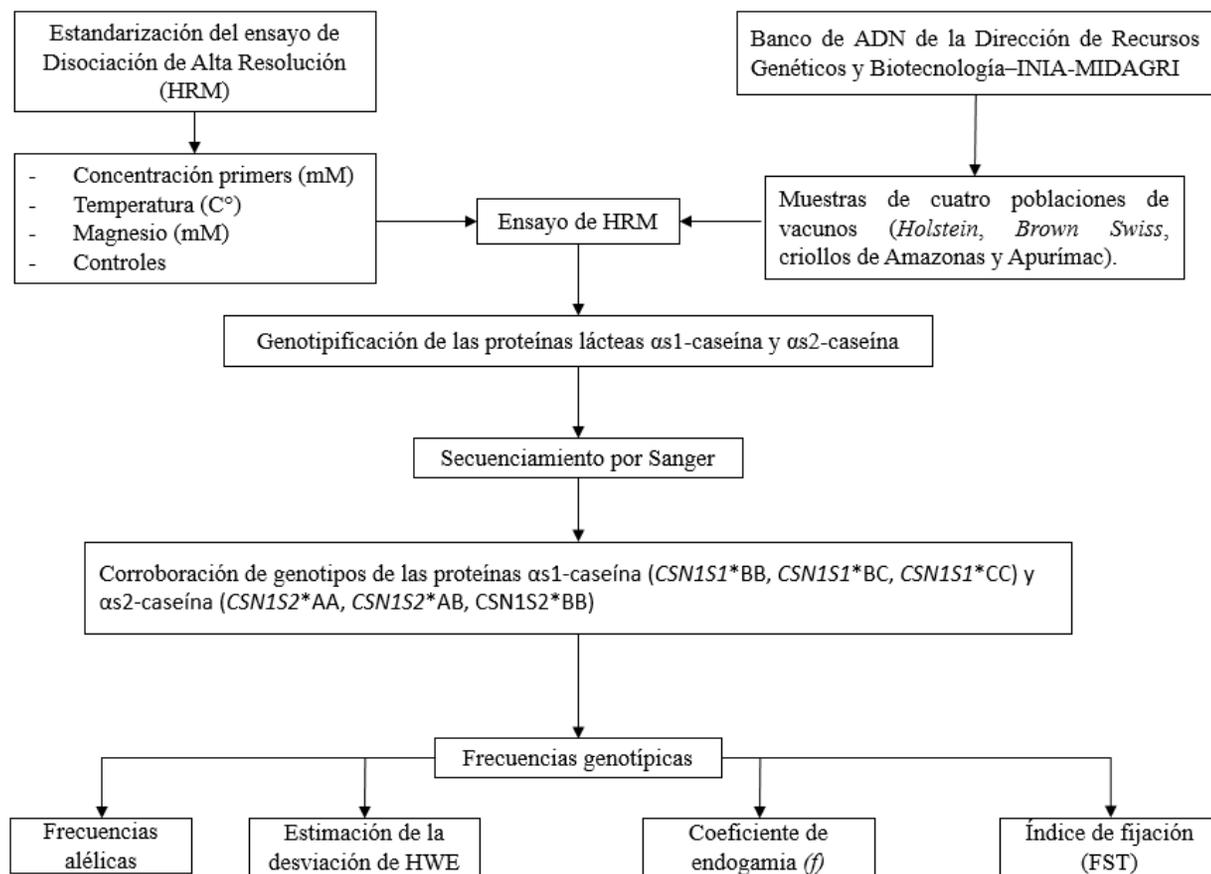


Figura 10. Flujograma de trabajo

Anexo F. Cantidad de individuos por cada genotipo

Población de vacunos	CSN1S1			CSN1S2			Total
	BB	BC	CC	AA	AB	BB	
Holstein	95	1	0	96	0	0	96
Brown Swiss	81	15	1	95	2	0	97
Criollo Apurímac	53	33	13	95	3	1	99
Criollo Amazonas	39	29	1	61	8	0	69
Total	268	78	15	347	13	1	361