

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



**“EFECTO DEL CONSUMO DE LECHE CON LOS SUBTIPOS A1 Y A2 DE  
BETA - CASEÍNA EN BECERROS DE LA RAZA CHAROLAIS.”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**

**PRESENTA**

**L .M. R. N. PAULA ELENA FUENTES GARCÍA**

**REYNOSA, TAMPS.**

**NOVIEMBRE, 2018**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



**“EFECTO DEL CONSUMO DE LECHE CON LOS SUBTIPOS A1 Y A2 DE  
BETA - CASEÍNA EN BECERROS DE LA RAZA CHAROLAIS.”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**

**P R E S E N T A**

**L. M. R. N. PAULA ELENA FUENTES GARCÍA**

REYNOSA, TAMPS.

NOVIEMBRE, 2018



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Reynosa, Tamps., el día 7 del mes de Noviembre del año 2018, la que suscribe Paula Elena Fuentes García alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica, con número de registro B160455, adscrita al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Ana María Sifuentes Rincón, M. en C. Williams Arellano Vera y cede los derechos del trabajo titulado “EFECTO DEL CONSUMO DE LECHE CON LOS SUBTIPOS A1 Y A2 DE BETA CASEINA, EN BECERROS DE LA RAZA CHAROLAIS.”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones Bld. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Paula Elena Fuentes García



SIP-14-BIS

# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. siendo las 13.00 horas del día 7 del mes de Noviembre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada: EFFECTO DEL CONSUMO DE LECHE CON LOS SUBTIPOS A1 Y A2 DE BETA CASEINA, EN BECERROS DE LA RAZA CHAROLAIS.

Presentada por el alumno:

Fuentes	García	Paula Elena
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro:
		B 1 6 0 4 5 5

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

#### Directores de tesis

Dra. Ana María Sifuentes Rincón

M. en C. Williams Arellano Vera

Dr. Gaspar Manuel Parra Bracamonte

M. en C. Pascuala Ambriz Morales

M. en C. Xóchitl Fabiola de la Rosa  
Reyna

#### PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Mario Alberto Rodríguez



INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA  
GENÓMICA



## ÍNDICE

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
LISTA DE CUADROS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE SÍMBOLOS Y/O NOMENCLATURAS .....	9
AGRADECIMIENTOS .....	10
DEDICATORIA .....	12
RESUMEN .....	13
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUCCIÓN .....	17
2.- ANTECEDENTES .....	18
2.1. La ganadería en México.....	18
2.1.1. La ganadería cárnica en México .....	18
2.1.2. La ganadería lechera en México .....	19
2.2. La leche de bovino .....	20
2.3. Importancia de la leche de bovino .....	21
2.3.1. Importancia nutricional para el becerro .....	21
2.3.2. Importancia productiva del consumo de la leche.....	22
2.4. Composición de la leche bovina .....	23
2.5. Péptidos bioactivos de la leche bovina .....	29
2.6. Polimorfismos genéticos en los genes de la $\beta$ -caseína.....	30
2.6.1 Importancia del péptido BCM-7 .....	33
3. JUSTIFICACIÓN .....	38
4. HIPÓTESIS.....	39
5. OBJETIVOS .....	39
5.1. GENERAL.....	39
5.2. ESPECÍFICOS.....	39
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
6.1. Población de estudio .....	40
6.2. Identificación molecular de los subtipos de $\beta$ - caseína.....	40
6.2.1. Extracción de ADN.....	40
6.2.2. Asignación alélica .....	42



6. 3. Análisis de los efectos fisiológicos y productivos en el grupo Becerros .....	43
6.3.1. Análisis de los efectos fisiológicos .....	43
6.3.2. Análisis de los efectos productivos .....	46
6.4. Análisis de los efectos productivos en el grupo Familias vacas-crías.....	48
6.5. Análisis de Asociación.....	48
6.5.1. Grupo Becerros .....	48
6.5.2. Grupo Familias Vacas-Crías .....	49
7. RESULTADOS.....	50
7.1. Frecuencia del alelo A1 en la población Charolais estudiada.....	50
7.2. Evaluación del efecto de la leche A1 en el grupo de Becerros .....	50
7.2.1. Efecto sobre la concentración de GSH en plasma .....	50
7.2.2. Evaluación del efecto del consumo de la leche A1 sobre el temperamento.....	53
7.3. Evaluación del efecto de la leche A1 en el grupo Familias Vacas-Crías .....	57
8. DISCUSIÓN .....	59
8.1. Frecuencia del alelo A1 en ganado .....	60
8.2. Evaluación del efecto de la leche A1 en el Grupo Becerros .....	62
8.2.1. Concentración de Glutación (GSH) en plasma.....	62
8.2.2. Temperamento .....	64
8.3. Efecto del consumo de leche A1 en el Grupo Familias Vacas-Crías.....	66
9. CONCLUSIÓN.....	68
10. REFERENCIAS.....	69
11. APÉNDICES.....	81
APÉNDICE A.....	81
APÉNDICE B .....	82
APÉNDICE C .....	83
APENDICE D.....	84
APENDICE E .....	85



## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
1. COMPARACIÓN PORCENTUAL DE LA COMPOSICIÓN PORCENTUAL DEL CALOSTRO Y LA LECHE BOVINA.....	21
2. PÉPTIDOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE BOVINO.. .....	30
3. POLIMORFISMOS EN LA B-CASEÍNA, SE INDICAN LAS POSICIONES Y AMINOÁCIDOS ESPECÍFICOS QUE DETERMINAN CADA VARIANTE DE B-CASEÍNA.).....	33
4. SECUENCIAS DE SONDAS Y PRIMERS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA B-CASEÍNA A1 Y A2....	42
5. ESCALA DISEÑADA PARA MEDIR EL TEMPERAMENTO, PARA CADA UNA DE LAS EDADES ANALIZADAS. SE DESCRIBE DE ACUERDO AL NÚMERO DE MOVIMIENTOS (MOV.) DE LAS PATAS EN EL BECERRO. ....	47
6. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LAS VACAS ANALIZADAS EN LOS DOS GRUPOS DE ESTUDIO .....	50
7. CONCENTRACIONES DE GLUTATIÓN (GSH) DE LOS BECERROS MUESTREADOS AL NACIMIENTO Y A LA SEMANA 12 DEL GRUPO BECERROS.....	51
8. VELOCIDAD DE SALIDA PARA LOS BECERROS MUESTREADOS A LAS 3 Y 12 SEMANAS.....	54
9. RESULTADOS DEL ALPHA DE CRONBACH PARA LAS PRUEBAS A Y B A LAS 3 Y 12 SEMANAS.	54
10. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS A Y B A LAS 3 Y 12 SEMANAS.....	55
11. MEDIA ARITMÉTICA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA PESOS AL NACIMIENTO (PN), PESOS AL DESTETE AJUSTADO A 205 DÍAS (PD205) Y LA GANANCIA DIARIA DE PESO (GDP) PARA LOS 3 GENOTIPOS ANALIZADOS.....	58



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. GENES DE LAS CASEÍNAS. SE ESQUEMATIZA LA ORGANIZACIÓN DEL LOCUS DE LAS CASEÍNAS, E INDIVIDUALMENTE LA ESTRUCTURA DE CADA UNO DE LOS CUATRO GENES DE ESTE GRUPO DE PROTEÍNAS DE LA LECHE .....	27
2. POLIMORFISMOS Y MUTACIONES DE LA B-CASEÍNA. SE MUESTRAN LAS MUTACIONES QUE HA SUFRIDO LA B-CASEÍNA A TRAVÉS DEL TIEMPO Y QUÉ VARIANTES SE GENERARON A PARTIR DE DICHS CAMBIOS. ....	31
3. COMPARACIÓN DE MEDIAS DEL GRUPO 1 Y GRUPO 2 DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE GSH A LA SEMANA 12.....	52
4. COMPARACIÓN DE MEDIAS POR SEXO PARA LAS CONCENTRACIONES DE GSH A LAS 12 SEMANAS.. ....	53
5. COMPARACIÓN DE MEDIAS DEL GRUPO 1 Y EL GRUPO 2 DE ACUERDO A LA PRUEBA A A LAS 12 SEMANAS.....	56





## LISTA DE SÍMBOLOS Y/O NOMENCLATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BCM-7	$\beta$ -casomorfina-7
C.V	Coefficiente de Variación
D.E	Desviación Estándar
DD	Días al destete
EV	Velocidad de Salida (Exit Velocity)
GDP	Ganancia Diaria de Peso
GLM	Modelo General Lineal (General Linear Model)
GSH	Glutación
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)
pA	Prueba A
pB	Prueba B
PBA	Péptidos Bioactivos
PD	Pesos al Destete
PD205	Peso al Destete Ajustado a 205 días
PN	Pesos al Nacimiento
SSA	Ácido 5-sulfo-salicílico



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente:

A la Dra. Ana María Sifuentes por su valioso apoyo durante toda mi formación estos 2 años y medio, por darme la oportunidad de trabajar con ella y siempre exigirme más para dar lo mejor de mí.

Al M. en C. Williams Arellano por su apoyo y paciencia en el proceso experimental, los muestreos y asesorías.

Al Dr. Manuel Parra por su apoyo en los análisis estadísticos y por sus consejos para mejorar en cada día más.

Al Dr. Víctor Moreno por siempre escucharme, apoyarme y su gran labor como Subdirector Académico.

A la M. en C. Pascuala Ambriz por su gran apoyo en el laboratorio, su amabilidad, disposición y ayuda en el laboratorio.

A la M. en C. Xóchitl de la Rosa por transmitir sus conocimientos, siempre tener una sonrisa y compartir conmigo el amor por el café.

Al Dr. Fernando Sánchez y a la Ing. Reyna Calvillo de la Facultad de Agronomía de la UANL por brindar las facilidades para realizar los muestreos, por su tiempo y su apoyo durante los mismos.

A todos y cada uno de los maestros y doctores que nos impartieron clases y nos proporcionaron las herramientas necesarias para nuestro aprendizaje durante la maestría, sobre todo a algunos que sembraron en nosotros la pasión y amor a lo que hacemos.

Les doy agradecimientos especiales a mis amigas Rocío Mendoza y Ginna Villalobos por su gran amistad, apoyo moral, risas, regaños y momentos de ocio juntas durante estos 2 años. Gracias por siempre estar para mí cuando las necesité, gracias por todas las aventuras juntas, la diversión y por soportarme en mis locuras.



A mi compañera de generación, de laboratorio y de cubículo: Oliva Mendoza, por siempre estar para mí y compartir muchas experiencias de éxito conmigo. Gracias por hacer del laboratorio mi segundo hogar en Reynosa y llenarlo de risas, pláticas, chismes, apoyo, pero sobre todo una gran amistad, buenas ideas y proyectos.

A Frinette Rodríguez, Jessica Reyes, Lucero Hernández, Diana Vela, Génesis Aguillón y Lulú Vital por ser unas excelentes amigas, siempre tener una sonrisa para mí y por todo el apoyo mutuo brindado.

A todos mis compañeros de generación, por fomentar en mí la paciencia y tolerancia.

Al Centro de Biotecnología Genómica y al Instituto Politécnico Nacional. Mi corazón ahora es guinda.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al Programa Institucional de Formación de Investigadores del IPN (PIFI) y a la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) por brindar el apoyo económico para la realización de mi trabajo de tesis.

***¡Huélum, Huélum ! ¡Gloria!***

***A la cachi cachi Porra***

***A la cachi cachi Porra***

***Pim Pom Porra***

***Pim Pom Porra***

***Politécnico, Politécnico,***

***¡GLORIA!***



## DEDICATORIA

A mis padres, por guiarme en el vida, inculcarme valores, por siempre apoyarme y ser un gran pilar en mi vida, por confiar en mí y nunca cortarme las alas para poder volar muy alto. Gracias por su amor incondicional, sus sabios consejos y por siempre ser mi fortaleza. Gracias a ellos soy lo que soy y me motiva que siempre estén tan orgullosos de mí.

A mis hermanitos Jesús y Celéste, por ser mi motor para seguir día a día luchando por mis sueños y poder así demostrarles que todos podemos lograr lo que nos proponemos. Una de mis metas en la vida es ser un ejemplo para ellos, y creo que poco a poco lo estoy logrando.

A mi novio, Mario, por su amor durante todos estos 7 años, por siempre motivarme para seguir adelante a pesar de las circunstancias, por nunca dejarme caer ni darme por vencida, por confiar en mí y tenerme tanta paciencia. Mi amor, gracias por apoyarme y ayudarme a crecer tanto personal como profesionalmente. Gracias a ti hoy soy feliz, cuando llegaste aprendí a vivir.

Y por último quiero dedicar este trabajo a todas las personas que alguna vez dijeron que no podía lograr ciertas cosas en mi vida y a aquellas que se volvieron un obstáculo, ahora sólo me resta decirles una frase: “Dime que no puedo hacerlo y tendré un motivo más para lograrlo”.



## RESUMEN

El propósito de la ganadería cárnica es la cría, engorda y venta de bovinos para el abastecimiento de carne para su venta comercial. De allí que uno de los principales menesteres de los productores de ganado es tener animales en un óptimo estado de bienestar. Un factor determinante para lo anterior es la alimentación. La leche es el principal alimento que consumen los becerros desde el nacimiento hasta el destete y en el ganado de carne, la producción de leche es un factor principal que influye en el crecimiento predestete. Las caseínas es el grupo de proteínas más importantes en la leche bovina, y de ellas, la  $\beta$ -caseína constituye el 45% del total. Se han reportado 12 variantes genéticas de la  $\beta$ -caseína, de acuerdo a distintos cambios aminoacídicos en el gen, que se encuentra situado en el locus de las caseínas de 250 Kb, tiene una longitud de 8498 pb y contiene 9 exones, 8 intrones y 4 retrotransposones. Las variantes A1 y A2 son las comúnmente encontradas en la leche de bovino y son importantes dado que durante la digestión la leche de tipo A1 genera el péptido bioactivo llamado  $\beta$ -casomorfina-7 (BCM-7) debido a una transversión de A>C en la posición 8101 del gen de la  $\beta$ -caseína, lo que genera un cambio aminoacídico de prolina por histidina en la posición 67. La BCM-7 se ha asociado en humanos y otros mamíferos, con problemas gastrointestinales, inmunológicos, metabólicos y afecciones neurológicas. No existen hasta el momento reportes en la literatura enfocados a determinar si el tipo de leche con el que se alimentan los becerros tiene algún efecto fisiológico o productivo. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del consumo de la leche A1 sobre el temperamento y niveles de glutatión (GSH) en becerros de la raza Charolais, por lo que se estudiaron 15 becerros nacidos en el periodo dic 2017- feb 2018. Los becerros fueron clasificados en grupos de acuerdo al tipo de leche con que serían alimentados por la madre, por lo que a partir de muestras de folículo piloso de las vacas se genotipificaron para determinar de qué variantes eran portadoras. Se establecieron dos protocolos para medir el temperamento de los animales, a las 3 y 12 semanas de nacidos: velocidad de salida y pruebas de sujeción. También se obtuvieron muestras de plasma, de los becerros al nacimiento y a los tres meses de edad, a partir de las cuales se midió la concentración de GSH. Una vez evaluados los resultados de esta población, se formó una segunda población de 108 familias vaca-



cría clasificadas según el tipo de leche de la madre. De todas las crías, se evaluó el efecto del tipo de leche sobre el peso al destete. Se encontró que los becerros de la raza Charolais alimentados con leche A2 tienen niveles de GSH significativamente mayores ( $P=0.0425$ ) que los que se alimentan con leche A1, además las hembras poseen concentraciones de GSH significativamente más altas ( $P=0.0446$ ) que los machos. No se encontró efecto entre el tipo de leche y cualquiera de las mediciones del temperamento. Para la característica productiva evaluada, que fue peso al destete, se encontró una asociación significativa ( $P=0.0477$ ) con el tipo de leche que consumieron los becerros, ya que los que consumieron leche tipo A1 tuvieron mayores pesos, seguidos de los que consumieron leche A1/A2 y los que presentaron menores pesos fueron los alimentados con leche A2.



## ABSTRACT

Beef cattle breeds are focused on breeding, fattening and sale of cattle, hence, one of the main tasks of cattle producers is to produce animals in an optimum productive and genetic status. A determining factor for the above is food. Milk is the main food consumed by calves from birth to weaning and in beef cattle; milk consumption is a major factor that influences pre-weaning growth. Caseins are the most important group of proteins in bovine milk, and of these,  $\beta$ -casein constitutes 45% of the total. 12 genetic variants of  $\beta$ -casein have been reported, according to different amino acid changes in the gene, which is located in the casein locus of 250 Kb, has a length of 8498 bp and contains 9 exons, 8 introns and 4 retrotransposons. Variants A1 and A2 are those commonly found in bovine milk and are important because during digestion A1 milk generates the bioactive peptide called  $\beta$ -casomorphin-7 (BCM-7) due to an amino acid change of proline by histidine at position 67. BCM-7 has been associated in humans and other mammals, with gastrointestinal, immunological, metabolic and neurological conditions. There are currently no reports in the literature focused on determining if the type of milk with which the calves are fed has any physiological or productive effect. The objective of this work was to determine the effect of the consumption of milk A1 on the temperament and glutathione levels (GSH) in calves of the Charolais breed, for which 15 calves born in the period December 2017- Feb 2018 were studied. Calves were classified into groups according to the type of milk that would be fed by their mother, so from samples of hair follicles of the cows were genotyped to determine which variants were carriers. Two protocols were established to measure the temperament of the animals, at 3 and 12 weeks of birth: exit velocity and tethering tests. Plasma samples were also obtained, from the calves at birth and at three months of age, from which the GSH concentration was measured. Once the results of this population were evaluated, a second population of 108 mother-calves families was classified according to the type of milk of the mother. Of all the offspring, the effect of milk type on weaning weight was evaluated. It was found that the calves of the Charolais breed fed with A2 milk have significantly higher GSH levels ( $P = 0.0425$ ) than those that are fed with A1 milk, in addition, females have significantly higher GSH concentrations ( $P = 0.0446$ ) than males. No effect was found between the



type of milk and any of the temperament measurements. For the productive characteristic evaluated, which was weaning weight, a significant association ( $P = 0.0477$ ) was found with the type of milk consumed by the calves, since those who consumed type A1 milk had higher weights, followed by those who consumed milk A1/A2 milk, and those with lower weight were the ones who consumed A2 milk.





## 1. INTRODUCCIÓN

La leche es un producto de la lactancia materna, exclusivo de los mamíferos, que sirve como alimento para las crías, después del parto. Los primeros días posteriores al parto, la vaca segrega un fluido llamado calostro, el cual debe de ser el primero en ingerirse por la cría, ya que proporciona diferentes nutrimentos, pero sobre todo para la obtención de los anticuerpos necesarios en el desarrollo del sistema inmunológico de las crías (Bush, 1980).

Los principales componentes de la leche de bovino son agua, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales, pero sobre todo proteínas. Las proteínas de la leche bovina se clasifican en proteínas séricas o de suero de leche (20%) y en caseínas (80%) (Bhopale, 2016) estas últimas incluyen cuatro tipos: la caseína  $\alpha$ S1, caseína  $\alpha$ S2, la  $\beta$ -caseína y la k-caseína.

Aparte de su papel nutritivo e inmunológico, los componentes de la leche también llevan información específica de la madre a la cría. Se ha demostrado que una serie de fragmentos derivados de las caseínas de la leche (péptidos bioactivos), tienen diferentes propiedades inmunomoduladoras, antitrombóticas e inhibidoras, y algunos otros se comportan como ligandos de receptores de opioides que son capaces de abordar los sistemas opioidérgicos en el organismo del recién nacido o el adulto (Teschemacher, *et al.*, 1997).

La  $\beta$ -casomorfina 7 (BCM-7) es un péptido derivado de la  $\beta$ -caseína A1, que muestra una potente actividad opioide. Los efectos de este péptido han sido estudiados en diferentes modelos animales para inferir sus efectos en el humano, en donde se ha reportado que la BCM-7 produce problemas gastrointestinales como: diarreas, dolor estomacal y abdominal, espasmos y flatulencias, además diferentes estudios epidemiológicos han mostrado la asociación del consumo de la leche A1 con algunas enfermedades como la diabetes, esquizofrenia y el autismo (Allison y Clarke, 2006). Estos estudios mencionan que el consumo de leche A1 permite el engrosamiento de la capa de colesterol en las venas y facilita el acumulamiento de la glucosa en el torrente sanguíneo, de esta manera se reporta a la  $\beta$ -caseína como un determinante importante para el desarrollo de la diabetes (Pozzilli, 1999). Cade (2000) realizó un estudio para la



determinación de las inmunoglobulinas de IgA y la IgG contra gliadina y caseínas en suero, y obtuvo que los anticuerpos IgG para gliadina se encontraron en el 87% de los pacientes autistas y el 86% de los pacientes esquizofrénicos y los anticuerpos IgG de alto título para caseína bovina se encontraron en el 90% de los pacientes autistas y en el 93% de los pacientes esquizofrénicos, por lo que el autor llega a la conclusión de que muchos pacientes con esquizofrenia o autismo sufren más síntomas debido a la absorción de exorfinas formadas en el intestino por una digestión incompleta de gluten y caseína.

Umbach *et al.*, 1985, demostraron la presencia de inmunoreactividad a la BCM-7 bovina en la sangre de becerros recién nacidos después de la ingesta de leche. Se propuso este trabajo, con el fin de explorar los efectos fisiológicos y productivos del consumo de la leche A1 en becerros de la raza Charolais.

## **2.- ANTECEDENTES**

### **2.1. La ganadería en México**

#### **2.1.1. La ganadería cárnica en México**

En México, la producción de carne de bovino creció a una tasa promedio anual de 1.8 en el periodo de 2007 a 2016. Para 2017, se ubicó en un máximo histórico de 1.91 millones de toneladas, es decir, registró un crecimiento anual de 1.6 por ciento. El consumo nacional aparente de carne de bovino disminuyó la tasa promedio anual de 1.3 por ciento en la última década. En 2017 el consumo nacional ascendió a 1.8 millones de toneladas, lo que significó un incremento anual de 0.2 por ciento. Por su parte, el consumo per cápita de carne de bovino en México se redujo entre 2007 y 2016 a una tasa media anual de 2.1 por ciento, al pasar de 18.0 a 14.8 kilogramos por persona por año.

Por cuarto año consecutivo el consumo nacional del cárnico sería menor que la producción. Asimismo, ante la combinación de mayor oferta exportable y menores incentivos para importar, en 2017 fue el tercer año consecutivo en el que se observó saldo superavitario en la balanza comercial de carne de bovino. Hacia finales de 2015 los precios



del ganado bovino vivo y de la carne en canal en México registraron máximos históricos, y durante 2016 su ritmo de crecimiento disminuyó. Los precios de la carne de res al mayoreo y al consumidor registraron un comportamiento más estable con respecto a los años previos y se espera que esta tendencia continúe durante 2017 (FIRA, 2017)

### 2.1.2. La ganadería lechera en México

El consumo y el comercio mundial de alimentos en general y de lácteos en particular está influenciado por un conjunto de factores referidos al contexto macroeconómico esperado y a la evolución de la población mundial y su localización, así como de las políticas de apoyo a la producción y comercialización en los distintos países y de las negociaciones internacionales. Todos ellos afectan la demanda, la oferta y el comercio mundial. En la última década el crecimiento del consumo mundial de lácteos dependió en gran medida del aumento de población mundial. Aproximadamente el 70% de los aumentos en la demanda se atribuyen a este factor, en tanto que el crecimiento del consumo por habitante explicó el restante 30%. Actualmente la mayor parte del consumo de lácteos está concentrado en los países industrializados, como consecuencia de su mayor poder adquisitivo y de su mayor consumo per cápita, el mayor ritmo de crecimiento de la población en los países en desarrollo ha contribuido. (Secretaría de Economía, 2002)

De acuerdo al “Panorama de la leche en México, 2016” de SAGARPA, la industria lechera registra los siguientes datos:

- La producción nacional de leche de bovino alcanzó 11 mil 607 millones de litros, es decir, 1.9% más que en el mismo periodo de 2015.
- En 2016, México ocupó la novena posición en la producción mundial de leche.
- Tres de cada cien litros que se producen en el mundo son de origen mexicano.
- Los 3 estados que más producen leche son: Jalisco, Coahuila y Durango.
- México posee el quinto lugar en compra de leche (en polvo, líquida, evaporada, condensada, sólidos lácteos, preparaciones y otros), con 4.7% de las importaciones globales.



## 2.2. La leche de bovino

La leche es un alimento blanquecino producido por las células secretoras mamarias de las hembras en un proceso llamado lactancia; la cual es una de las características específicas de los mamíferos. La leche que se secreta en los primeros 5 a 7 días después del parto se llama calostro (Kebchaoui, 2012; Guetouache, 2014). El calostro contiene un mayor contenido de energía, proteínas, vitaminas, minerales y registra un contenido inferior de lactosa (azúcar) que la leche normal lo cual favorece una menor aparición de diarreas en los becerros. Adicionalmente es una fuente importante de anticuerpos lo cual les permite adquirir inmunidad y resistencia a las infecciones (Moss y Coleman, 2009)

El propósito de la leche, en los mamíferos, es alimentar a sus crías en los ciclos iniciales de la vida. Por tal motivo, más del 80% de la leche se almacena en los alvéolos de la ubre y se transfiere a la cisterna glandular por un reflejo neurohormonal, iniciado por el contacto de la boca de la cría con la ubre, que culmina en la contracción de las células mioepiteliales que rodean los alvéolos por la acción de la oxitocina liberada de la glándula pituitaria (Combellas y Tesorero, 2003)

La leche se produce generalmente en las células secretoras mamarias de las hembras durante la lactancia y consta de cuatro fases físicas, de acuerdo a Michel, (2005).

- Una fase gaseosa, que esencialmente comprende CO<sub>2</sub> en el tiempo de ordeño.
- Una fase grasa compuesta de células grasas (2 a 5  $\mu$ m de diámetro) que contienen lípidos y elementos liposolubles, los glóbulos grasos están rodeados de fosfolípidos y membrana proteica.
- Una fase coloidal que comprende micelas de caseína asociadas con fosfatos y citratos de calcio y magnesio.
- Una fase acuosa que consiste en proteínas solubles (proteína de suero), lactosa y minerales (electrolitos).

## 2.3. Importancia de la leche de bovino

### 2.3.1. Importancia nutricional para el becerro

El becerro al nacer aun no es considerado rumiante ya que su sistema digestivo no ha madurado y requiere del paso por diferentes etapas para lograrlo, por lo tanto, el abomaso es el único estómago funcional al nacimiento. (Moran, 2002). El desarrollo del sistema digestivo del becerro después del nacimiento se divide en 4 etapas: 1) inicia desde el nacimiento, cuando el becerro consume el calostro de la ubre de su madre 2) después del consumo del calostro hasta la semana 2 o 3 cuando el becerro comienza a ingerir alimento seco; 3) comienza cuando el becerro empieza a comer alimento iniciador o forraje y termina en el destete y 4) inicia en el destete y dura por el resto de su vida adulta. A las primeras 3 etapas se les conoce como fase pre-rumiantes (Drackley, 2008). Durante la fase pre-rumiante el becerro digiere los sólidos en la leche materna y los digiere por medio de enzimas en el abomaso

En la etapa 1 de la fase pre-rumiante, el becerro al nacer necesita consumir el calostro de su madre. La composición del calostro comparado con la leche posterior es muy distinta, en el cuadro 1 se muestra la composición porcentual de ambas de acuerdo a sus nutrientes.

**Cuadro 1. Comparación porcentual de la composición porcentual del calostro y la leche bovina. (Fuente: Bonilla, 1989)**

	Calostro	Leche
<b>Materia seca</b>	21.10	12.90
<b>Grasa</b>	4.50	3.50
<b>Proteína total</b>	13.00	3.40
<b>Caseínas</b>	5.72	2.66
<b>Albúminas y globulinas</b>	7.33	0.74
<b>Lactosa</b>	2.90	4.90
<b>Minerales</b>	1.10	0.70

La leche es canalizada desde el esófago vía el surco esofágico hacia el abomaso. Este surco es un pequeño canal en la pared ruminal que es controlado por músculos que permiten a los líquidos ser desviados antes de llegar al rumen. Cuando la leche ingresa al abomaso, forma un coágulo firme bajo la influencia de las enzimas renina y pepsina. La coagulación de la leche ralentiza la velocidad por la cual fluye hacia el abomaso, permitiendo así una liberación estable de los nutrientes a través del estómago y eventualmente, hacia el torrente sanguíneo. Puede tomar de 12-18 horas para que la leche cuajada sea completamente digerida (König *et al.*, 2002; Moran, 2002)

En los recién nacidos, los procesos digestivos en el tracto gastrointestinal son apoyados por enzimas lisosómicas presentes en los enterocitos del tipo fetal que hidrolizan las macromoléculas absorbidas por el sistema canalicular apical y almacenadas por vacuolas grandes (digestivas) (De Noni, 2008). Esta digestión intracelular de nutrientes hace una importante contribución a los procesos digestivos en el estómago y en el tracto intestinal de los vertebrados, pero en las especies de mamíferos está presente sólo en el período perinatal y se refiere a la digestión de las macromoléculas de calostro y leche y posiblemente a la absorción de vitaminas y minerales (Breitner, 1986). Brown y Moon (1979) descubrieron que sólo durante el primer día posnatal las vacuolas intestinales no tenían actividad lisosómica que pudiera ayudar a transferir las sustancias bioactivas colostrales en forma intacta a la circulación. La vida útil de los enterocitos fetales depende de una serie de factores hormonales que regulan la maduración del epitelio intestinal.

### **2.3.2. Importancia productiva del consumo de la leche**

Como ya bien se mencionó, la leche es la principal fuente de nutrientes para los becerros después de su nacimiento. Para el caso del ganado cárnico, la recepción de nutrientes es de vital importancia para el sistema de producción; en primer lugar, porque se mide la eficiencia de la madre para la producción de leche y en segundo lugar influye directamente en el peso al destete del becerro, que consiste en el peso neto posterior al destete (separación de la cría de la madre). Este proceso ocurre por lo regular a los 205 días después del nacimiento (Rutledge, 1971) y esta característica tiene un coeficiente de correlación genética del 0.19 para PN y PD (Ossa y Pérez, 2002).

La importancia productiva del consumo de leche depende de diferentes variables tanto ambientales como genéticas, entre las primeras destacan el potencial genético (Montaño, 1990), la producción de leche de la vaca (Marston *et. al*, 1992), la habilidad materna (Ossa y Pérez, 2002) y la raza (Brown *et. al*, 2002) Sobre el último punto se pueden mencionar reportes sobre el análisis de la relación entre pesos al destete y el fondo genético, específicamente *Bos taurus*, *Bos indicus* y las cruzas entre ellas, en donde han encontrado diferencias entre las mismas, se puede mencionar que *Bos indicus* posee una velocidad de conversión alimenticia más rápida que *Bos taurus*.; *Bos taurus* al incluir razas más dóciles tiende a tener animales con mayores pesos, incluyendo pesos al destete. De igual manera entre las razas de *Bos taurus* se aprecia una diferencia entre pesos al destete, por ejemplo la raza Hereford posee mayores pesos a comparación de Holstein y Jersey. (Daley, 1987; Brown *et al*, 2002; Córdova, 2005; Mejía-Bautista *et. al*, 2010)

Brown (2002) menciona que la habilidad materna y la producción de leche en las vacas son primordiales en el crecimiento pre-destete en los becerros. Brown (1999) menciona que el fondo genético es un factor determinante en la ganancia de peso en los becerros, ya que las cruzas con 50% de *Bos indicus* ganan menos peso que aquellos con menor porcentaje del mismo fondo genético.

#### **2.4. Composición de la leche bovina**

El valor nutricional de la leche es particularmente elevado debido al equilibrio de los nutrientes que lo componen. La composición varía entre las especies animales y razas dentro de la misma especie, y también de una lechería a la otra, dependiendo del período de lactancia y de la dieta, Por ejemplo, la leche de vaca está compuesta por un 78% de agua y 11.4% de sólidos; contiene 3.2% de grasa y 8.13% de sólidos grasos, adicionalmente, en menor proporción se encuentra calcio (0.11%), fósforo (0.08%) y magnesio (0.21%). En general, la leche de vaca comparada con la leche de cabra es más rica en lactosa, grasa y proteínas, pero tiene un contenido mineral similar.

La leche contiene varios grupos de nutrientes. Las sustancias orgánicas están presentes en cantidades casi iguales y se dividen en elementos constructores, proteínas y componentes energéticos, carbohidratos y lípidos. Comprende también elementos

funcionales, tales como vestigios de vitaminas, enzimas, gases disueltos, y contiene sales disueltas, especialmente en forma de fosfatos, nitratos y cloruros de calcio, magnesio, potasio y sodio. También contiene gases disueltos (5% en volumen), principalmente dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), nitrógeno (N) y oxígeno ( $\text{O}_2$ ) (Gautheron y Lepouze, 2012).

Las proteínas de la leche representan el 95% de la proteína cruda, pero el 5% restante son: aminoácidos libres, péptidos pequeños y nitrógeno no proteico. Las proteínas comprenden sólo aminoácidos ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbúmina) o aminoácidos y ácido fosfórico ( $\alpha$  y  $\beta$  caseína) con una porción de carbohidratos (a veces incluso k-caseína). La base de la precipitación a pH 4.6 ( $20^\circ\text{C}$ ) o bajo la acción del cuajo separa dos componentes: las caseínas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y k) y la proteína soluble o proteína de suero (Guétouache *et al.*, 2014).

#### **2.4.1. Las caseínas**

##### **2.4.1.1. La familia de las caseínas $\alpha$ s1**

Representa hasta el 40% de todas las fracciones de caseína en la leche bovina. La proteína de referencia para la familia de la caseína  $\alpha$ s1 es  $\alpha$ s1-caseína, variante genética B-8P cuya cadena polipeptídica contiene 199 residuos de aminoácidos. Se han identificado hasta ahora ocho variantes genéticas de esta caseína: A, B, C, D, E, F, G y H (Farrell *et al.* 2004, Grosclaude y Ribadeau-Dumas 1973, Mercie *et al.* 1971). Las diferencias entre las variantes genéticas anteriores y las variantes genéticas de las familias de caseína restantes resultan de la delección o sustitución genéticamente controlada de aminoácidos. El grado de asociación de las fracciones  $\alpha$ s1-caseína se determina por la fuerza iónica (concentraciones de sal en una solución): se forman tetrámeros en soluciones con concentraciones de sal inferiores a 0.1 M, en soluciones con concentraciones de sal de 0.1 a 0.4, mientras que en soluciones con concentraciones de sal superiores a 0.5 M, la  $\alpha$ s1-caseína se vuelve insoluble (Dziuba y Dziuba, 2014)



#### 2.4.1.2. La familia de las caseínas $\alpha_2$

Representa hasta un 10% de todas las fracciones de caseína en la leche bovina, y está representada por dos componentes primarios y varios componentes secundarios. La proteína de referencia para la familia de las  $\alpha_2$ -caseínas es  $\alpha_2$ -caseína, variante genética A-11P cuya cadena polipeptídica contiene 207 aminoácidos y un solo enlace disulfuro intramolecular (Swaigood, 1992). Hasta la fecha, se han identificado cuatro variantes genéticas de  $\alpha_2$ -caseína: A, B, C y D (Brignon y Ribadeau-Dumas 1973; Grosclaude, 1979; Mahé y Grosclaude, 1982). Las fracciones de  $\alpha_2$ -caseína son más sensibles a las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que las fracciones  $\alpha_1$ -caseína, y se precipitan en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  2 mM (Farrell *et al.* 2004).

#### 2.4.1.3. La familia de las $\beta$ -caseínas

Representa hasta el 45% de todas las fracciones de caseína en la leche bovina, combina muchas fracciones, incluyendo los productos de hidrólisis parcial de la mayor fracción de  $\beta$ -caseína por la plasmina de la leche (Farrell *et al.* 2004). Este proceso da lugar a fracciones de  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$ -caseína que constituyen fragmentos 29-209, 106-209 y 108-209 de  $\beta$ -caseína, respectivamente. La familia de la  $\beta$ -caseína también comprende polipéptidos, componentes 5, 8-lentos y 8-rápidos de la fracción proteosa-peptona, que corresponden a los fragmentos 1-105 o 1-107, 1-28 y 29-105 de  $\beta$ -caseína, respectivamente. La proteína de referencia para esta familia es  $\beta$ -caseína, variante genética A2-5P cuya cadena polipeptídica contiene 209 residuos aminoácidos, excluyendo el resto Cys. Se han identificado doce variantes genéticas de la  $\beta$ -caseína: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2 y I (Dong y Ng-Kwai-Hang, 1998; Han *et al.*, 2000; Swaigood, 1982; Visser *et al.*, 1995; Waugh, 1971).

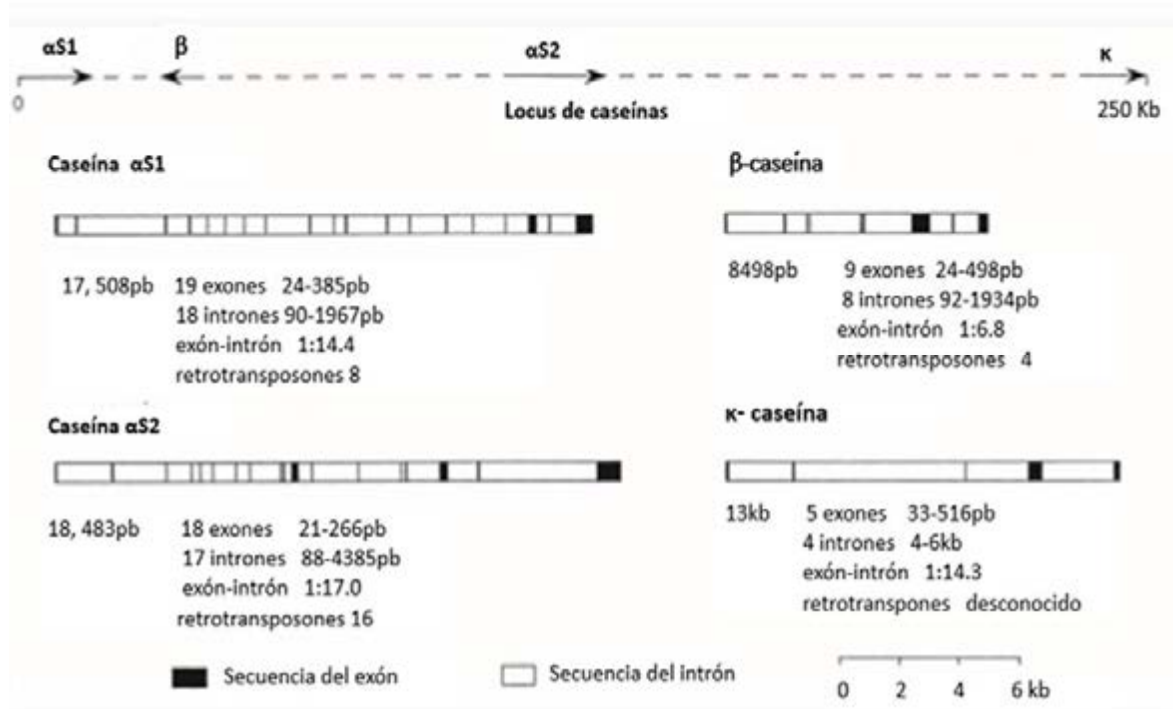
El alelo B de la  $\beta$ -caseína se ha asociado positivamente a la producción de grasa y porcentaje de caseína, mientras que el alelo A se asocia favorablemente a producción de leche y proteína total. (Ng-KwaiHang *et al.*, 1986; Aleandri *et al.*, 1990).



#### 2.4.1.4. La familia de la $\kappa$ -caseína

Contiene un componente principal sin azúcar y al menos seis componentes secundarios. Los componentes secundarios se caracterizan por diferentes grados de fosforilación (0 ó 1 residuo de fosfato) y glicosilación (Farrell *et al.* 2004). La  $\kappa$ -caseína representa hasta el 15% de todas las fracciones de caseína en la leche de bovino. La proteína de referencia para esta familia de caseína es  $\kappa$ -caseína, variante genética A-1P cuya cadena polipeptídica contiene 169 residuos de aminoácidos y un residuo de fosfato. Se han identificado hasta la fecha once variantes genéticas de la  $\kappa$ -caseína: A, B, C, E, F1, F2, G1, G2, H, I y J (Alexander, 1988; Grosclaude *et al.*, 1972; Mercier, 1973). La  $\kappa$ -caseína contiene hasta un residuo de fosfato, y es soluble en presencia de iones de calcio. Las moléculas de  $\kappa$ -caseína pueden asociarse con las moléculas de  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\beta$ -caseína, y protegen contra la precipitación en presencia de iones de calcio, lo que conduce a la formación de moléculas coloidales estables de caseína micelar (Horne, 2006). La  $\kappa$ -caseína aislada se polimeriza para formar una mezcla de dímeros a los octámeros (Dziuba y Dziuba, 2014)

En la figura 1 se esquematiza el locus de las caseínas, en donde se encuentra la caseína  $\alpha$ S1, la  $\alpha$ S2, la  $\beta$ -caseína y la  $\kappa$ -caseína.



**Figura 1. Genes de las caseínas.** Se esquematiza la organización del locus de las caseínas, e individualmente la estructura de cada uno de los cuatro genes de este grupo de proteínas de la leche. (Fuente: Bawden y Nicholas, 1999.)

#### 2.4.2. Proteínas séricas o de suero de leche

Las proteínas del suero, son proteínas de la leche que permanecen en el suero después de la precipitación de la caseína. Las proteínas de suero representan alrededor del 20% de todas las proteínas de la leche (Madureira *et al.* 2007). Las proteínas de suero predominantes son  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) y  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La). Otras proteínas de suero incluyen albúmina de suero bovino (BSA), inmunoglobulinas (Ig), lactoferrina (BLF), lactoperoxidasa (LP) y otras. La  $\beta$ -lactoglobulina es una proteína de suero importante con 11 variantes genéticas identificadas: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W (Brignon *et al.*, 1977; Conti *et al.*, 1988; Godovac-Zimmermann *et al.*, 1996; 1990; Jakob y Puhán, 1992). Las variantes A y B se encuentran con mayor frecuencia (Jakob y Puhán, 1992). La proteína de referencia para la familia de la  $\beta$ -lactoglobulina es la variante genética B cuya cadena polipeptídica contiene 162 residuos de aminoácidos (Eigel *et al.*,



1984). La  $\beta$ -lactoglobulina se produce como un dímero estable a un pH de 5.2 a 7.0, como monómero a un pH de 3.0 y superior a 8.0, y como octámero a un pH de 3.5 a 5.2 (Madureira *et al.* 2007). De forma similar a la  $\beta$ -lactoglobulina, la  $\alpha$ -lactoalbúmina se produce en la glándula mamaria. La  $\alpha$ -lactoalbúmina participa en la biosíntesis de lactosa, y es un efector alostérico de  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa (Kuhn *et al.* 1980). Se han identificado tres variantes genéticas de  $\alpha$ -lactoalbúmina: A, B y C (Madureira *et al.* 2007). La variante B es una proteína de referencia cuya cadena polipeptídica contiene 123 residuos de aminoácidos. La estructura globular de  $\alpha$ -lactoalbúmina se estabiliza mediante enlaces disulfúricos a un pH de 5.4 a 9.0 (Permyakov y Berliner 2000).

La albúmina sérica bovina no se sintetiza en la glándula mamaria, pero se transfiere de la sangre a la leche. Una única cadena de polipéptido BSA contiene 582 residuos aminoácidos (Carter y Ho, 1994).

Las inmunoglobulinas son complejos proteicos sintetizados por linfocitos B. Son responsables de las funciones inmunológicas (Madureira *et al.* 2007).

Las restantes proteínas del suero representan alrededor del 0.6% de las proteínas totales de la leche y muestran diversos tipos de actividad biológica. Las propiedades terapéuticas de las proteínas de la leche han sido investigadas en la última década (Madureira *et al.* 2007, Zimecki y Kruzel 2007; Mils *et al.* 2011,). Las proteínas del suero contienen lactoferrina,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina y albúmina sérica, y se encontró que inhiben el crecimiento de los tumores de manera más eficaz que otras proteínas alimentarias (Parodi, 2007).

También existen reportes de las propiedades tecnológicas de las proteínas de suero como acelerador en la coagulación de quesos y la disminución de la grasa en los mismos (Vega, 2002), elaboración de películas comestibles como reemplazo de empaques plásticos (Márquez *et al.* 2009), también como para la elaboración de suplementos alimenticios (Poveda, 2013)



## 2.5. Péptidos bioactivos de la leche bovina

La leche también contiene componentes nutritivos y funcionales, llamados péptidos bioactivos (PBA). Los PBA, son moléculas con una secuencia de aminoácidos, unidos entre sí por enlaces peptídicos. Dentro de las proteínas lácteas (caseínas, proteínas séricas, lactoferrina, lactoglobulina, entre otras) se encuentran estos péptidos de forma inactiva (Clare & Swaisgood, 2000). Gracias a la acción hidrolítica de las proteasas, por ejemplo, durante la digestión gastrointestinal de alimentos o en el transcurso de su procesamiento (fermentación), pueden liberarse para desempeñar diversas funciones bioactivas. Intervienen en muchos procesos biológicos: funcionamiento gastrointestinal, hormonal, neurológico y nutricional. El aprovechamiento de sus funciones se aplica de muchas maneras, como por ejemplo como suplementos alimenticios en dietas, como fármacos y propiamente como fermentadores en productos lácteos (Hartmann & Meisel, 2007).

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

Según Fitzgerald & Murray (2006) los péptidos bioactivos se han definido como péptidos con actividad similar a una hormona o fármaco, que eventualmente modulan la función fisiológica a través de interacciones de unión a receptores específicos en las células diana, lo que conduce a la inducción de respuestas fisiológicas. De acuerdo con sus propiedades funcionales, los péptidos bioactivos pueden clasificarse como antimicrobianos, antitrombóticos, antihipertensivos, opioides, inmunomoduladores, quelantes (unión de minerales), antioxidantes e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), que estrecha los vasos sanguíneos y aumenta la presión arterial. Estos péptidos juegan un papel importante en la salud, especialmente en animales, ya que los protegen de enfermedades y coadyuvan en el buen funcionamiento del sistema inmune, el sistema cardiovascular, sistema nervioso y el sistema gastrointestinal. (Sharma, 2011)

En el cuadro 2 se muestran algunos ejemplos de PBA indicando su función fisiológica en animales, la mayoría de ellos en modelos humanos.

**Cuadro 2. Péptidos biológicamente activos derivados de las proteínas de leche de bovino. (Modificado de Pons-Fita, 2015).**

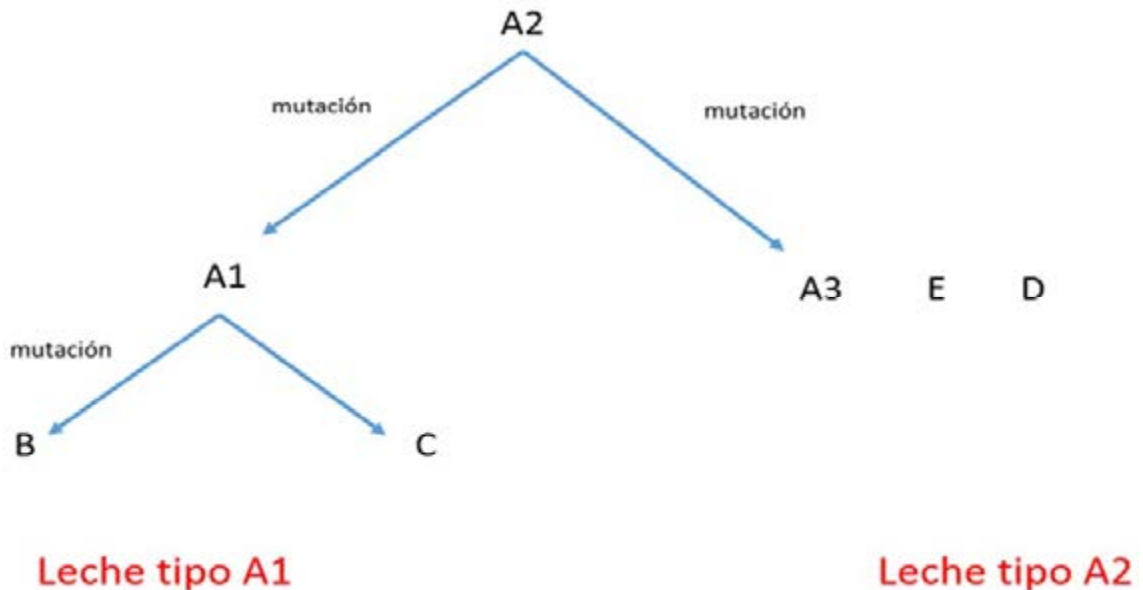
<b>Péptido</b>	<b>Proteína portadora</b>	<b>Proteasa liberadora</b>	<b>Actividad</b>	<b>Autores</b>
<b>Caseidina</b>	Caseína $\alpha$ 1 y $\kappa$ -caseína	Quimosina	Antimicrobiana	Lahov y Regelson, 1996
<b>Isracidina</b>	Caseína $\alpha$ 1	Quimiocina	Antimicrobina y fungicida	Lahov y Regelson, 1996
<b><math>\beta</math>-casomorfina 7</b>	$\beta$ -caseína	Quimiotripicina	Inhibidor de la ACE, inmunomodulador y opioide	Parashar, 2005
<b><math>\beta</math>-casoquinina 10</b>	$\beta$ -caseína	Péptido sintético	Inhibidor de la ACE e inmunomodulador	Meisel, 1998
<b>SKVYP</b>	$\beta$ -caseína	Procedente de <i>L. delbrueckii</i> subsp. vulgaris	Inhibidor de la ACE	Korhonen y Pihlanto, 2006
<b>VPPIPP</b>	$\beta$ -caseína y $\kappa$ -caseína	Procedente de <i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>S. cerevisiae</i>	Inhibidor de la ACE	Maeno <i>et al.</i> , 1996
<b>ARHPHPLSFM</b>	$\kappa$ -caseína	Procedente de <i>L. delbrueckii</i> subsp. vulgaris IFO13953	Antioxidante	Pihlanto, 2006

## 2.6. Polimorfismos genéticos en los genes de la $\beta$ -caseína

Como se ha mencionado, la existencia de variantes alélicas de las principales proteínas de la leche ha sido bien estudiadas y documentadas. En particular el en caso de la  $\beta$ -caseína las proteínas de la leche presentan las variantes génicas A1 y A2 del gen de la  $\beta$ -caseína (CSN2), que han dado lugar a la llamada leche A1 y A2.

La diferencia entre los alelos A1 y A2 de la  $\beta$ -caseína es un cambio aminoacídico en la posición 67 de la cadena polipeptídica de la  $\beta$ -caseína, el codón CCT del aminoácido prolina, en la variante A2, cambia a CAT que se traduce como histidina, en la variante

A1, (Oleński *et al.*, 2012). La diferencia estructural entre las dos variantes de la  $\beta$ -caseína (A1 y A2) conduce a distintas propiedades que se ven reflejadas en el proceso de digestión. La variante A1 de la  $\beta$ -caseína es más fácilmente hidrolizada, por las enzimas gastrointestinales, debido a la débil unión entre histidina e isoleucina dando como resultado la liberación de un péptido llamado  $\beta$ -casomorfina-7 (BCM-7) (Jinsmaa & Yoshikawa, 1999; De Noni, 2008).



**Figura 2. Polimorfismos y mutaciones de la  $\beta$ -caseína.** Se muestran las mutaciones que ha sufrido la  $\beta$ -caseína a través del tiempo y qué variantes se generaron a partir de dichos cambios. (Modificado de Parashar, 2005)

En la figura 2 se pueden observar la evolución molecular que ha tenido la  $\beta$ -caseína, lo que ha generado más de doce variantes alélicas del gen. De acuerdo a Faith (2018) hace más de 10,000 años, y antes de que fuera domesticado, en el ganado bovino existía únicamente la proteína  $\beta$ -caseína A2. Sin embargo, hace unos 8,000 años se produjo una mutación natural del gen en la raza Holstein, lo que resultó en la producción de la proteína  $\beta$ -caseína A2 en esta raza. A partir de esta mutación en el gen de la  $\beta$ -caseína se derivaron las doce variantes genéticas, de las cuales A1 y A2 son las más comunes. La mutación se fue segregando entre las diferentes razas de ganado, principalmente porque las Holstein se utilizan para mejorar genéticamente la producción lechera de otras razas. Poco a poco, la variante de  $\beta$ -caseína A2 se volvió dominante en la leche. Si bien los hatos lecheros en



gran parte de Asia, África y parte del sur de Europa siguen siendo naturalmente altos en vacas que producen leche A2, la versión A1 de la proteína es común entre el ganado en el este. (Faith, 2018)

De la primera mutación de la  $\beta$ -caseína A2, surgieron los alelos A1 y el A3, junto con los alelos D y E. Del proceso anterior, se clasificó la leche que producen las vacas de acuerdo a su genotipo, en leche tipo A1 y A2. La  $\beta$ -caseína A1 es resultado de una mutación en bovinos que se cree que ocurrió hace aproximadamente 8,000 años en Mesopotamia (actualmente el sur de Turquía y el norte de Siria e Irak) (Parashar, 2005), debido a que se estima que la primera domesticación de bovinos para sustento humano fue en esa época (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992). El alelo A1 después sufrió otra mutación, lo que generó los alelos B y C, no se sabe con exactitud cuándo ocurrió esta mutación (Parashar, 2005)

En el cuadro 3 se pueden observar los cambios aminoacídicos en las diferentes posiciones del gen de la  $\beta$ -caseína, los cuales generan los diferentes polimorfismos. De la primera mutación del alelo A2, el primer cambio aminoacídico fue Histidina por Prolina en la posición 67 dando lugar al alelo A1 y el otro cambio fue Histidina por Glutamina en la posición 106 generando el alelo A3. Dentro del grupo del alelo A3 se encuentran los alelos D y E, el primero posee un cambio de Lisina por Serina en la posición 18 y la segunda es de Lisina por Ácido Glutámico en la posición 36 y ambas conservan la Histidina en la posición 116. Para la segunda mutación, en el caso de la A1 se conservó el cambio de Prolina por Histidina en la posición 67 y se dieron 2 mutaciones: Arginina por Serina en la posición 122 dando lugar al alelo B y Lisina por Ácido Glutámico en la posición 37 generando el alelo C. (Parashar, 2015)



**Cuadro 3. Polimorfismos en la  $\beta$ -caseína, se indican las posiciones y aminoácidos específicos que determinan cada variante de  $\beta$ -caseína. (Fuente: Parashar *et al.*, 2005).**

Variante	Cambio de aminoácidos en diferentes posiciones de la $\beta$ -caseína						
A1	SerP(18)	SerP(35)	Glu(36)	Glu(37)	Pro(67)	His(106)	Ser(122)
A2	<b>SerP(18)</b>	<b>SerP(35)</b>	<b>Glu(36)</b>	<b>Glu(37)</b>	<b>His(67)</b>	<b>His(106)</b>	<b>Ser(122)</b>
A3	SerP(18)	SerP(35)	Glu(36)	Glu(37)	His(67)	Gln(106)	Ser(122)
B	SerP(18)	SerP(35)	Glu(36)	Glu(37)	Pro(67)	His(106)	Arg(122)
C	SerP(18)	SerP(35)	Glu(36)	Lys(37)	Pro(67)	His(106)	Ser(122)
D	Lys(18)	SerP(35)	Glu(36)	Glu(37)	His(67)	His(106)	Ser(122)
E	SerP(18)	SerP(35)	Lys(36)	Glu(37)	His(67)	His(106)	Ser(122)

\* En color rojo se diferencian los cambios aminoacídicos y el alelo original se muestra en negritas.

### 2.6.1 Importancia del péptido BCM-7

La BCM-7, cuya secuencia es Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile, se comporta como un agonista de tipo opioide. En estudios de unión a receptores opioides o en preparaciones de órganos aislados (Brantl *et al.*, 1981; Chang *et al.*, 1982) se ha demostrado que provoca analgesia opiácea en ratas (Brantl *et al.*, 1981; Chang *et al.*, 1982; Grecksch *et al.*, 1982). El papel de los receptores opioides en la mediación de los efectos de BCM-7 se comprobó al encontrar que la naloxona (un antagonista competitivo específico de los receptores opioides  $\mu$ ), inhibía muchos de los efectos de BCM-7 incluyendo la motilidad gastrointestinal, la secreción de moco y la proliferación de linfocitos (Clarke *et al.*, 2014). La afinidad de la BCM-7 bovina a los receptores opioides es aproximadamente 10 veces mayor que la BCM-7 humana (Meisel, 1986), lo cual genera un retraso en el tránsito gastrointestinal, una mayor producción de mucina y moco gastrointestinal y como consecuencia una alteración gastrointestinal que conlleva a malestar e inflamación en la zona (Pal, 2015)

Los sistemas opioidérgicos de mamíferos consisten en receptores opioides y sus ligandos. Dependiendo de su localización, su significancia fisiológica parece estar



relacionada con un número considerable de funciones reguladoras neuroendócrinas. Los receptores opioides se localizan en los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario, así como en el tracto intestinal del organismo mamífero y pueden interactuar con sus opioides tanto endógenos como exógenos (Teschmacher *et al.*, 1997).

Trompette *et al.* (2003), sugirió el papel de BCM-7 en la inmunidad intestinal induciendo una secreción de moco yeyunal fuerte. La administración oral de BCM-7 a un grupo diabético de ratas aumentó el nivel de insulina en plasma, disminuyó el nivel de glucagón y elevó la actividad de superóxido dismutasa y catalasa. (Yin, 2010). El BCM-7 tiene un papel protector contra la hiperglucemia y el estrés oxidativo mediado por radicales libres e inhibe la vía de señales de óxido nítrico NF-KB-iNOS en el páncreas de ratas diabéticas (Yin, 2010). Nedvidková *et al.* (1985), observó que BCM-7 aumentó el nivel de prolactina en el plasma después de la inyección intraperitoneal, esta hormona es más conocida por su papel en la lactancia y como un regulador del sistema inmune. También se describió un papel analgésico de BCM-7 mediante la inyección intraperitoneal de este péptido a las ratas (Dubynin, 2008).

Los efectos de la administración intraperitoneal del BCM-7 en el aprendizaje de ratas fueron investigados utilizando pruebas de evitación activa y pasiva laberinto tipo T, dosis de 5 mg / kg de BCM-7, 5 min antes del entrenamiento aceleró la adquisición de la tarea reforzada con alimentos y aumentó el número de ensayos correctos en el laberinto en T. Los datos obtenidos apoyaron la idea de que BCM-7 atenuó las manifestaciones de motivación defensiva (Marklakova, 1995). También se demostró la modulación de la expresión génica de los péptidos reguladores de las células G y D, los datos de los estudios de hibridación *in situ* indicaron que BCM-7 afecta indirectamente la expresión génica de la gastrina mediante la acción paracrina de la somatostatina. Maslennikova *et al.*, (2008) encontraron que BCM-7 fue responsable de la activación *ex-vivo* (síntesis de ADN) de procesos proliferativos en el miocardio y el epitelio ectodérmico y endodérmico de ratas recién nacidas.

La BCM-7 promovió el crecimiento de ratas al influir sobre las hormonas relacionadas con el crecimiento y los niveles de factor de crecimiento en suero de rata. Se reguló la expresión de mRNA receptor de la hormona del crecimiento (GHR) con el fin de aumentar

la sensibilidad de una hormona del crecimiento en el hígado de rata. (Yin, 2010). Se ha demostrado que el consumo de la  $\beta$ -caseína A1, tiene un marcado efecto arterogénico promoviendo la oxidación de proteínas de baja densidad (LDL) y la generación de anticuerpos para oxidar la LDL, lo cual contribuye al proceso de arteroesclerosis. Adicionalmente, la  $\beta$ -caseína A1 y la BCM-7 se han implicado en la patogénesis de la diabetes tipo 1 vía dos mecanismos: la producción de auto anticuerpos que promueven la muerte por autoinmunidad de las células  $\beta$ - pancreáticas y la otra vía demostrada en ratones diabetogénicos no obesos fue la vía de receptores de opioides (Clarke, 2014).

El consumo de  $\beta$ -caseína A1 también ha sido asociado al aumento en la gravedad de los síntomas asociados con esquizofrenia y autismo, estos efectos se atribuyeron a la actividad opioide de la BCM-7 y al estrés oxidativo. Algunos estudios han demostrado que los péptidos BCM y sus análogos son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica, por lo tanto, los péptidos BCM podrían influenciar las vías de señalización centrales (Allison y Clarke, 2006).

En un estudio reciente, Deth et al (2016) demostraron que la exposición a  $\beta$ -casomorfina-7 (BCM-7), causaba una disminución de las concentraciones de Glutatión (GSH) intracelular en células SH-SY5Y neuronales cultivadas. Esta reducción en GSH fue impulsada por una reducción en la captación celular de cisteína, el precursor limitante de la velocidad para la síntesis de GSH. La exposición a BCM-7 también redujo la proporción de GSH reducido a GSH oxidado (disulfuro de glutatión) como marcador del estado redox, y la relación de S-adenosilmetionina a S-adenosilhomocisteína como marcador de la capacidad de metilación celular. Estos resultados indican que BCM-7 es un modulador potencial de GSH. (Deth *et al*, 2016).

En un estudio preliminar *in vivo* con conejos, se observó que el consumo de una dieta que contenía leche tipo A1, se asoció con concentraciones disminuidas de cisteína en el íleon y concentraciones disminuidas de GSH en sangre, hígado y cerebro en comparación con el consumo del tipo A2 ( Deth, 2016).

El Glutatión (GSH) es un tripéptido glutatión (GSH,  $\gamma$ -L-glutamyl-Lcisteinilglicina), se sintetiza en el citoplasma de las células por la acción consecutiva de dos enzimas:  $\gamma$ -glutamyl-cisteina ( $\gamma$ -GluCys) sintetasa (también conocida como glutamato cisteína ligasa,



GCL por sus siglas en inglés) que utiliza glutamato y cisteína como sustrato para formar el dipéptido  $\gamma$ -glutamilcisteína, el cual es combinado con la glicina en una reacción catalizada por la glutatión sintetasa para formar GSH. (Quezada, 2002; Jefferies, 2003; Lu, 2008) Las alteraciones en el GSH y la homeostasis redox contribuyen a los procesos fisiopatológicos que conducen a enfermedades neurodegenerativas (McBean, 2015) pancreatitis (Pérez *et al.*, 2015) y enfermedades asociadas con la diferenciación celular anormal (Ye *et al.*, 2015). Por lo tanto, mantener el equilibrio redox es importante en el contexto de la prevención de enfermedades.

En un estudio dirigido por Deth (2016) se realizó un estudio aleatorio cruzado al azar, donde a un grupo de personas de China, que normalmente consumían leche, se les proporcionó leche comercial del tipo A2 para comparar los efectos contra la leche del tipo A1/A2. El estudio consistió en 8 semanas de consumo de leche en 2 fases (A2 a A1/A2 y de A1/A2 a A2) con 2 semanas de descanso entre cada tratamiento. Se obtuvieron muestras de sangre 3 horas después del consumo de la leche para la medición de la BCM-7 y GSH. Los resultados obtenidos mostraron que el consumo de leche tipo A2 aumenta los niveles de GSH en plasma, en comparación de la leche del tipo A1/A2. La media  $\pm$  error estándar del cambio promedio en las concentraciones de GSH desde el inicio fue de  $4.01 \pm 0.61$  nmol / mL para leche que contiene A2-caseína comparada con  $1.99 \pm 0.50$  nmol / mL para leche que contiene ambos tipos de  $\beta$ -caseína. Durante la fase de descanso se encontraron niveles basales de GSH en sangre, a pesar de no consumir leche de ningún tipo, lo cual indica que el GSH está presente naturalmente en sangre en niveles muy bajos actuando como antioxidante.

En ganado bovino, Umbach *et al.*, (1985), demostraron la presencia de inmunoreactividad a la BCM-7 en la sangre de becerros recién nacidos después de la ingestión de leche; sin embargo, hasta la fecha no existen reportes de los posibles efectos de este péptido en el organismo de los bovinos. Los autores encontraron que la BCM-7 inmunoreactiva (BCM-7ir) se podía cuantificar en sangre entre las 2 y 4 horas posteriores a la ingesta de la primera leche y es resistente a la degradación enzimática a 37°C. No pudo ser cuantificada en 4 de las muestras analizadas, esto lo atribuyen a la rápida absorción gastrointestinal y a las concentraciones del material del plasma. Los autores



concluyen que así como otras casomorfina pueden tener funciones en el sistema nervioso central y algunos oligopéptidos penetran en la corteza cerebral, la BCM-7ir podría tener la oportunidad de penetrar en el cerebro para posiblemente liberar BCM-7 o fragmentos de la misma y podría tener funciones neuronales, específicamente en la adaptación al estrés y al entorno social.



### 3. JUSTIFICACIÓN

La leche es el alimento primordial de los becerros recién nacidos. Un componente principal de este alimento es la proteína dentro de las cuales la  $\beta$ -caseína ha sido ampliamente estudiada debido a que una de sus variantes la A1, produce el péptido bioactivo BCM-7.

BCM-7 es un péptido opioide exógeno (exorfina) que puede potencialmente activar receptores opioides en todo el organismo. Los receptores opioides, son reguladores muy importantes de los procesos de señalización en el tracto intestinal, sistema inmune y sistema nervioso central, de ahí que numerosos estudios en modelos animales así como estudios epidemiológicos han demostrado las implicaciones del consumo de la leche A1 y de la BCM-7, en enfermedades gastrointestinales, diabetes, así como en esquizofrenia y autismo.

En el ganado de carne la nutrición del becerro es de primordial importancia, ya que la cantidad de proteínas ingeridas durante su vida influye directamente en el incremento de tejido muscular y en una posterior ganancia de peso, lo cual resulta en una mayor producción de carne para la venta (Martínez-Velázquez, 2012).

Los efectos de la leche A1, que produce el péptido bioactivo  $\beta$ -casomorfina 7 (BCM-7) derivado de la  $\beta$ -caseína, no han sido estudiados en bovinos, sin embargo, dados los efectos reportados en la literatura en otras especies animales incluyendo el humano, en este trabajo se propuso explorar las implicaciones fisiológicas y productivas del consumo de la leche que produce el péptido BCM-7 (leche A1 y A1/A2) en animales de la raza cárnica Charolais.



#### **4. HIPÓTESIS**

Es posible que los becerros alimentados con leche que contenga la variante A1, producirán el péptido BCM-7, el cual podrá tener efectos fisiológicos y productivos.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. GENERAL**

Determinar el efecto del consumo de la leche A1 sobre niveles de glutatión, el temperamento y peso al destete en becerros de la raza Charolais.

##### **5.2. ESPECÍFICOS**

1. Identificar el tipo de leche que produce una población de vacas de la raza Charolais.
2. Evaluar los efectos fisiológicos y productivos del consumo de leche A1 y A2 en becerros.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Población de estudio

Se diseñó un estudio para determinar la frecuencia de las variantes de leche A1 y A2 en vacas y para determinar el efecto del consumo de la leche de las variantes determinadas sobre indicadores fisiológicos y productivos en sus becerros. La raza Charolais fue estudiada por disponibilidad de las muestras, tanto en la Facultad de Agronomía de la UANL como en el Biobanco del LBA CBG-IPN. Para esto se consideraron dos grupos de muestreo:

El primero (Grupo Becerros) incluyó treinta y ocho vacas de la raza Charolais, preñadas, del hato perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), campus Marín y quince crías de estas vacas fueron incluidas en los análisis fisiológicos y productivos, para lo cual, se tomaron muestras de sangre de la vena yugular al nacimiento (antes de la primera toma de leche de la madre) y a los 3 meses.

El segundo banco (Grupo Familias vacas-crías) se obtuvo del Biobanco del Laboratorio de Biotecnología Animal (LBA) del CBG-IPN y constó de 108 muestras de pelo de vacas de la raza Charolais provenientes de cinco hatos localizados en los estados de Nuevo León, Tamaulipas y Sonora, cuyas crías fueron identificadas y de las cuales se obtuvieron los datos productivos de peso al destete.

### 6.2. Identificación molecular de los subtipos de $\beta$ - caseína

#### 6.2.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó de muestras de fólculo piloso usando el Kit comercial GenElute Mammalian Genomic DNA Kit (Sigma, St. Louis, Missouri), usando las recomendaciones del fabricante. Brevemente:

1. Pasar 50 fólculos a un tubo eppendorf de 1.5ml.
2. Adicionar 180  $\mu$ l de solución de lisis T (B6678) Y 20  $\mu$ l de proteinasa K, mezclar al vortex por 15 seg.
3. Incubar a 55°C por 4 horas (Digestión)





4. Adicionar 200  $\mu$ l de solución de lisis C (B8803); mezclar al vortex por 15 seg.; incubar a 70°C por 10 minutos.
5. Agregar 20  $\mu$ l de RNasa, mezclar e incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
6. Adicionar 500  $\mu$ l a la columna nueva y centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto, descartar la solución.
7. Adicionar 200  $\mu$ l de etanol a la columna y llevar al vortex por 20 segundos.
8. Transferir a la columna el lisado + etanol del paso anterior y centrifugar a 6,500 rpm por 1 minuto.
9. Transferir la columna a un nuevo tubo y adicionar 500  $\mu$ l de solución de lavado y centrifugar a 6,500 rpm por 1 minuto.
10. Transferir la columna a un tubo nuevo y adicionar nuevamente 500  $\mu$ l de solución de lavado y centrifugar a 12,000 rpm por 3 minutos para secar la columna.
11. Transferir la columna a un nuevo tubo y adicionar 200  $\mu$ l de solución de elusión y centrifugar a 6,500 rpm por 1 minuto.
12. Secar en el savant y resuspender en 40  $\mu$ l de solución de elusión final.

Después de la extracción de ADN se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1.5% a 110V por 30 minutos. El marcador de peso molecular utilizado fue el  $\lambda$ DNA de 10ng, el colorante fue SYBR green.

La visualización del gel se realizó por medio del Fotodocumentador Kodak Gel Logic 112. Se cuantificó la concentración de ADN de cada una de las muestras por medio del software Kodak Molecular Imaging Software v.5.0.1.27 de Carestream Health Inc.

### 6.2.2. Asignación alélica

Las vacas se genotipificaron mediante ensayos de discriminación alélica mediante la técnica Q-PCR, para detectar el cambio aminoacídico en la posición 67 en el gen de la  $\beta$ -caseína, lo que permite distinguir los alelos A1 y A2.

Estos ensayos se basan en un ensayo fluorogénico de nucleasa 5', el cual permite identificar el SNP utilizando dos sondas marcadas con fluoróforos diferentes; por ejemplo una sonda marcada con el fluoróforo VIC que identifica al alelo 1 ó el alelo sin la mutación. La otra sonda marcada con FAM, identifica al alelo 2 ó el alelo mutado. Ambas señales de las sondas (VIC y FAM) indican la presencia de los dos alelos, es decir los genotipos heterocigotos para la característica (Livak et al., 1999)

En el cuadro 4 se muestran las sondas y primers diseñados, sintetizados por la casa comercial AppliedBiosystems, para la detección del cambio aminoacídico que genera el tipo de leche A1 y A2.

**Cuadro 4. Secuencias de sondas y primers para la amplificación de la  $\beta$ -caseína A1 y A2.**

	Sentido	Secuencia
<b>PRIMERS</b>	Forward	CCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCC
	Reverse	GGTTTGAGTAAGAGGAGGGATGTTT
<b>SONDAS</b>	VIC	CCCATCCATAACAGCC
	FAM	CCATCCCTAACAGCC

Para la amplificación del SNP se utilizó el siguiente perfil: un ciclo de 2 min a 50°C, seguido de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de dos pasos a 92°C por 15 seg y 60°C por 1 min en el Termociclador Tiempo Real de Light Technologies modelo 7500 . Para el análisis de los genotipos se atizará el programa ABI Prism 7500 (Real-Time Sequence Detection Software).

La prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó con el Software Genepop on the Web de Raymond. & Rousset (1995) (<http://genepop.curtin.edu.au/>).



## 6. 3. Análisis de los efectos fisiológicos y productivos en el grupo Becerros

### 6.3.1. Análisis de los efectos fisiológicos

#### A) Medición de GSH

A partir de muestras de plasma de los becerros al nacimiento y a las 12 semanas de edad se procedió a la medición de GSH. Se siguió el protocolo del Kit comercial DetectX Glutathione (K006-H1) de Arbor Assays. La preparación de reactivos y estándares se muestran en los Apéndices A y B.

#### 6.3.1.1. Preparación de la muestra para almacenaje previo al ensayo (Proceso de desproteinización y oxidación leve):

1. Preparar solución de SSA al 5%. (Apéndice A)
2. Dejar descongelando a temperatura ambiente el plasma con anterioridad al ensayo (Si las muestras estaban a  $-20^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente este proceso demora de 30 a 40 minutos)
3. A  $400\mu\text{L}$  de plasma descongelado se le añaden  $400\mu\text{L}$  de la solución de SSA al 5% (proporción 1:1).
4. Incubar a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.
5. Centrifugar a  $14,000\text{rpm}$  por 15 minutos en la centrífuga refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$ .
6. Recuperar el sobrenadante en alícuotas de  $100\mu\text{L}$  cada una (4 tubos)
7. Almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$  en criobox etiquetado.

Cuando el ensayo se vaya a llevar a cabo, las muestras deben ser diluidas hasta 0.5% de SSA, es decir,  $10\mu\text{l}$  de muestra desproteinizada por  $90\mu\text{l}$  de Buffer de Ensayo.



### 6.3.1.2. Ensayo para detección de Glutación

#### A) Protocolo De Ensayo - Punto Final

Para el glutación total se utilizaron los estándares (Apéndice B) y las muestras diluidas con Buffer de Ensayo como se describe anteriormente

1. Use la hoja de diseño de la placa para ayudar en la muestra y el patrón adecuado para identificación.
2. Pipetear 50 $\mu$ L de los estándares tratados o sin tratar en pocillos duplicados en el plato.
3. Pipetear 50 $\mu$ L de diluyente de la muestra en pocillos duplicados como el estándar Cero.
4. Añadir 25 $\mu$ L del reactivo de detección colorimétrica a cada pocillo usando una pipeta repetidora.
5. Añadir 25 $\mu$ L del mix de reacción a cada uno de los pocillos usando una pipeta repetidora.
6. Golpear suavemente los lados de la placa para asegurar la mezcla adecuada de los reactivos.
7. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
8. Leer la densidad óptica a 415 nm. Estos datos se utilizan para determinar ya sea el glutación oxidado la concentración de glutación total.

#### B) Protocolo De Ensayo: Cinética

1. Llevar a cabo pasos 1-5 anteriores.
2. Golpear suavemente los lados de la placa para asegurar la mezcla adecuada de los reactivos.
3. Añadir 25  $\mu$ L del mix de reacción a cada uno de los pocillos usando una pipeta repetidora.



4. Inmediatamente colocar la placa en el lector y leer la densidad óptica a 415 nm cada minuto durante al menos 10 minutos. Esos datos serán utilizados para determinar la concentración total o glutatión oxidado cinéticamente.

### 6.3.1.3. Cuantificación del glutatión

Como anteriormente se mencionó en el ensayo de cinética, el ensayo se realizó por lo menos 10 veces (1 vez cada minuto), se calculó el promedio de cada medición obtenida por pocillo y se realizó una base de datos con los datos obtenidos.

- I. Para la cuantificación del glutatión se utilizaron 2 programas online para la linearización de los estándares y la determinación de la concentración de las muestras My Assays (Arbor Assays, [www.myassays.com](http://www.myassays.com)): Se selecciona el análisis cuantitativo 4PL (Logístico de 4 parámetros) en donde se introdujeron los promedios de los datos crudos de absorbancia de cada pocillo, obtenidos del lector de ELISA (Microplate Reader iMark de BioRad). Se diseña virtualmente la placa, tal cual se trabajó en el lector de ELISA, colocando los blancos, los estándares y las muestras. Posteriormente se declaran las concentraciones de los estándares y el factor de dilución de las muestras, se nombran las muestras y se corre el análisis. Se obtienen unas bases de datos, de las cuales se presenta la Curva Típica de los estándares de acuerdo al 4PL y el resultado de la cuantificación del glutatión y otros datos adicionales. Si algún parámetro aparece subrayado en amarillo significa que el resultado se encuentra por fuera del rango de ajuste de la curva.
- II. My Curve Fit Beta (My Assays Ltd. [www.mycurvefitbeta.com](http://www.mycurvefitbeta.com)): En este programa se introducen exclusivamente los promedios de cada uno de los 6 estándares, para lo anterior con los promedios previamente obtenidos se vuelven a promediar para obtener un solo dato por estándar. El resultado de cada estándar se introduce en el eje de las X y en el eje de las Y se introduce la concentración de cada estándar y se corre el programa. Se obtiene un gráfico, el cual puede ser modificado por diferentes métodos de ajuste, para este caso el 4PL y para comprobar la linealidad de la curva obtenida con el programa anterior se utiliza una regresión lineal.



### **6.3.2. Análisis de los efectos productivos**

#### **6.3.2.1. Velocidad de salida**

La evaluación del temperamento se realizó por medio de la metodología de la velocidad de salida (EV), propuesta por Burrow (1991).

Para este caso se utilizó un equipo con sensores de infrarrojos (FarmTek, Inc., North Wylie, TX, EE. UU.) que se colocaron con 1.83m de separación dentro del corral de manejo. Los animales fueron pasando uno por uno por el corral con un estímulo previo y se anotó el tiempo (en segundos) que cada animal tardó en recorrer los sensores.

El resultado obtenido por los sensores se anotó y con esos datos se obtuvo la velocidad de salida, que se calcula como m/s.

#### **6.3.2.2. Pruebas de comportamiento (A y B)**

El comportamiento fue medido de acuerdo al protocolo de sujeción de Boissy y Bouissou (1988), donde primeramente se separaron a los animales para muestreo del resto de sus compañeros y madres, y cada uno fue lazado y videograbados por separado, con las siguientes situaciones:

- a) 4 minutos con el lazo estirado.
- b) 4 minutos con el lazo relajado.

Se registró el tiempo (en segundos) que cada animal tuvo movimiento exclusivamente de las patas (delanteras y traseras). Este procedimiento se realizó a las 3 semanas de nacidos y a los 3 meses de edad.

Los videos fueron revisados por 3 evaluadores, 3 veces en una semana (con un día de intervalo), para asegurar la confiabilidad de los datos. Los datos recopilados sobre el movimiento de las patas de los becerros, se dividieron en 5, de acuerdo al máximo de movimientos reportados para cada prueba, de esta manera fueron catalogados en una escala del 1 al 5 (la escala es diferente para la prueba A y B, por el desplazamiento de los becerros en cada prueba), como se puede observar en el Cuadro 5.

**Cuadro 5. Escala diseñada para medir el temperamento, para cada una de las edades analizadas. Se describe de acuerdo al número de movimientos (MOV.) de las patas en el becerro.**

3 semanas				12 semanas			
Prueba A		Prueba B		Prueba A		Prueba B	
Escala	Mov.	Escala	Mov.	Escala	Mov.	Escala	Mov.
1	0-13	1	0-11	1	0-4	1	0-2
2	14-26	2	12-23	2	5-8	2	3-5
3	27-39	3	24-35	3	9-11	3	6-8
4	40-52	4	36-47	4	12-14	4	9-11
5	53-65	5	48-60	5	15-18	5	12-15

Los resultados de las pruebas A y B de los evaluadores fueron analizados mediante el Alpha de Cronbach con el objetivo de determinación de la confiabilidad entre los datos obtenidos entre las mediciones de los observadores

El coeficiente  $\alpha$  fue propuesto en 1951, por Cronbach como un estadístico para estimar la confiabilidad de una prueba, o de cualquier compuesto obtenido a partir de la suma de varias mediciones. Este coeficiente estima al evaluar la consistencia interna del conjunto de ítems o partes del compuesto; en este sentido, se corresponde con un coeficiente de equivalencia y, por lo tanto, estima la varianza que en los puntajes observados corresponde a factores comunes de los diferentes ítems (Lord, 1955).

$$\alpha = \frac{n}{n-1} \frac{\sum_{k=1}^n \sum_{h=1}^n \sigma_{k,h}}{\sigma_X^2}; \quad \forall h \neq k$$

Dónde: n es el número de partes, k y h son partes sobre las que se calcula el estadístico.

Este coeficiente tiene una escala de 0 al 1, entre más alto el valor, mayor es la confiabilidad de los datos.

### 6.3.2.3. Peso al destete



Para el grupo de becerros analizados se tuvo el seguimiento desde su nacimiento hasta su destete, por lo que se recopilaron los pesos al nacimiento, pesos al destete y la ganancia diaria de peso (GDP), calculada como  $(PD-PN)/DD$  (Ver Abreviaturas). El destete se realizó a los 205 días después del nacimiento, y el ajuste del PD se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:  $\left(\frac{PD-PN}{DD} * 205\right) + PN$  (Ver Abreviaturas).

Los datos recopilados para pesos al destete para el Grupo Becerros se encuentran en el Anexo D.

#### **6.4. Análisis de los efectos productivos en el grupo Familias vacas-crías**

De acuerdo al banco de muestras provenientes del Biobanco del Laboratorio de Biotecnología Animal del CBG-IPN se formaron familias vaca-cría considerando el genotipo de las vacas y para cada cría se obtuvo información sobre el sexo de la cría, peso al nacimiento (PN), peso a destete (PD) ajustado a 205 días, días al destete (DD) y la edad de la vaca al momento del parto (Apéndice E). Para este grupo, se analizaron los 3 genotipos, ya que al tener un mayor número de muestra, éstos se encontraban más distribuidos en la población.

#### **6.5. Análisis de Asociación**

##### **6.5.1. Grupo Becerros**

Para realizar la asociación de los datos obtenidos de las pruebas de temperamento (A y B y EV), se realizaron pruebas no paramétricas, debido a que los datos no mostraban una distribución normal; por lo que se realizó la prueba de Mann-Whitney para las pruebas de temperamento.

Para el análisis de asociación entre GSH con el tipo de leche y el PD con el tipo de leche se realizó el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) y se ajustaron los siguientes modelos lineales:





### 6.5.1.1. Asociación de GSH y el tipo de leche

Para examinar el efecto del genotipo sobre la concentración de GSH se ajustó el siguiente modelo:

$$\gamma_{ij} = \mu = G_i + Ssexo_j + \beta_1GSH_0 + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$\gamma$ = Concentración de GSH

$\mu$ = Media general

$G_i$ = Efecto del i-ésimo genotipo (A1, A1/A2 y A2)

$\beta_1GSH_0$ = Covariable lineal de la concentración de GSH al nacimiento

Sexo= Efecto del j-ésimo (sexo del becerro)

$\varepsilon$ = residual

### 6.5.2. Grupo Familias Vacas-Crías

#### 6.5.2.1. Asociación de PD y el tipo de leche

Para examinar el efecto del genotipo sobre peso al destete se ajustó el siguiente modelo.

$$\gamma = \mu = G_i + \beta_1PN + \beta_2DD + \varepsilon$$

Donde:

$\gamma$ = Peso al destete

$\mu$ = Media general

$G_i$ = Efecto del i-ésimo genotipo (A1, A1/A2 y A2)

$\beta_1PN$ = Covariable lineal del Peso al nacimiento

$\beta_2DD$ = Efecto del j-ésimo (días al destete)

$\varepsilon$ = residual

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Frecuencia del alelo A1 en la población Charolais estudiada

Las frecuencias alélicas del grupo analizado se muestran en el cuadro 6, donde se puede observar que el alelo C, que es el que predomina, por lo que se puede esperar que la leche del tipo A2 y la A1/A2 sean encontradas en mayor frecuencia en la población analizada. De igual manera las frecuencias genotípicas para la leche tipo A1/A2 y A2 es más alta que para la A1, la frecuencia absoluta se describe en el Cuadro 6. La prueba Hardy-Weinberg mostró que la población se encuentra en equilibrio genético.

**Cuadro 6. Frecuencias alélicas y genotípicas de las vacas analizadas en los dos grupos de estudio**

Frecuencia alélica		Frecuencia genotípica		
p (A)	q (C)	A1	A1/A2	A2
0.391	0.609	0.15 (22)	0.48 (70)	0.37 (54)

### 7.2. Evaluación del efecto de la leche A1 en el grupo de Becerros

De acuerdo al genotipo de la vaca (Apéndice C), los nueve becerros incluidos en este estudio (5 hembras y 4 machos) se clasificaron en dos grupos: el grupo 1, que incluyó aquellos que se alimentaron de leche A1 y leche A1/A2, y el grupo 2, que incluye los becerros que consumen la leche de tipo A2.

#### 7.2.1. Efecto sobre la concentración de GSH en plasma

En el cuadro 7 se puede observar que las concentraciones de GSH en los becerros muestreados al nacimiento y a la semana 12 variaron de acuerdo al tiempo, en algunos casos disminuyeron y en otros aumentaron de la semana 3 a la 12 de edad.

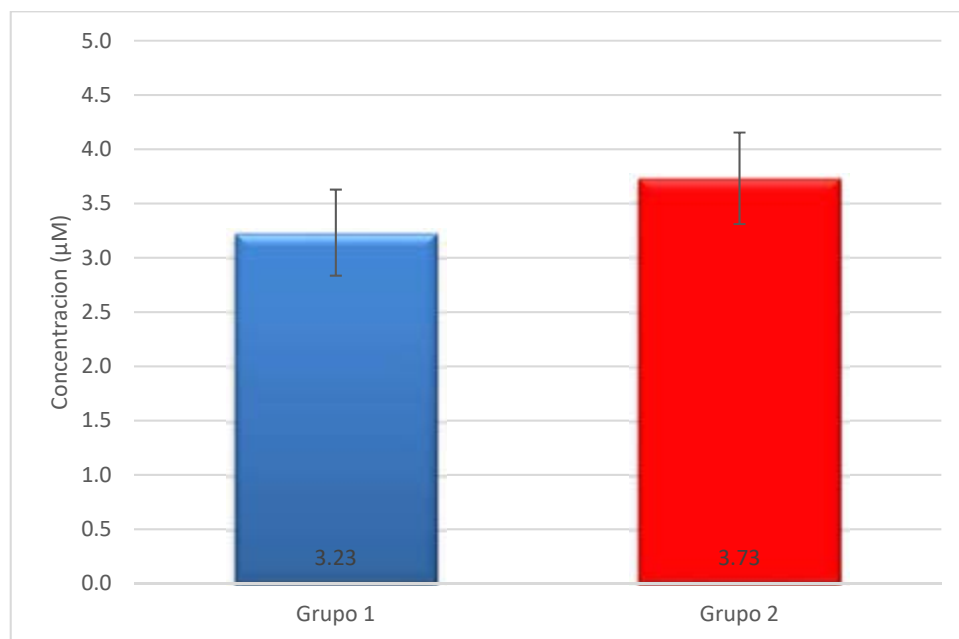
**Cuadro 7. Concentraciones de glutatión (GSH) de los becerros muestreados al nacimiento y a la semana 12 del Grupo Becerros.**

Becerro	Sexo	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	
		Nacimiento	Semana 12
1708	H	3.66	3.443
1709	M	3.44	2.48
1710	H	3.866	*
1711	H	2.334	3.197
1712	M	3.911	4.178
1713	H	3.262	*
1714	H	2.94	3.592
1716	H	2.96	3.875
1717	M	4.028	*
1718	M	2.88	3.448
1719	M	3.721	3.041
1720	H	3.968	*
1721	H	3.918	*
1802	M	3.586	*
1803	H	3.811	3.833
<b>PROMEDIO</b>		<b>3.485</b>	<b>3.454</b>

\*No se obtuvo muestra para el análisis, debido a que el animal murió o causó baja en el hato. H=hembra, M=macho.

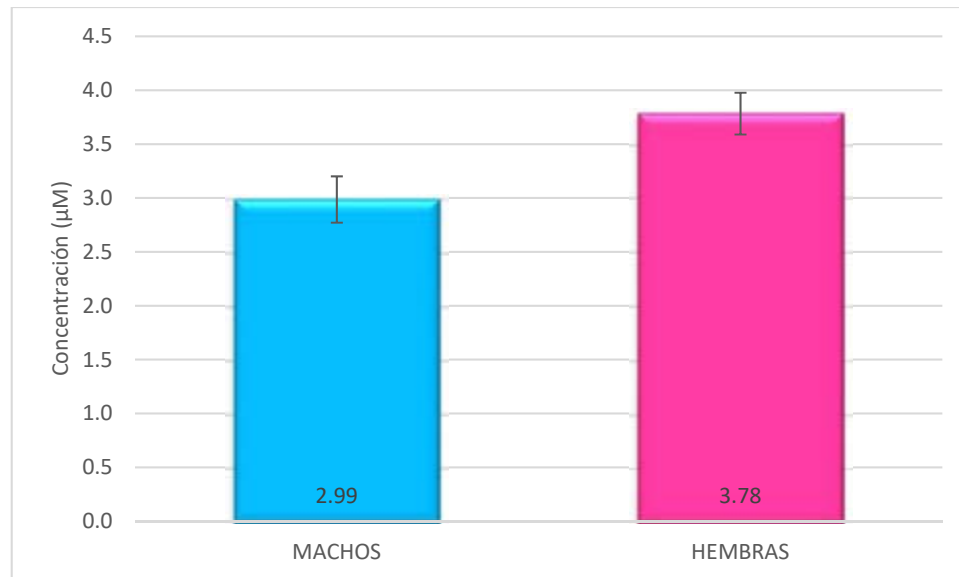
En el cuadro 7, se puede observar que el GSH tiene variaciones en los 2 tiempos muestreados, esto puede atribuirse a diversos factores tanto ambientales como genéticos, pero se sienta el precedente de que los niveles basales de GSH en el Grupo Becerros se encuentran en concentraciones de  $3.49 \pm 0.91 \mu\text{M}$  en becerros de la raza Charolais. Para el caso de los 2 grupos analizados, para el grupo 1 la concentración de GSH fue de  $2.83 \pm 0.70 \mu\text{M}$  y  $3.02 \pm 0.88 \mu\text{M}$  para el grupo 2.

La concentración de GSH a la semana 12 para el grupo Becerros fue de  $3.45 \pm 0.64 \mu\text{M}$ . Para el grupo 1 fue de  $3.11 \pm 0.64 \mu\text{M}$  y para el grupo 2 fue de  $3.73 \pm 0.42 \mu\text{M}$ . La concentración del grupo 2 es mayor a la del grupo 1, lo cual indica que el GSH se ve influenciado por el tipo de leche que los becerros consumen, dando como resultado que la leche A2 aumenta los niveles de GSH en becerros a la semana 12, tal como lo indica la figura 3. El análisis estadístico mostró una asociación significativa ( $P=0.0425$ ) entre las concentraciones de GSH y el tipo de leche.



**Figura 3. Comparación de medias del grupo 1 y grupo 2 de acuerdo a las concentraciones de GSH a la semana 12. Se incluye el error estándar para ambos grupos.**

Adicionalmente, se encontró que el sexo de los becerros tiene un efecto significativo en la concentración de GSH a la semana 12 ( $P=0.046$ ). La concentración promedio de GSH en hembras es mayor en  $0.79\mu\text{M}$  que en machos (Figura 4).



**Figura 4. Comparación de medias por sexo para las concentraciones de GSH a las 12 semanas. Se incluye el error estándar para ambos grupos.**

## 7.2.2. Evaluación del efecto del consumo de la leche A1 sobre el temperamento

### 7.2.2.1. Evaluación objetiva

La evaluación de la velocidad de salida para el Grupo Becerros, mostró un promedio de  $1.945\pm 0.85$  m/s, mientras que para las 12 semanas la EV fue de  $1.273\pm 0.88$  m/s. De acuerdo con Burrow (1991), los animales con velocidades de salida  $\leq 1.9$  m/s son catalogados como dóciles. Por lo tanto, los becerros a las 3 semanas se pueden considerar con temperamento intermedio y a las 12 semanas como dóciles o tranquilos (Cuadro 8). En la comparación de medias para el grupo 1 y 2, se pudo observar que los del Grupo 1 tuvieron EV mayores a las del Grupo 2,  $1.38\pm 1.03$  m/s y  $1.25\pm 0.62$  m/s respectivamente.

El análisis estadístico mostró que no existe asociación significativa entre la EV y el tipo de leche que consumen los becerros a las 12 semanas de edad.

**Cuadro 8. Velocidad de salida para los becerros muestreados a las 3 y 12 semanas.**

Becerro	3	12
	semanas	semanas
	m/s	m/s
1708	2.990	3.364
1709	1.526	0.878
1710	2.675	*
1711	0.583	1.108
1712	1.052	1.670
1713	1.578	*
1714	2.859	0.838
1716	3.297	1.949
1717	2.282	*
1718	0.917	0.448
1719	1.625	0.747
1720	2.691	*
1721	2.229	*
1802	0.923	*
1803	*	0.453
<b>Promedio</b>	<b>1.945</b>	<b>1.273</b>

\*No se obtuvo muestra debido a que el animal murió o causó baja en el hato.

#### 7.2.2.2. Evaluación subjetiva

El coeficiente  $\alpha$  de Cronbach resultó ser mayor a 0.9 para las pruebas A y B, a las 3 y 12 semanas (Cuadro 9), lo que indica que las observaciones entre los tres evaluadores no son significativamente diferentes.

**Cuadro 9. Resultados del Alpha de Cronbach para las pruebas A y B a las 3 y 12 semanas.**

Semana 3		Semana 12	
pA	pB	pA	pB
0.938	0.934	0.976	0.962

Para la prueba de sujeción (Pruebas A y B) se contabilizaron diferentes cantidades de movimientos de las patas de los becerros (Ver Materiales y Métodos), por lo cual la escala del 1 al 5 es diferente para ambas pruebas a los 2 tiempos analizados.

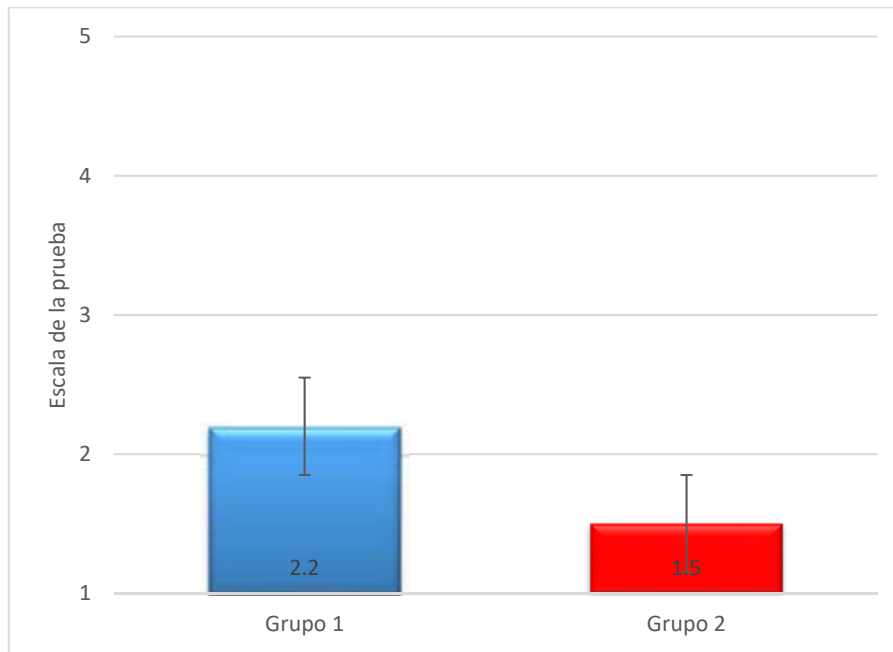
En el cuadro 10, se muestran los puntajes de la escala 1-5 y en donde se puede observar que para la prueba A (pA) a las 3 semanas, los becerros mostraron puntuaciones más bajas que a las 12 semanas, mientras que para la prueba B (pB) sucede lo contrario, las puntuaciones son más altas a la semana 3 que a la 12, por lo cual se puede inferir que es posible que el manejo de los animales influyó en los resultados de la prueba, ya que los animales se acostumbran al contacto y a la interacción con los humanos a través del tiempo, desde la semana 3 a la 12. Y también, por las diferentes formas de sujeción entre la pA y pB, se puede esperar diferente cantidad de movimientos de patas, lo cual se traduce en el puntaje de la escala 1-5.

**Cuadro 10. Resultados de las pruebas A y B a las 3 y 12 semanas.**

Becerro	3 semanas		12 semanas	
	pA	pB	pA	pB
1708	1	2	2	5
1709	1	2	5	3
1710	1	4	*	*
1711	1	1	1	2
1712	1	1	2	3
1713	2	3	*	*
1714	3	4	2	2
1716	3	3	1	3
1717	1	1	*	*
1718	1	1	1	1
1719	1	2	1	2
1720	5	3	*	*
1721	1	5	*	*
1802	3	5	*	*
1803	*	*	2	1
<b>PROMEDIO</b>	<b>1.79</b>	<b>2.64</b>	<b>1.89</b>	<b>2.44</b>
<b>D.E</b>	<b>1.21</b>	<b>1.39</b>	<b>1.20</b>	<b>1.17</b>

\*No se obtuvo muestra debido a que el animal murió o causó baja en el hato.

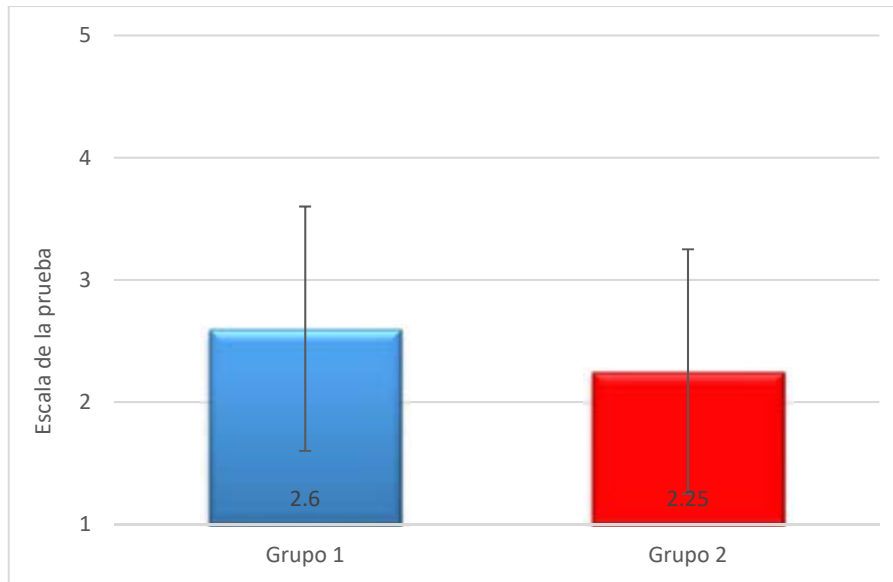
Para la prueba A (prueba de sujeción con lazo flojo) a las 12 semanas se tuvo una media para el grupo 1 de  $2.2 \pm 1.47$ , para el grupo 2 fue de  $1.5 \pm 0.50$ , tal como se muestra en la figura 5. Ambos grupos poseen valores menores a 3, por lo que pueden ser clasificados como animales mansos. De acuerdo a la prueba estadística de Mann-Whitney no existe asociación entre la pA12 y el tipo de leche que consumen los becerros.



**Figura 5. Comparación de medias del grupo 1 y el grupo 2 de acuerdo a la prueba A a las 12 semanas. Se incluye el error estándar para ambos grupos.**

Para la prueba B (prueba de sujeción con lazo apretado) a las 12 semanas se tuvo una media para el grupo 1 de  $2.62 \pm 1.35$ , para el grupo 2 fue de  $2.2 \pm 0.83$ , tal como se muestra en la figura 6. Ambos grupos poseen valores menores a 3, por lo que pueden ser clasificados como animales mansos. De acuerdo a la prueba estadística de Mann-Whitney no existe asociación entre la pB12 y el tipo de leche que consumen los becerros.





**Figura 6. Comparación de medias del grupo 1 y el grupo 2 de acuerdo a la prueba B a las 12 semanas. Se incluye el error estándar para ambos grupos.**

### 7.2.3. Pesos al Destete

La comparación de medias para los Pesos al Destete, indicó que el peso del Grupo 1 fue de  $216.75 \pm 13.91$  kg y para el Grupo 2 fue de  $219.98 \pm 32.35$  kg, mientras que la media aritmética general de PD para el grupo Becerros fue de  $218.19 \pm 25.41$  kg. Sin embargo, no se encontró asociación significativa entre el tipo de leche y el PD, para este grupo de becerros analizados.

### 7.3. Evaluación del efecto de la leche A1 en el grupo Familias Vacas-Crías

Para poder tener un mejor análisis de los PD se analizaron los PN, ya que éstos sirven de referencia para la ganancia de peso. Los PN tuvieron una media general de  $40.75 \pm 6.26$  kg, mientras que los PD205 tuvieron una media general de  $223.54 \pm 41.05$  kg.

Para el Grupo Familias Vacas-crías, se analizaron los 3 genotipos, ya que al contar con un mayor número de muestra, los genotipos se encontraban más ampliamente distribuidos en la población. La comparación de medias entre los tres grupos formados de acuerdo al tipo de leche producida por la madre de la cría, permitió observar que para el genotipo



que produce la leche A1 la media fue de  $224.015 \pm 41.24$  kg, para la leche A1/A2 la media fue de  $223.143 \pm 37.08$  kg, y para la leche A2 fue de  $222.83 \pm 46.49$  kg (Cuadro 11).

El análisis estadístico, mostro una asociación significativa ( $P=0.0477$ ) entre el tipo de leche A1 y PD.

**Cuadro 11. Media aritmética y desviación estándar para Pesos al Nacimiento (PN), Pesos al Destete Ajustado a 205 días (PD205) y la Ganancia Diaria de Peso (GDP) para los 3 genotipos analizados.**

Genotipo	PN (KG)	PD205(KG)	GDP (KG)
A1	$41.82 \pm 6.39$	$224.01 \pm 37.51$	$0.89 \pm 0.04$
A1/A2	$41.57 \pm 6.34$	$223.14 \pm 37.08$	$0.89 \pm 0.06$
A2	$39.16 \pm 5.69$	$222.83 \pm 46.29$	$0.90 \pm 0.03$

De igual manera en el cuadro anterior se puede observar que las GPD son distintas para los 3 genotipos, siendo que los becerros que consumieron leche A1 tuvieron mayores GPD, seguidos de los que consumieron leche A2, y los que tuvieron menores GDP fueron los que consumieron la mezcla de ambos tipos de leche, es decir, la leche tipo A1/A2.



## 8. DISCUSIÓN

La importancia de la nutrición y el bienestar que esta genera en los animales es evidente y representa uno de los aspectos más importantes que determinan la rentabilidad de las explotaciones ganaderas.

Existen diversos factores que afectan la nutrición de los becerros, entre los que destacan los componentes de la leche que consumen de su madre desde el nacimiento hasta el destete, así como la calidad de forraje y el uso de suplementos alimenticios y/o pastura.

La leche es un alimento primordial para el becerro, ya que desde su nacimiento a través del calostro le provee de inmunoglobulinas para el desarrollo de su sistema inmune, ayuda al desarrollo del rumen y posteriormente le provee de los nutrientes necesarios para la nutrición y desarrollo de la cría. Uno de los principales componentes de la leche son las proteínas, componentes indispensables para el desarrollo de tejidos, en especial el muscular (Guetouache, 2014).

Debido a su impacto en las propiedades tecnológicas de la leche, las proteínas, que incluyen a las caseínas y lactoglobulinas, han sido ampliamente estudiadas a diferentes niveles desde el bioquímico hasta el molecular. Toda la información generada sobre las proteínas de la leche ha tenido un gran impacto en las estrategias de mejoramiento genético donde se ha demostrado que las diferentes variantes alélicas que existen para estas proteínas se asocian con diferentes rasgos productivos de calidad y composición de la leche, información que ha sido incorporada dentro de las estrategias de selección y mejoramiento genético de las diferentes razas de ganado lechero. (Vega, 2002; Márquez *et. a.l.*, 2009; Poveda, 2013)

Sin embargo, como principal alimento del becerro en las primeras etapas de su desarrollo ha cobrado gran interés el conocer cómo afecta su calidad y composición en el desarrollo y bienestar de los becerros sobre todo en el ganado de carne, donde la leche no es una prioridad comercial. Para el ganado de carne cobra mayor importancia la nutrición desde etapas tempranas de la cría, ya que la cantidad de proteínas ingeridas durante su vida influye directamente en el incremento de tejido muscular y en una posterior ganancia

de peso, lo cual resulta en una mayor producción de carne para la venta (Martínez-Velázquez, 2012).

En este trabajo se estudió el efecto del consumo de leche con dos variantes alélicas en el gen de la  $\beta$ -caseína. El interés particular se centró en conocer los efectos de la variante A1, la cual, por su composición aminoacídica produce una serie de péptidos bioactivos dentro de los que se incluye el péptido BCM-7 ( $\beta$ -casomorfina-7). El estudio de este péptido, ha adquirido una gran importancia por el impacto demostrado en la salud humana consumidora de leche y productos lácteos de bovino, los efectos adversos incluyen dolor abdominal, inflamación y diarrea (Ho *et al.*, 2014), flatulencias, espasmos, dolor al evacuar e hinchazón (Jianqin *et al.*, 2016); problemas inmunológicos como una disminución de la Inmunoglobulina al nacer (Drackley, 2008); problemas metabólicos relacionados con la diabetes, ya que disminuye la insulina e incrementa el glucagón y también mejora el glucometabolismo (Yin, 2010); problemas neurológicos como esquizofrenia y autismo (Cade *et al.*, 2000).

Umbach *et al.*, 1985, demostraron la presencia de BCM-7 bovina en la sangre de becerros recién nacidos después de la ingesta de leche y una conclusión a la que los autores llegan es que la BCM-7 podría tener relación con el sistema nervioso y tener un efecto en el comportamiento ante el estrés y el entorno social y dado a que no existen reportes donde se corrobore dicha información, se propuso este trabajo, con el fin de explorar los efectos fisiológicos y productivos del consumo de la leche A1 en becerros de la raza Charolais.

### **8.1. Frecuencia del alelo A1 en ganado**

En el mundo se han dirigido muchos estudios para la determinación de las frecuencias alélicas de la  $\beta$ -caseína. Fatih (2018) realizó una revisión de los diferentes trabajos enfocados a describir la segregación alélica de las variantes de  $\beta$ -caseína, a partir de 1968 hasta 2004, en donde se incluyen razas bovinas cárnicas y lecheras. A diferencia de las razas lecheras donde se reportan frecuencias del alelo A1 entre 0.01 a 0.465, la frecuencia de A1 en razas cárnicas es muy alta y casi fija, por ejemplo, en la Angus es de 0.95, Black Pied de 0.97, Brahman de 0.99 y Hereford de 0.75.

En México, la frecuencia alélica del alelo A1 ha sido estudiada en diferentes razas de ganado lechero. Duifhuis-Rivera *et al* (2014) menciona que la frecuencia para A1 en la raza Holstein es de 0.41 y para A2 es de 0.59, Zepeda-Batista *et al* (2014) menciona que para la raza Jersey las frecuencias para A1 y A2 son 0.19 y 0.71, respectivamente. Para razas cárnicas se han llevado a cabo diversos estudios en el Laboratorio de Biotecnología Animal del CBG-IPN en donde se han estudiado razas cárnicas y de doble propósito. Los resultados muestran que la distribución del alelo A1 es menor a la reportada para algunas razas cárnicas, por ejemplo, en las razas Wagyu y Brangus Rojo, la frecuencia de A1 es de 0.19 y 0.14, respectivamente; mientras para que para razas como como Simmental y Charolais es de 0.37 y 0.27 (Gutiérrez, 2018).

En el presente trabajo se encontró una frecuencia alélica para la raza Charolais de 0.39 para A1 y 0.61 para A2, lo que concuerda con lo reportado por Keating (2007), que menciona una frecuencia alélica para A1 y A2 de 0.41 y 0.59 respectivamente.

Los diferentes estudios de asociación de los genotipos de  $\beta$ -caseína con rasgos productivos parecerían explicar la distribución alélica encontrada en las diferentes razas de ganado bovino. El alelo A2, más frecuente en ganado lechero, se ha asociado positivamente a la producción de grasa y porcentaje de caseína (Ng-KwaiHang *et al.*, 1986; Morales, 2014), las cuales son propiedades tecnológicas deseables en la leche y derivados lácteos, además de las su impacto favorable en la salud (que se han descrito entre otros, como ausencia de malestares digestivos hacia los consumidores humanos), estas propiedades han dirigido la selección artificial de este alelo en ganado lechero (Ho *et al*, 2014; Jianqin, 2016).

El alelo A1 se ha asociado favorablemente a producción de leche y proteína total (Aleandri *et al.*, 1990; Morris, 2005), las cuales también son características deseables en ganado lechero, sin embargo dada la frecuencia más alta de este alelo en algunas razas de ganado cárnico es posible inferir que la cantidad de la leche y proteína es deseable dentro de este tipo de ganado para la conversión alimenticia en los becerros (Martínez-Velázquez, 2012), sin embargo, dado el efecto esperado del alelo A1 por la formación del péptido bioactivo BCM-7, el cual se ha demostrado que se produce en becerros (Umbach, 1985), es importante determinar si tiene algún efecto a nivel fisiológico y productivo,



evaluando en el primer caso cambios en la concentración de Glutación (GSH) en plasma de grupos de bovinos clasificados de acuerdo al tipo de leche que consumían, y a nivel productivo evaluando el efecto del temperamento y peso al destete.

## **8.2. Evaluación del efecto de la leche A1 en el Grupo Becerros**

### **8.2.1. Concentración de Glutación (GSH) en plasma**

En este trabajo se encontró que la concentración de GSH fue mayor en los becerros que consumen el tipo de leche A2 que los que consumen leche que contiene el alelo A1, tanto en los niveles basales, es decir, al nacimiento, previo al consumo de leche de su madre como a la semana 12 posterior al nacimiento, lo que coincide con los diferentes estudios *in vivo e in vitro*, en los que también se ha demostrado que el consumo de la leche bovina A1, produce una reducción de las concentraciones sistémicas de Glutación (GSH), vía la inhibición del consumo de cisteína por la presencia del péptido bioactivo BCM-7 (Deth, 2016). A nivel productivo, este resultado podría tener implicaciones importantes ya que permiten inferir que los becerros que consumieron leche tipo A2 tiene mayor protección ante los radicales libres y dado la función antioxidante y opioide del GSH, podrían ser menos propensos a enfermedades, lo cual frecuentemente es motivo de baja en el rendimiento productivo del animal.

El glutación (GSH) es una proteína benéfica en todas las células del cuerpo, tiene diferentes funciones, todas relacionadas con el óptimo funcionamiento del organismo por su actividad antioxidante y desintoxicante (Kim, 2011). El GSH no se requiere en la dieta de los animales, pero es sintetizado en prácticamente todas las células animales por la acción secuencial de dos enzimas:  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa y GSH sintetasa. En humanos, la reducción de las concentraciones de GSH se ha asociado a una gama de enfermedades, incluyendo neurodegenerativas, cardiovasculares, enfermedades pulmonares, inmunes e inflamatorias. Mientras que, en animales, se ha implicado en una disminución en la energía, mayor inflamación, daños celulares y una resistencia debilitada a diversas enfermedades (Kim, 2011).



A pesar de su impacto en el bienestar general del organismo, en bovinos hay pocos estudios enfocados a evaluar el efecto de la reducción o aumento de las concentraciones de GSH. Kidwell (1955) no encontraron correlación entre las concentraciones de GSH en sangre de animales de la raza Hereford con su crecimiento y talla corporal. Por su parte, Mabon (1969) determinó en seis terneros de Ayrshire que no hubo relación entre el peso ganado y el nivel de glutatión medido desde el nacimiento hasta las 12 semanas, sin embargo, encontró una relación positiva y significativa entre la diferencia en los niveles de glutatión desde la primera a la duodécima semana de vida, y la proporción de alimento consumido a peso ganado. Más recientemente, se ha estudiado el papel del GSH, como suplemento para aumentar la resistencia a estrés y enfermedades. Kim *et. al* (2011) encontraron que la suplementación de GSH en bovinos de poca edad puede resultar benéfico para la reducción de las frecuencias de diarreas y enteritis; Chun-Nam *et al.*, (2018) corroboraron que el GSH es un auxiliar en el tratamiento de la fiebre aftosa bovina, más que nada en la respuesta inflamatoria y reducción de estrés en los animales al ser vacunados contra esta enfermedad, ayudando a disminuir el cortisol y el Factor Alfa de Necrosis Tumoral. Hidaka *et al*, (2018) realizó una investigación sobre producción de embriones de la raza Negro japonés en cultivo rico en GSH y determinó que en presencia de GSH los embriones tienen un mejor desarrollo, y llega a la conclusión de que el GSH tiene una función muy importante en la división celular y una función antioxidante muy fuerte.

Debido a que en nuestro estudio solo se midieron las concentraciones de GSH y no las de cisteína, no podemos afirmar que el consumo de la leche A1 es el único factor responsable de la disminución de las concentraciones de glutatión en el grupo de becerros alimentados con leche A1 o A1/A2; sin embargo, los estudios reportados permiten hacer esa inferencia y formular preguntas para futuros trabajos que permitan confirmar el efecto en los becerros, sobre todo en los hatos y razas en las que la frecuencia de este alelo es muy alta. En particular, es también muy importante que se defina una estrategia para determinar la concentración de BCM-7 en los animales de estudio, específicamente se debe confirmar la formación de BCM-7, por lo que es importante tomar muestras de suero antes y después de la primera ingesta de leche. Existen muchos reportes sobre las metodologías para la detección de BCM-7, por ejemplo los inmunoensayos (Umbach,

1985) y HPLC (Umbach, 1985; Cesuriska, 2007; Jarmołowska, 2007) de los cuales se puede elegir la metodología adecuada para cada modelo de estudio.

Interesantemente, en este trabajo también se encontró que hubo una diferencia significativa entre las concentraciones de GSH entre hembras y machos, esto puede atribuirse a un retardo en la activación del cromosoma X. Un estudio realizado con embriones bovinos por Viña (2004), determinó que al existir dicha inactivación se duplica la actividad de los genes dando lugar a una sobreexpresión de glutatión peroxidasa y Mn-superóxido, por lo tanto, se produce una mayor protección contra el estrés oxidativo en hembras que en machos. También existe una relación entre la cantidad de GSH producido en mayor cantidad por las mitocondrias aisladas de ratas hembras que en las de machos descrito por Jefferies (2003), ya que las hembras producen la mitad de los peróxidos y radicales libres, por lo tanto, el glutatión peroxidasa no cumple totalmente su función y el GSH no se convierte a Glutatión oxidado (GSSG), lo que determina que en los machos exista un mayor estrés oxidativo que en las hembras.

### 8.2.2. Temperamento

Los grupos de becerros alimentados con los tipos de leche A1 y A2, se evaluaron con dos pruebas de temperamento, una objetiva y una subjetiva; en ninguno de los casos se observó efecto significativo entre el temperamento medido a las 12 semanas y el tipo de leche que consumieron los becerros.

El péptido bioactivo BCM-7 derivado de la  $\beta$ -caseína A1, se ha clasificado como un péptido con actividad opioide que ha mostrado actividad substancial en los ensayos de unión a receptores Mu (Brant, *et. al.*; 1981; Teschemacher, *et al.*, 1997). Los sistemas opioidérgicos de mamíferos constan de receptores de opioides y sus ligandos, los péptidos opioides. Su importancia fisiológica radica en las funciones reguladoras neuroendocrinas. Los receptores opioides pertenecen a una familia acoplada a Proteínas-G, y se localizan en los sistemas nervioso, endocrino e inmune, así como en el tracto intestinal del organismo de los mamíferos y puede interactuar compuestos opioides tanto endógenos como con exógenos (Haq, *et al.*2014).



Una de las funciones de los sistemas opioides endógenos del cerebro es la modulación del comportamiento social (Panksepp *et al.*, 1984). Estos antecedentes han fundamentado el estudio del efecto de BCM-7 sobre diferentes rasgos de comportamiento. En humanos, el consumo de  $\beta$ -caseína A1 en la leche, se ha asociado al aumento en la gravedad de los síntomas asociados con esquizofrenia y autismo, estos efectos se atribuyeron a la actividad opioide de la BCM-7 y al estrés oxidativo (Cade, 2000; Allison y Clarke, 2006). Teniendo en cuenta la posibilidad de que el consumo de los opioides derivados de la leche A1 podrían contribuir a los vínculos emocionales positivos de organismos jóvenes a sus entornos sociales, Panksepp *et al.*, 1984, realizaron un estudio con el objetivo de determinar la eficacia de diferentes casomorfina incluyendo BCM-7, en la modulación de las vocalizaciones de socorro inducidas por la separación, en pollos de granja jóvenes. Los autores encontraron que el estrés por la separación se puede disminuir sistemáticamente con los opioides de leche y encontraron que el tratamiento con BCM-7 tiene una acción más prolongada que las casomorfina más cortas (BCM-5 y BCM-4).

En bovinos el temperamento es una característica que se busca mejorar en el sector ganadero para obtener mayor productividad del animal, disminuir costos y evitar incidentes con sus manejadores y otros animales del hato (Adamczyk *et al.*, 2013). El temperamento se ve afectado por distintos factores como la edad, el sexo, la raza, el manejo y la experiencia (Broucek *et al.*, 2008), también por el miedo (Boissy, 2005), lo que determina la reactividad ante situaciones que enfrenta el animal (Grignard *et al.*, 2001). Hasta el momento no se han reportado estudios que relacionen a la nutrición como un factor que afecta esta característica en bovinos, sin embargo se ha comprobado que los alimentos son un factor ambiental muy importante ya que se ha demostrado que estos tienen efecto a nivel molecular (Fatih, 2018), y recientemente ha cobrado importancia en la definición de rasgos complejos como lo es el temperamento, Específicamente, el consumo de la leche es importante dado que se ha comprobado que el péptido BCM-7 derivado de la digestión de la leche A1, tiene efectos y acciones opioides por lo que es posible que en bovinos su efecto se vea reflejado en el temperamento del animal, desafortunadamente con nuestro estudio no pudo ser evidenciada esta asociación. Es altamente recomendable continuar con el trabajo aumentando el número de muestra la cual fue una de las principales limitantes de este estudio en el grupo de becerros, así como

también establecer la estrategia experimental de tal forma que las pruebas de temperamento se realicen en las primeras etapas de crecimiento del becerro donde la literatura muestra que la expresión del temperamento es menos variable, es decir, en la etapa post-destete (Garza-Brenner, 2016).

### **8.3. Efecto del consumo de leche A1 en el Grupo Familias Vacas-Crias**

En este trabajo se evaluó el efecto del consumo de leche con las dos variantes alélicas de  $\beta$ -caseína sobre el peso al destete de becerros de la raza Charolais. Se encontró que los becerros alimentados por vacas portadoras del alelo A1 de  $\beta$ -caseína mostraron pesos significativamente diferentes a los alimentados con los genotipos A2/A2 y A1/A2.

Los pesos de destete del ganado de carne son influenciados por muchos factores medioambientales, los cuales incluyen el efecto de hato, grupo contemporáneo, región, edad de la madre, sexo y manejo de la cría, edad al destete, entre otros. Como se ha mencionado la alimentación del becerro, específicamente el consumo de la leche, y por lo tanto la composición de la misma, es un factor medioambiental de gran importancia para el desarrollo de los animales y la expresión de su potencial genético y productivo, el cual se evalúa entre otros con el peso al destete.

Beal (1990) demostró que existe una correlación entre el consumo de proteínas en la leche con la ganancia de peso pre-destete. De igual manera Marston (1992) demostró lo anterior con pesos al destete ajustados para ganado Angus. Diferentes estudios señalan que la variación en la producción de leche de las vacas representa entre el 40 y el 65 % de la variabilidad en el peso al destete de su progenie (Neville, 1962; Rutledge, 1971; Robinson, 1978). Estudios más recientes como el de Curtis (2018) mencionan que las metodologías recientes de fórmulas o reemplazos de leche materna hacia los becerros tienen un efecto positivo en la ganancia de peso diario en los mismos, ya que éstos aumentan si se les provee en etapas tempranas del pre-destete.

Martínez-Velázquez (2012) menciona que la correlación entre la producción de leche de la vaca y la ganancia diaria de peso (GDP) en los becerros es evidente, pero a medida en que la lactancia de la vaca se acaba, los GDP en los becerros disminuyen. Adicionalmente, el autor hace énfasis en la conversión alimenticia, es decir, la cantidad



de leche consumida por el becerro para transformarse en peso (kg); para este estudio se estudiaron 4 razas: Guzerat, Criollo, Guzerat x Criollo y Criollo x Guzerat, en donde se midió la producción diaria de leche de cada una y la conversión alimenticia en los becerros. Los resultados fueron que los becerros Criollos y Guzerat x Criollo tuvieron que consumir un promedio de 22.5kg y 27.3kg de leche respectivamente para producir 1kg de peso y para el caso de Guzerat y Criollo x Guzerat la ingesta fue de 30.9kg y 37.3kg de leche respectivamente para producir 1kg de peso. Estos resultados son muy importantes, ya que elucidan la importancia productiva del consumo de leche en becerros y cómo la leche es un factor determinante para la ganancia de peso en los becerros.

Como se había comentado, al alelo A1 se ha asociado favorablemente a producción de leche y proteína total (Aleandri *et al.*, 1990; Young, 2013), dos características que impactan la ganancia de peso y el peso al destete en ganado de carne, por lo tanto, el resultado obtenido en este trabajo permite inferir que el péptido BCM-7 podría no tener un efecto negativo en la expresión de este rasgo productivo, lo cual contrasta con la hipótesis planteada en este trabajo. Las diferencia en peso de los animales alimentados con leche A1 y A1/A2, es apenas de 2kg, el análisis de un mayor número de muestras permitirá dar mayor soporte estadístico a este resultado.



## 9. CONCLUSIÓN

- Las concentraciones plasmáticas de GSH se ven afectadas por el tipo de leche que consumen los becerros. En este estudio los becerros que consumieron leche tipo A2 mostraron concentraciones de GSH plasmático significativamente mayores ( $P=0.0425$ ) a los del grupo de becerros que consumieron leche con el alelo A1 de  $\beta$ -caseína.
- Existe una asociación significativa ( $P=0.0446$ ) entre las concentraciones plasmáticas de GSH y el sexo del animal, las hembras presentaron las mayores concentraciones de GSH.
- No se encontró asociación entre ninguna de las pruebas de temperamento (Velocidad de salida, prueba de sujeción) con el tipo de leche que consumen los becerros Charolais.
- Se encontró que los becerros alimentados por vacas portadoras del alelo A1 de  $\beta$ -caseína mostraron pesos significativamente mayores a los alimentados con los genotipos A2 y A1/A2. Este permite inferir que el péptido BCM-7 podría no tener un efecto negativo en la expresión de este rasgo productivo.

## 10. REFERENCIAS

1. Adameczyk *et al.* (2013). Genetic analysis and evaluation of behavioural traits in cattle *Livestock Science* 154 (2013) 1–122.
2. Aleandri, R., Buttazzoni, L., Schneider, J., Carili, A. and Davoli, R. (1990). The effects of milk protein polymorphism on milk components and cheese-producing ability. *J. Dairy Sci.*, 73: 241-255.
3. Alexander L.J., Stewart A.F., MacKinlay A.G., Kapelinskaya T.V., Tkach T.M., Gorodetsky S.I., (1988). Isolation and characterization of the bovine  $\kappa$ -casein gene. *Eur. J. Biochem.* 178, 395-401.
4. Allison A.J y Clarke A.J. (2006). Further research for consideration in ‘the A2 milk case’. *European Journal of Clinical Nutrition* 60, 921.
5. Bawden, W. S., & Nicholas, K. R. (1999). Molecular genetics of milk production. *The Genetics of Cattle*. CABI Publishing, London, UK, 539-576.
6. Beal, W. E., D. R. Notter, and R. M. Akers. (1990). Techniques for estimation of milk yield in beef cows and relationships of milk yield to calf weight and postpartum reproduction. *J. Anim. Sci.* 68:937–943.
7. Bhopale. (2016). Bovine Milk Derived Peptides: A Comprehensive Review. *European Journal Of Pharmaceutical and Medical Research*, 3(3), 167-170.
8. Boissy A. and Bouissou M.F. (1988). Effects of Early Handling on Heifers' Subsequent Reactivity to Humans and to Unfamiliar Situations. *Applied Animal Behaviour Science*, 20 (1988) 259-273
9. Boissy, A., Fisher, A.D., Bouix, J., Hinch, G.N., Le Neindre, P., (2005). Genetics of fear in ruminant livestock. *Livest. Prod. Sci.* 93, 23–32
10. Bonilla E, W. (1989). Importancia Del Calostro En La Alimentacion Del Ternero Recien Nacido <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/IPA/NR11453.pdf>
11. Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A. and Lottspeich, F., (1979) Novel opioid peptides derived from casein (fl-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 360 1211-1216.

12. Breitner, J. C., Folstein, M. F., & Murphy, E. A. (1986). Familial aggregation in Alzheimer dementia—I. A model for the age-dependent expression of an autosomal dominant gene. *Journal of psychiatric research*, 20(1), 31-43.
13. Brignon G., Ribadeau-Dumas B., (1973). Localization of the Glu-Gln substitution differentiating B and D genetic variants in the peptide chain of bovine beta lactoglobulin. *FEBS Lett.* 33, 73- 76.
14. Brignon G., Ribadeu-Dumas B., Mercie J.-C., Pelissier J.P., Das B.C., (1977). Complete amino acid sequence of bovine  $\alpha$ s2-casein. *FEBS Lett.* 76, 274-279
15. Brown MA, Brown Jr AH. (2002). Relationship of milk yield and quality to preweaning gain of calves from Angus, Brahman and reciprocal-cross cows on different forage system. *J Anim Sci* (80):2522-2527
16. Brown, H. H., & Moon, H. W. (1979). Localization and activities of lysosomal enzymes in jejunal and ileal epithelial cells of the young pig. *American journal of veterinary research*, 40(11), 1573-1577.
17. Burdick, N. C., Randel, R. D., Carroll, J. A., & Welsh, T. H. (2011). Interactions between temperament, stress, and immune function in cattle. *International Journal of Zoology*.
18. Burrow, H.M., (1991). Measurements of temperament and their relationship with performance traits of beef cattle. *Anim. Breed. Abstr.* 65, 477–495.
19. Bush, L. J., & Staley, T. E. (1980). Absorption of Colostral Immunoglobulins in Newborn Calves1. *Journal of Dairy Science*, 63(4), 672-680.
20. Cade (2000). Autism and Schizophrenia: Intestinal Disorders. *Nutr Neurosci.* 2000;3(1):57-72
21. Carter D. y Ho J. (1994). Structure of Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry* Volume 45, Pages iii-xvi, 1-459
22. Cesuriska, A. (2007). Beta-casomorphin 7 in raw and hydrolyzed milk derived from cows of alternative B-casein genotypes. *Milchwissenschaft*, 62, 2.
23. Chang, K.J., Cuatrecasas, P., Wei, E.T. and Chang, J.K., (1982). Analgesic activity of intracerebroventricular administration of morphiceptin and  $\beta$ -casomorphins: correlation with the morphine receptor binding affinity, *Life Sci.*, 30;1547-1551.

24. Chun-Nam et al., (2018). Effects of reduced glutathione on stress and inflammatory response in Korean native calves vaccinated with foot-and-mouth disease vaccine. *J. Prev. Vet. Med.* Vol. 42, No. 1: 37-40.
25. Clare, D.A., & Swaisgood, H.E. (2000). Bioactive milk peptides: A prospectus. *J. Dairy Sci.* 83:11871195.
26. Clarke A. and Trivedi M. (2014). Bovine Beta Casein Variants: Implications to Human Nutrition and Health. International Conference on Food Security and Nutrition IPCBEE vol.67. IACSIT Press, Singapore DOI: 10.7763/IPCBEE. 2014. VOL. 3, 1987;(64):1313-1322
27. Combellas J. y M. Tesorero. 2003. Cow-calf relationship during milking and its effect on milk yield and calf live weight gain. *Livest. Res. Rural Devel.*, 15(3).
28. Conti A.L., Napolitano L., Cantisani A.M., Davoli R., Dall'Olio S.,( 1988). Bovine  $\beta$ -lactoglobulin H: Isolation by preparative isoelectric focusing in immobilized pH gradients and preliminary characterization. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 16, 205-214.
29. Córdova, A., Rodríguez, G., Córdova, M., Córdova, C., & Pérez, J. (2005). Ganancia diaria y peso al destete en terneros de cruces *Bos taurus* con *Bos indicus* en trópico húmedo. *Revista MVZ Córdoba*, 10(1).
30. Curtis G, McGregor Argo C, Jones D, Grove-White D (2018) The impact of early life nutrition and housing on growth and reproduction in dairy cattle. *PLoS ONE* 13(2): e0191687
31. Daley DR, McCuskey A, Bailey CM. (1987).Composition and yield of milk from Beef-type *Bos taurus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* dams. *J Anim Sci* ;(64):373-784.
32. De Noni I. (2008). Release of b-casomorphins 5 and 7 during simulated gastrointestinal digestion of bovine b-casein variants and milk-based infant formulas. *Food Chemistry* 110 (2008) 897–903.
33. Deth et al (2016). Clinical evaluation of glutathione concentrations after consumption of milk containing different subtypes of  $\beta$ -casein: results from a randomized, crossover clinical tria. *Nutrition Journal* 15:82

34. Dong C., Ng-Kwai-Hang K.F., (1998). Characterization of a non-electrophoretic genetic variant of  $\beta$ -casein by peptide mapping and mass spectrometric analysis. *Int. Dairy J.* 8, 967-972.
35. Drackley J. (2008). Calf nutrition from birth to breeding. *Vet Clin Food Anim.* 25, 55-86.
36. Dubynin, V.A.; Malinovskaya, I.V.; Belyaeva, Y.A.; Bibby, N.J.; Wasmuth, H.E. (2008). Delayed effect of exorphins on learning of albino rat pups. *Biology Bulletin*, 35 (1), 43–49
37. Duifhuis-Rivera et al (2014). Frecuencias genotípicas y alélicas de la  $\beta$ -caseína en el bovino Criollo Lechero Tropical de México. *zootecnia* vol. 65, num. 251, p. 409.
38. Dziuba B., Dziuba M., (2014). Milk proteins-derived bioactive peptides in dairy products: molecular, biological and methodological aspects. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 13(1), 5-25.
39. Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A., Farrell H.M. Jr., Harwalkar V.R., Jenness J., Whitney R.M., (1984). Nomenclature of protein of cow's milk: Fifth revision. *J. Dairy Sci.* 67, 1599-1631.25).
40. Farrell H.M. Jr., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K., Hicks C.L., Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang K.F., Swaisgood H.E., (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk – Sixth revision. *J. Dairy Sci.* 87, 1641-1674.
41. Fatih A. D, Bahattin Ç. (2018). Discussions of Effect A1 and A2 Milk Beta-Casein Gene on Health. *Appro Poult Dairy & Vet Sci.* 3(2). APDV.000556. 201
42. FIRA (2017). Panorama Agroalimentario: Carne de bovino. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. Página de internet: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200639/Panorama\\_Agroalimentario\\_Carne\\_de\\_bovino\\_2017\\_\\_1\\_.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200639/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_bovino_2017__1_.pdf) Consulta: 5 mayo 2017, 15:45 horas.
43. FitzGerald R. and Murray B.A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 118-125.
44. Gautheron M, Lepouze A (2012). Le lait, un aliment indispensable. *Issues Biol. Sci.* 49: 679 – 693.





45. Garza-Brenner, E., Sifuentes-Rincón, A. M., Randel, R. D., Paredes-Sánchez, F. A., Parra-Bracamonte, G. M., Vera, W. A. & Cabrera, A. S. (2017). Association of SNPs in dopamine and serotonin pathway genes and their interacting genes with temperament traits in Charolais cows. *Journal of applied genetics*, 58(3), 363-371.
46. Godovac-Zimmermann J., Krause I., Baranyi M., Fischer-Frühholz S., Juszcak J., Erhardt G., Buchberger J., Klostermeyer H., (1996). Isolation and rapid sequence characterization of two novel bovine  $\beta$ -lactoglobulins I and J. *J. Protein Chem.* 15, 743-750.
47. Grecksch, G., Schweigert, C. and Matthies, H., (1982). Evidence for analgesic activity of  $\beta$ -casomorphin in rats, *Neurosci. Lett.*, 27 325-328.
48. Grignard, L., Boivin, X., Boissy, A., Le Neindre, P., (2001). Do beef cattle react consistently to different handling situations? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 71, 263–276.
49. Grosclaude F., (1979). A genetic and biochemical analysis of a polymorphism of bovine  $\alpha$ 2-casein. *J. Dairy Res.* 46, 211-213.
50. Grosclaude F., Mahe M.F., Mercie J.C., Ribadeu-Dumas B., (1972). Localization of amino acid substitutions differentiating the A and B variants of  $\kappa$ -casein in cattle. *Ann. Génét. Sél. Anim.* 4, 515-521.
51. Grosclaude F., Ribadeau-Dumas B., (1973). Structure primaire de la caseine  $\alpha$ 1 et de la caseine  $\beta$ -bovine. *Eur. J. Biochem.* 40, 323-324.
52. Guetouache et al. (2014). Composition and nutritional value of raw milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research* Vol. 2(10), pp .115-122, December 2014.
53. Gutierrez, J. A (2018). Caracterización de frecuencias alélicas de marcadores genéticos asociados con rasgos productivos en cuatro razas de ganado de carne. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Biología. Tesis de licenciatura (en proceso).
54. Han S.K., Shin Y.C., Byun H.D., (2000). Biochemical, molecular and physiological characterization of a new  $\beta$ -casein variant detected in Korean cattle. *Anim. Genet.* 31, 49-51.

55. Haq, M. R. U., Kapila, R., Sharma, R., Saliganti, V., & Kapila, S. (2014). Comparative evaluation of cow  $\beta$ -casein variants (A1/A2) consumption on Th 2-mediated inflammatory response in mouse gut. *European journal of nutrition*, 53(4), 1039-1049.
56. Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 163-169.
57. Hernández-Ledesma, B., B. Miralles, L. Amigo. M. Ramos, I. Recio (2005). Identification of and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85:1041-1048.
58. Hidaka, T., Fukumoto, Y., Yamamoto, S., Ogata, Y., & Horiuchi, T. (2018). Variations in bovine embryo production between individual donors for OPU-IVF are closely related to glutathione concentrations in oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology*, 113, 176-182.
59. Ho et al. (2014). Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition* (2014) 68, 994–1000.
60. Horne D.S., (2006). Casein micelle structure: models and muddles. *Curr. Opin. Coll. Interface Sci.* 11, 148-153.
61. Jakob E., Puhan Z., (1992). Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk proteins – A review. *Int. Dairy J.* 2, 157-178.
62. Jarmołowska, B., Sidor, K., Iwan, M., Bielikowicz, K., Kaczmarski, M., Kostyra, E., & Kostyra, H. (2007). Changes of  $\beta$ -casomorphin content in human milk during lactation. *Peptides*, 28(10), 1982-1986
63. Jefferies Et Al. (2003). Glutathione. *Basic Science Review. Anz J. Surg.*; 73 : 517–522.
64. Jianqin et al. (2016). Effects of milk containing only A2 beta-casein versus milk containing beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behaviour of people with self-reported intolerance to traditional cow's milk. *Nutrition Journal* 15:35

65. Jinsmaa, Y., & Yoshikawa, M. (1999). Enzymatic release of neocasomorphin and bcasomorphin
66. Keating et. al (2007). A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to  $\beta$ -casomorphin. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 47: 99–104, 200
67. Kebchaoui J (2012). Le lait composition et propriétés. Coopérations universitaire 2012 -2013 entre la faculté polydisciplinaire de Taroudant (MAROC) et l'enil de Besancon mamirolle région Franche compte (France). *ENIL.Mamirolle (25620):* 1- 4.
68. Kidwell, J. F., Wade, M. A., & Hunter, J. E. (1955). The relation of blood glutathione level to growth and body size in beef cattle. *Growth*, 19, 177-185.
69. Kim et al (2011). Effect of Dietary Supplementation of Glutathione on Blood Biochemical Changes and Growth Performances of Holstein Calves. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 24, No. 12 : 1711 – 1717
70. König HE, Sautet J, Liebich HG. (2002). Aparato digestivo (Apparatus digestorius). En: König HE, Liebich HG, eds. *Anatomía de los animales domésticos. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso.* 2a ed. p. 15- 80.
71. Korhonen, H., A. Pihlanto (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal.* 16: 945-960.
72. Kuhn N.J., Carrick D.T., Wilde C.J., (1980). Lactose synthesis: Possibilities of regulation. *J. Dairy Sci.* 63, 328-336.
73. Lahov, E., & Regelson, W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology*, 34(1), 131-145.
74. Livak et al. (1999). Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 22DDCT Method. *METHODS* 25, 402–408.
75. Lord, F. M. (1955). Sampling fluctuations resulting from the sampling of test items. *Psychometrika*, 20, 1-22.
76. Lu (2008). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 42-59.

77. Mabon (1969) Erythrocyte Glutathione And Growth In The Calf. Br. Vet. J. (1969), 125,591
78. Madureira A.R., Pereira C.I., Gomes A.M.P., Pentado M.E., (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. Food Res. Int. 40, 197-211
79. Maeno, M., N. Yamamoto, and T. Takano (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. J. Dairy Sci. 79:1316–1321.
80. Mahè M.F., Grosclaude F., (1982). Polymorphisme de la caseine  $\alpha$ 2 des bovines: Characterization du variant C du yak (*Bos grunniens*). Ann. Genet. Sel. Anim. 14, 401-416.
81. Marklakova, A.S.; Nazarenko, I.V.; Dubynin, V.; Nezavibat'ko, A.V.N.; Alfeeva, L.A.; Kamensk'ı, A.A.(1995) The effect of beta-casomorphin-7 on the level of food and defense motivations in different types of learning. Zhurnal Vysshei Nervnoi Deiatelnosti Imeni I.P. Pavlova, 45 (6), 1143–1150
82. Márquez, R., Escobar, D., Sala, A., Silvera, C., & Repiso, L. (2008). Elaboración, caracterización y comparación de películas comestibles en base a aislado de proteínas de suero lácteo (WPI). Innotec, (3 ene-dic), 57-62.
83. Marston TT, Simms DD, Schalles RR, Zoellner KO, Martin LC, Fink GM. (1992). Relationship of milk production, milk expected progeny difference, and calf weaning weight in Angus and Simmental cow-calf pairs. J Anim Sci 1; (70):3304-3310.
84. Martínez-Velázquez et al. (2012). Producción de leche de vacas Criollo, Guzerat y sus cruzas recíprocas F1 y su relación con el peso al destete de las crías. Rev Mex Cienc Pecu;3(4):501-514
85. Maslennikova, N.V.;Sazonova,E.N.;Timoshin,S.S.(2008). Effectof-casomorphin-7 on DNA synthesis in cell populations of new born albino rats. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 145 (2), 210–212.
86. McBean GJ, Aslan M, Griffiths HR, Torrão RC. (2015) Thiol redox homeostasis in neurodegenerative disease. Redox Biol. ; 5:186–94.

87. Mejía-Baustista, G. T., Magaña, J. G., Segura-Correa, J. C., Delgado, R., & Estrada-León, R. J. (2010). Comportamiento reproductivo y productivo de vacas *Bos indicus*, *Bos taurus* y sus cruces en un sistema de producción vaca: cría en Yucatán, México. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 12(2).
88. Mercie J.C., Grosclaude F., Ribadeau-Dumas B., (1971). Structure primaire de la caseine  $\alpha$ 1 bovine. Sequence complete. *Eur. J. Biochem.* 4, 27-31.
89. Mercier, J.-C., Brignon, G. and Ribadeau-dumas, B. (1973), Structure primaire de la caséine  $\kappa$ B bovine. *European Journal of Biochemistry*, 35: 222–235.
90. Michel de S. (2005). *Les cahiers de l'élevage de chèvre*. 2003. Edition Rustica /Fler. Paris dépôt légal aout 2003. 2ième édition . ISBN : 2 – 840
91. Mils S., Ross R.P., Hill C., Fitzgerald G.F., Stanton C., (2011). Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human Health. *Int. Dairy J.* 21, 377-401.
92. Montaña BM, Nielsen MK, Deutscher GH. (1990). Energy requirements for maintenance of crossbred beef cattle with different genetic potential for milk. *J Anim Sci* ;(68):2279- 2288.
93. Morales, R., edición (2014). Desarrollo de una línea base para la potencial generación de productos lácteos diferenciados y protocolos de producción de leche y derivados de alto valor nutricional. Osorno Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín N° 291, 72 pp. Morris CA, Hickey SM, Cullen NG, Prosser CG, Anderson RM, Tate ML. 2005. Associations between beta-casein genotype and milk yield and composition in grazing dairy cows. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 48:441-450.
94. Moran J. (2002). *Calf rearing. A practical guide*. 2a ed. Collingwood: Landlinks Press. 226 p. Perspectives for animal production. *Livest. Prod. Sci.* 93, 15–21.
95. Moss B.R. and Coleman D.A. (2009). *Feeding And Management Of The Dairy Calf: Birth To 6 Months (Circular ANR-609)*. Alabama A&M And Auburn Universities.
96. Nedvídková, J.; Kasafírek, E.; Dlabac, V. (1985). Effect of beta-casomorphin and its analogue on serum prolactin in the rat. *Experimental and Clinical Endocrinology* , 85 (2), 249–252.

97. Neville JR WE. (1962). Influence of dam's milk production and other factors on 120- and 240-day weight of Hereford calves. *J Anim Sci* ;(21):315-320.
98. Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Moxley, J.E. and Monardes, H.G. (1986). Relationships between milk protein polymorphisms and milk constituents in Holstein Friesian. *J. Dairy Sci.*, 69: 22-26
99. Ng-Kwai-Hang, K. F., & Grosclaude, F. (1992). Genetic polymorphism of milk proteins. *Advanced dairy chemistry*, 1, 405-455.
100. Oleński, K., Cieslinska, A., Suchocki, T., Szyda, J., & Kaminski, S. (2012). Polymorphism in coding and regulatory sequences of beta-casein gene is associated with milk production traits in Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 30(1), 12.
101. Olenski, K., Kamiński, S., Szyda, J., & Cieslinska, A. (2010). Polymorphism of the beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein–Friesian bulls. *Livestock Science*, 131(1), 137-140.
102. Ossa G., Pérez J. (2002). Efecto del medio y de la herencia sobre los pesos al nacer, destete y 16 meses de edad en la raza costeño con cuernos. *Rev.MVZ Córdoba*; 7(1): 143-147.
103. Pal, S., Woodford, K., Kukuljan, S., & Ho, S. (2015). Milk Intolerance, Beta-Casein and Lactose. *Nutrients*, 7(9), 7285-97. doi:10.3390/nu7095339
104. Panksepp et al.,(1984). Casomorphins Reduce Separation Distress in Chicks. *Peptides*, Vol. 5. pp. 829—831.
105. Parashar A. and Krishan-Saini, R. (2015). A1 milk and its controversy-a review. *International Journal of Bioassays* 4.12 (2015): 4611-4619.
106. Parodi P.W., (2007). A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. *Cur. Pharm. Design* 13, 813-828.
107. Pérez S, Pereda J, Sabater L, Sastre J. (2015). Redox signaling in acute pancreatitis. *Redox Biol.* ;5: 1–14.
108. Permyakov E.A., Berliner L.J., (2000).  $\alpha$ -Lacalbumin: structure and function. *FEBS Lett.* 473, 269-274.
109. Pons-Fita A. (2015). Determinación De La Frecuencia Del Alelo A2 De La Beta-Caseína (Csn2) En Pajillas De Toros Lecheros De La Raza Holstein. Tesis

de Maestría. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara.

110. Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista chilena de nutrición*, 40(4), 397-403.
111. Pozzilli P (1999).  $\beta$ -casein in cow's milk: A major antigenic determinant for type 1 diabetes? *J Endocrinol Invest* 22, 562–567.
112. Quezada et al. (2002). Estudio comparativo de la concentración de glutatión reducido y actividades gammaglutamiltransferasa y transferasa de glutatión en hígado y riñón de ratas y pollos. *Vet. Mex*, 33 (2).
113. Raymond M. & Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86:248-249
114. Robison OW, Yusuff MKM, Dillard EU. (1978). Milk production in Hereford cows I. Means and correlations. *J Anim Sci* ;(47):131-136.
115. Rutledge JJ, Robinson OW, (1971). Ahlschwede WT, Legates JE. Milk Yield and its Influence on 205-Day Weight of Beef Calves. *J Anim Sci* 1971;(33):563-567.
116. SAGARPA (2016). Panorama de la leche en México. Página de internet: [http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20leche\\_Diciembre2016.pdf](http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20leche_Diciembre2016.pdf) Consulta: 5 mayo 2017, 11:30 horas.
117. Secretaría de Economía (2012). Análisis Del Sector Lácteo En México. Dirección General De Industrias Básicas. Página de internet: [https://www.economia.gob.mx/files/comunidad\\_negocios/industria\\_comercio/informacionSectorial/analisis\\_sector\\_lacteo.pdf](https://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/analisis_sector_lacteo.pdf) Consulta: 3 mayo 2017, 13:52 horas.
118. Swaisgood H.E., (1992). Chemistry of caseins. In: *Advanced dairy chemistry – I. Proteins*. Ed. P.F. Fox. Elsevier Appl. Sci. New York, 63-110
119. Teschemacher, H. (1997). Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Current Pharmaceutical Design* , 9, 1331–1344.
120. Trompette, A.; Claustre, J.; Caillon, F.; Jourdan, G.; Chayvialle, J.A.; Plaisancie, P. (2003). Milk bioactive peptides and beta-casomorphins induce mucus release in rat jejunum. *Journal of Nutrition* , 133 (11), 3499–3503.



121. Umbach et al. (1985). Demonstration of a beta-casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. *Regulatory Peptides*, 12 (1985) 223-230.
122. Vega, L. (2002). Influencia del uso de imitadores de grasa sobre el proceso de elaboración y rendimiento de queso Chanco de reducido tenor graso (Doctoral dissertation, Tesis Licenciado en Ingeniería en Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile).
123. Viña, J., Sastre, J., Pallardó, F. V., & Borrás, C. (2004). Posibles mecanismos por los que las mujeres viven más ue los varones. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 39(6), 381-384
124. Visser S. Slangen Ch.J., Lagerwert F.M., Van Dongen W.D., Haverkamp J., (1995). Identifi cation of a new genetic variant of bovine  $\beta$ -casein by reversed-phase highperformance liquid chromatography and mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A*, 711, 141-150.
125. Waugh D.F., (1971). Formation and structure of micelles. In: *Milk proteins: chemistry and molecular biology*. H.A. McKenzie. Academic Press, New York, 4-85
126. Ye Z-W, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. (2015). Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 1850; :1607–21.
127. Yin, H.; Miao, J.; Zhang, Y. (2010). Protective effect of casomorphin-7 on type 1 diabetes rats induced with streptozotocin. *Peptides* , 31, 1725–1729.
128. Young et al. (2013). *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. John Wiley & Sons, - 728 pages
129. Zepeda-Batista, J. L., Alarcón-Zúñiga, B., Ruíz-Flores, A., Núñez-Domínguez, R., & Ramírez-Valverde, R. (2015). Polymorphism of three milk protein genes in Mexican Jersey cattle. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(1), 1-4..
130. Zimecki M., Kruzel M.L., (2007). Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. *J. Experim. Therap. Oncol*. 6, 89-106.





## 11. APÉNDICES

### APÉNDICE A

#### Preparación de muestras y reactivos para la medición de GSH

- A) Preparación de SSA (Reactivo externo al kit)
- Ácido 5-sulfo-salicílico (SSA) acuoso deshidratado (Sigma-Aldrich, número de catálogo S2130) para preparar una solución al 5% peso/ volumen, es decir, 1g de SSA por cada 20mL de agua destilada o desionizada.
- B) Preparación de Reactivos\*\*:
- *Diluyente de la muestra:* se diluye una parte del SSA al 5% 1:5 en 4 partes de Buffer de Ensayo y se lleva al vórtex por 10 segundos. El pH del Diluyente de la muestra debe ser  $>6$ . Esta preparación puede ser guardada a 4°C por un mes.
  - *Reactivo de Detección Colorimétrica:* Se diluye una parte del concentrado del Reactivo de detección colorimétrica a 1:10 en 9 partes de Buffer de Ensayo.
  - *Mix de Reacción:* Se diluye una parte de los concentrados de NADPH y Glutación Reductasa 1:10 en 8 partes de Buffer de Ensayo. Guardar el sobrante no utilizado del Mix de Reacción a 4°C por no más de 2 días.

\*Todos los componentes del kit deben ser refrigerados a 4°C hasta la fecha de expiración.

\*\*Las cantidades a utilizar de cada reactivo se muestran en el protocolo del Kit.



## APÉNDICE B

### Preparación de los Estándares

Para determinar GSH total:

1. Los estándares se preparan mediante tubos de ensayo etiquetados como 1 a 6.
2. Pipetear 475  $\mu$ L de diluyente de la muestra en el tubo 1 y 250  $\mu$ L en tubos 2 a 6.
3. Añadir con cuidado 25  $\mu$ L del estándar suministrado en el kit al tubo 1 y llevar al vortex por 10 segundos.
4. Tomar 250  $\mu$ L de la solución en el tubo 1 y añadirlo al tubo 2 y llevar al vortex por 10 segundos.
5. Repita este procedimiento para tubos 3 a 6.

La concentración de GSH total en tubos de 1 a 6 será de 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, y 0.781  $\mu$ M después de la adición de la mezcla de reacción.

El diluyente de Muestra debe ser utilizado como un 0  $\mu$ M estándar. Utilizar todos los estándares dentro de 2 horas de preparación.

### APÉNDICE C

Base de datos de vacas y crías analizadas

Número ID	MADRE			CRÍA				
	ID Local	Alelos	Cría	ID cría	Nacimiento	Sexo	PN	Análisis
1	1418	A	SI	1709	04-dic-17	M	32	SI
2	1108	CA	SI	1720	12-ene-18	H	56	NO
3	1414	A	NO					
4	611	A	NO					
5	1412	CA	SI	1710	04-dic-17	H	40	NO
6	1126	C	NO					
7	1207	A	NO					
8	1113		NO					
9	746	CA	SI	1801	23-ene-18	M	48	NO
10	1506	CA	SI	1802	25-ene-18	M	46	NO
11	1514	C	NO					
12	1609	C	NO					
13	1503	A	NO					
14	525	CA	NO					
15	640	CA	NO					
16	1122	CA	NO					
17	1308	CA	SI	1708	04-dic-17	H	35	SI
18	1309	C	SI	1712	11-dic-17	M	35	SI
19	1124	A	SI	1713	12-dic-17	H	39	NO
20	1305	C	NO					
21	1211	C	SI	1803	02-feb-18	H	51	SI
22	1420	CA	NO					
23	233	C	SI	1717	19-dic-17	M	52	NO
24	1415	CA	NO					
25	1007	C	SI	1715	19-dic-17	H	56	NO
26	809	CA	SI	1721	12-ene-18	H	51	NO
27	905	A	NO					
28	1423	CA	SI	1718	12-ene-18	M	43	SI
29	750	CA	NO					
30	711	C	NO					
31	1519	A	SI	1714	18-dic-17	H	40	SI
32	1316	C	SI	1716	19-dic-17	H	55	SI
33	641	C	SI	1719	12-ene-18	M	52	SI
34	1604	CA	NO					
35	1422	CA	SI	1711	04-dic-17	H	37	SI
36	610	CA	NO					



37	620	CA	NO
38	1608	CA	NO

#### APENDICE D

Base de datos de Pesos al Destete y Ganancia de Peso Diaria para el Grupo Becerros

Becerro	Peso al Nacimiento	Peso al destete Ajustado	Ganancia Diaria de Peso
1708	35 kg	222 kg	0.9109 kg
1709	32 kg	226kg	0.9474 kg
1711	37 kg	193 kg	0.7611 kg
1712	35 kg	248 kg	1.0370 kg
1714	40 kg	210 kg	0.8305 kg
1716	55 kg	254 kg	0.9722 kg
1718	43 kg	233kg	0.9245 kg
1719	52 kg	202 kg	0.7311 kg
1803	51 kg	176 kg	0.6105 kg

APENDICE E  
Base de datos de familias

No.	Grupo	Genotipo**	Año Nac.	Sexo*	Peso Nac. (kg)	Destete ajustado (kg)	Edad de la vaca (años)
1	1	11	2013	2	49	211	8
2	1	21	2014	2	40	231	4
3	1	21	2013	2	32	235	3
4	1	21	2014	2	45	207	8
5	1	21	2013	1	48	244	5
6	1	11	2013	1	40	232	10
7	1	21	2013	2	26	237	5
8	1	11	2013	1	45	225	5
9	1	21	2014	2	46	212	4
10	1	21	2013	1	43	241	11
11	1	21	2013	1	39	228	3
12	1	21	2013	2	41	212	10
13	1	11	2014	1	47	213	8
14	1	21	2013	2	47	233	5
15	1	21	2014	2	50	196	5
16	1	21	2013	2	45	212	7
17	1	21	2013	1	29	186	5
18	1	21	2013	2	39	207	6
19	1	21	2013	1	50	266	7
20	1	21	2013	1	42	188	7
21	1	21	2013	1	50	212	6
22	1	11	2013	1	45	234	5
23	1	21	2013	2	32	226	5
24	1	21	2013	1	54	258	5
25	1	21	2013	2	44	254	5
26	1	21	2013	2	46	186	5
27	1	21	2013	1	42	162	4
28	1	21	2013	1	46	182	7
29	1	21	2013	1	32	227	7
30	1	21	2013	2	43	200	7
31	1	11	2013	2	36	197	7
32	1	21	2013	2	32	233	6
33	1	21	2013	2	46	189	5
34	1	11	2013	2	35	207	3



35	1	21	2013	1	47	231	3
36	1	11	2013	2	30	178	3
37	1	11	2012	1	38	241	7
38	1	11	2012	2	41	276	5
39	1	21	2012	1	45	295	10
40	1	21	2012	2	40	220	4
41	1	11	2012	2	30	110	3
42	1	21	2012	1	41	200	2
43	1	21	2012	1	40	204	2
44	1	21	2012	1	37	107	10
45	1	21	2012	1	40	206	10
46	1	21	2013	2	36	227	3
47	1	21	2013	1	40	170	3
48	1	21	2013	1	32	250	3
49	1	21	2013	2	32	233	9
50	1	21	2013	1	32	217	4
51	1	21	2013	1	44	231	3
52	1	21	2013	1	46	187	3
53	1	21	2013	1	44	217	2
54	1	11	2013	1	44	275	4
55	1	21	2013	1	44	294	6
56	1	21	2013	2	49	253	6
57	1	21	2013	2	38	216	7
58	1	11	2012	2	42	262	7
59	1	21	2012	2	48	220	6
60	1	21	2012	1	48	286	5
61	1	21	2012	2	47	271	5
62	1	21	2012	1	51	286	5
63	1	21	2012	2	45	241	5
64	1	21	2012	1	51	282	4
65	1	11	2012	1	50	292	4
66	2	22	2013	1	35	237	6
67	2	22	2014	1	50	220	10
68	2	22	2014	1	29	237	3
69	2	22	2013	1	36	228	4
70	2	22	2013	2	44	239	5
71	2	22	2013	2	35	232	9
72	2	22	2013	1	33	221	5
73	2	22	2014	1	54	243	7
74	2	22	2013	2	36	215	12
75	2	22	2013	2	47	253	8



76	2	22	2014	2	37	229	10
77	2	22	2014	1	47	182	5
78	2	22	2011	2	38	201	6
79	2	22	2013	1	43	235	7
80	2	22	2013	2	35	173	6
81	2	22	2013	1	35	206	5
82	2	22	2013	1	42	162	5
83	2	22	2013	1	38	187	4
84	2	22	2013	1	37	90	3
85	2	22	2013	2	32	238	3
86	2	22	2013	1	34	208	3
87	2	22	2013	2	37	139	5
88	2	22	2012	1	41	205	6
89	2	22	2012	1	38	240	5
90	2	22	2012	2	48	305	4
91	2	22	2012	2	30	110	2
92	2	22	2012	2	42	296	2
93	2	22	2012	1	37	220	11
94	2	22	2012	1	40	245	10
95	2	22	2012	2	42	250	10
96	2	22	2013	1	32	200	3
97	2	22	2013	1	34	286	3
98	2	22	2013	1	42	253	3
99	2	22	2013	1	37	254	3
100	2	22	2013	1	36	243	5
101	2	22	2013	1	34	224	4
102	2	22	2013	1	36	226	8
103	2	22	2013	1	35	219	6
104	2	22	2013	2	40	195	3
105	2	22	2013	1	46	157	2
106	2	22	2013	1	48	321	6
107	2	22	2012	2	47	290	6
108	2	22	2012	2	45	268	4

\*Sexo: 1=macho, 2=hembra

\*\*Genotipo: 11=A1, 22=A2, 21=A1/A2