



Identificación de genes candidatos y SNP relacionados con el temperamento del ganado utilizando un análisis GWAS junto con un análisis de redes interactuantes



Francisco Alejandro Paredes-Sánchez ^a

Ana María Sifuentes-Rincón ^{b*}

Edgar Eduardo Lara-Ramírez ^c

Eduardo Casas ^d

Felipe Alonso Rodríguez-Almeida ^e

Elsa Verónica Herrera-Mayorga ^f

Ronald D. Randel ^g

^a Universidad Autónoma de Tamaulipas, IA-UAMM. Mante, México.

^b Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. Laboratorio de Biotecnología Animal, Blvd. Del Maestro esq. Elías Piña. Col. Narciso Mendoza s/n. Cd. Reynosa, Tam. México.

^c Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas, Zacatecas, México.

^d United States Department of Agriculture. National Animal Disease Center, Iowa, USA.

^e Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Zootecnia y Ecología, Chihuahua, México.

^f Universidad Autónoma de Tamaulipas. IBI-UAMM, Mante, México.

^g Texas A&M University. AgriLife Research. Texas, USA.

*Autor de correspondencia: asifuentes@ipn.mx

Resumen:

El objetivo de este estudio fue identificar en animales de raza Angus y Brangus con temperamento extremo, medido como velocidad de salida, regiones genómicas y genes candidatos asociados con el temperamento bovino. La población fue genotipada con el chip Genomic Profiler HD 150K y después del análisis de asociación del genoma completo, los SNP rs133956611 ($P= 2.65 \text{ E-}06$) y rs81144933 ($P= 9.58 \text{ E-}06$) se asociaron con el temperamento. El análisis de mapeo de las regiones cercanas al SNP rs81144933 identificó los genes *SNCA* (alfa-sinucleína) y *MMRNI* (multimerin-1) a 222.8 y 435.9 Kb corriente abajo, respectivamente, mientras que para los loci rs133956611 se identificó el gen *GPRIN3* (familia GPRIN- miembro 3) a 245.7 Kb corriente arriba, los tres genes se encuentran en el cromosoma BTA6. El análisis de las interacciones proteína-proteína de *SNCA* permitió la identificación de los genes *APP* (proteína precursora de β -amiloide), *PARK7* (deglicasa asociada al parkinsonismo), *UCHL1* (ubiquitina C-terminal hidrolasa L1), *PARK2* (parkina-RBR-E3-ubiquitina-proteína-ligasa), y genes de la familia *SLC* como candidatos a estar asociados con el temperamento bovino. Todos estos genes candidatos y su interacción fueron resecuenciados, lo que permitió el descubrimiento de nuevos SNP en los genes *SNCA* y *APP*. De estos, los SNP localizados en los intrones 5, 8 y 11 del gen *APP* afectan a los motivos del sitio de empalme. Estos resultados indican que el *SNCA* y sus genes interactuantes son candidatos para estar relacionados con el temperamento bovino.

Palabras clave: Ganado de carne, Comportamiento, BTA6, Genes candidatos, Temperamento.

Recibido: 18/10/2021

Aceptado: 16/08/2022

Introducción

El temperamento es un rasgo económicamente relevante que afecta el bienestar de los animales y los rasgos relacionados con la productividad. El temperamento bovino se considera el rasgo más importante de la personalidad de un animal y comprende una amplia gama de comportamientos, desde la docilidad hasta el miedo y el nerviosismo o la falta de respuesta, los intentos de escape y el comportamiento agresivo, en el que se observan diversos parámetros como la actividad locomotora general y la reactividad al estrés. El temperamento es afectado por la edad, la experiencia, el sexo, el manejo, los efectos maternos, los factores ambientales, la genética, la especie y la raza^(1,2). Hasta la fecha, varios enfoques genómicos intentaron identificar regiones genómicas y genes en los que los

polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphisms*) subyacentes están asociados con el temperamento, un rasgo fenotípico complejo.

El mapeo de locus de rasgo cuantitativo (QTL, del inglés *quantitative trait locus*) descubrió la primera evidencia de regiones genómicas asociadas con rasgos de comportamiento en razas lecheras^(3,4). La detección de QTL en el genoma condujo a la propuesta de genes candidatos bajo la región genómica abarcada por el QTL, que podrían ser potencialmente responsables de las diferencias en la expresión de rasgos. La identificación de genes candidatos con base en su función y posible implicación en el temperamento bovino ha sido una estrategia para la búsqueda de SNP. Garza-Brenner *et al*⁽⁵⁾ seleccionaron un grupo de 19 genes que participan en la vía de la dopamina y la serotonina, y a través de un análisis de interacciones proteína-proteína (IPP), identificaron cuatro nuevos genes candidatos interactuantes (*POMC*, *NPY*, *SLC18A2* y *FOSFBJ*), de los cuales *POMC*, *SLC18A2* y *DRD3*, *HTR2A* (seleccionados con base en su función) revelaron SNP asociados con la velocidad de salida (VS) y puntuación en corral (PC), que son mediciones del temperamento bovino en una población de ganado Charolais. El mismo grupo encontró que las variaciones en estos genes (*DRD3*, *HTR2A* y *POMC*) tuvieron un efecto sobre el crecimiento bovino (peso al nacer) en una población de ganado Charolais, mostrando que las variaciones identificadas no solo tuvieron un efecto sobre el temperamento bovino sino también sobre los rasgos de peso vivo⁽⁶⁾. Del mismo modo, con el objetivo de evaluar la relación potencial de dos de estos SNP en los genes *DRD3* y *HTR2A* con el temperamento bovino y las características de crecimiento, y la eficiencia alimenticia, se analizó una población de ganado Angus, Brangus y Charolais con evaluaciones de temperamento; los resultados indicaron que no hubo asociación con VS y PC, pero el SNP en el gen *HTR2A* se asoció con la eficiencia alimenticia en el ganado Brangus⁽⁷⁾.

Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés *genome-wide association studies*), basados en tecnologías de genotipado de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphisms*) de alto rendimiento, son un enfoque relativamente reciente aplicado a estudios genéticos del temperamento del ganado y han permitido la identificación de diferentes grupos de genes candidatos. Lindholm-Perry *et al*⁽⁸⁾ analizaron una población de las razas Angus, Hereford, Simmental, Limousin, Charolais, Gelbvieh y Red Angus para identificar regiones genómicas y genes asociados con la velocidad de vuelo (VV); determinaron regiones cromosómicas en BTA 9 y 17 asociadas e identificaron dentro de ellas tres genes *GRIA2*, *GLRB* y *QKI* asociados con SNP cercanos. Valente *et al*⁽⁹⁾ evaluaron una población de Nellore utilizando la VS para evaluar su temperamento. Los genes *NCKAP5*, *PARK2*, *DOCK1*, *ANTXR1*, *CPE* y *GUCY1A2* se detectaron como candidatos potenciales para el rasgo de interés. Finalmente, Dos Santos *et al*⁽¹⁰⁾ utilizaron una población Guzerat en la que se midió la reactividad como indicador del temperamento. Los genes *POU1F1*, *DRD3*, *VWA3A*, *ZBTB20*, *EPHA6*, *SNRPF* y *NTN4* se propusieron como genes candidatos responsables de la expresión del rasgo.

En un contexto relacionado, la resecuenciación específica del exoma de regiones específicas utilizando tecnologías de secuenciación de nueva generación (SNG) se ha convertido en una técnica poderosa que permite la identificación de SNP. Este método puede capturar eficientemente toda la variación en las regiones de interés. Los efectos potenciales pueden ser evaluados en un estudio de asociación, que proporciona una herramienta efectiva para encontrar SNP que afectan a un rasgo determinado⁽¹¹⁾. Sin embargo, debido a las diferencias en el fenotipado del temperamento en estudios anteriores (es decir, cada estudio utiliza diferentes técnicas para evaluar el temperamento bovino, la puntuación en corral, la velocidad de salida, la reactividad, que evalúan diferentes aspectos del temperamento bovino), no es posible vincular la información para esos genes identificados como candidatos, o encontrar un proceso biológico representativo, interacciones proteína-proteína entre estos genes, o una ruta biológica en la que estos genes convergen para visualizar cómo el conjunto de genes explica el temperamento bovino. Así, la información genómica a menudo permanece aislada y necesita ser integrada. Por lo tanto, el objetivo fue identificar regiones genómicas y genes candidatos asociados con el temperamento en el ganado de carne a través de la integración de una estrategia GWAS, análisis de interacción proteína-proteína y SNP obtenidos mediante resecuenciación específica del exoma.

Material y métodos

Descripción de los animales y fuentes de muestras biológicas

Se obtuvieron datos y muestras de pelo del biobanco ubicado en el Laboratorio de Biotecnología Animal CBG-IPN y procedían de una población bovina (n= 104) de toros jóvenes Angus (AN, n=63) y Brangus (BR, n=41), con una edad promedio y peso corporal de 273 ± 38 días y 272 ± 38 kg, respectivamente, analizados durante dos pruebas centralizadas de rendimiento de eficiencia alimenticia basadas en la ingesta residual de alimento (IRA) en el norte de México. El registro de datos y el manejo de los animales han sido previamente descritos por Garza-Brenner *et al*⁽⁷⁾. Brevemente, los animales fueron alimentados en un corral de engorda durante un período de 70 días con un período de adaptación previo al ensayo de 20 días, pesados al principio y al final de la prueba con intervalos de 14 días en los que se realizaron las mediciones del temperamento bovino.

De la población, se realizó un GWAS utilizando un enfoque de genotipado selectivo siguiendo la estrategia de las colas de la distribución fenotípica del temperamento bovino medida por la velocidad de salida (VS) porque facilita la detección de diferencias fenotípicas entre alelos⁽¹²⁾. El genotipado selectivo se logró seleccionando un grupo de los animales más tranquilos (n= 17; 10-AN y 7-BR) y más temperamentales (n= 17; 9-AN y 8-BR) con base en los valores de VS de la población de estudio. El temperamento se evaluó mediante

mediciones de la VS después de un estímulo del muestreo de pelo en una manga midiendo la velocidad de desplazamiento de más de 1.83 m (6 pies) con un sensor infrarrojo (FarmTek Inc., North Wylie, TX, EE. UU.). La velocidad se calculó como $VS = \text{distancia (m)}/\text{tiempo (s)}$ ^(13,14). Se definieron los grupos de temperamento contrastantes con base en las mediciones de VS de los animales. Los animales con mediciones de $VS \leq 1.9$ m/s se clasificaron como tranquilos, y aquellos con puntuaciones de $VS \geq 2.4$ m/s se clasificaron como temperamentales^(14,15).

Para identificar SNP informativos en genes candidatos, se utilizaron 91 animales. Se seleccionó un total de 91 animales como población de descubrimiento de SNP: 18 (9 dóciles; 9 temperamentales) de la raza Angus, 68 (44 dóciles; 24 temperamentales) de la raza Brahman, y 5 (2 dóciles; 3 temperamentales) de la raza Charolais. A partir de muestras de cabello y muescas en las orejas, se realizó la extracción de ADN utilizando el kit de extracción GenElute™ (Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

Análisis GWAS y descubrimiento de genes

Se genotiparon treinta y cuatro (34) animales utilizando el chip GeneSeek Genomic Profiler HD 150K (Neogen, Lincoln, NE). El análisis de asociación e identificación de regiones genómicas asociadas con el temperamento bovino se realizaron con el software PLINK 1.9⁽¹⁶⁾. Se realizó un control de calidad de los genotipos para identificar animales sin genotipo asignado o con una baja tasa de genotipado ($MIND > 0.1$). También se evaluó la frecuencia de los alelos y se eliminaron los SNP con umbrales más bajos ($MAF < 0.01$). El umbral de significancia se estableció en $P < 3 \times 10^{-5}$. Se construyó un gráfico de Manhattan utilizando qqman: un paquete de R para la visualización de los resultados de GWAS⁽¹⁷⁾. Las posiciones de SNP significativos se identificaron utilizando el genoma bovino de *Bos taurus* (UMD 3.1.1) y el software Map Viewer disponible en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Los genes más cercanos a los SNP significativos (dentro de ~ 350 kb) también se identificaron con Map Viewer.

Análisis de vías e interacciones proteína-proteína

Para la identificación de las vías génicas, se realizó un enriquecimiento de términos de Ontología Génica (GO) y un análisis de red de interacciones proteína-proteína (IPP) en el navegador de genomas Ensembl⁽¹⁸⁾, la base de datos Gene Ontology⁽¹⁹⁾ y la base de datos STRING⁽²⁰⁾, respectivamente.

Resecuenciación de genes candidatos

Con el objetivo de identificar SNP en las regiones codificantes y del gen *SNCA* y sus genes interactuantes, identificados a través del análisis de interacciones proteína-proteína (IPP), estos genes se resecuenciaron en la población de descubrimiento de SNP. Como parte de la estrategia de secuenciación, además de los exones, también se analizaron regiones no codificantes (140 pb antes y después de cada gen-exón). Así, se diseñó un panel personalizado utilizando el software Design Studio (<https://designstudio.illumina.com>) (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) para el Ensayo Genético de ADN AmpliSeq, en el que se incluyeron las regiones codificantes y los límites de los genes *APP*, *PARK7*, *SLC6A2*, *SNCA*, *UCHL1*, *PARK2*, *SLC18A2* y *POMC*, utilizando el genoma UMD 3.1.1 de *Bos Taurus* como referencia.

La cuantificación de ADN se realizó en todos los pasos utilizando el kit de ensayo Qubit dsDNA HS en el fluorómetro Qubit 3.0 (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Las bibliotecas se prepararon utilizando la guía de referencia para paneles personalizados AmpliSeq (Documento # 1000000036408 v04) de Illumina, siguiendo las instrucciones para 2 grupos y para 49-96 pares de iniciadores por grupo. La calidad y cuantificación de las bibliotecas se realizó utilizando el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent, California, Estados Unidos) con el kit Agilent DNA 1000. La secuenciación (extremo pareado; longitud de lectura 126 pb) se realizó con el Sistema de Secuenciación MiniSeq™.

Análisis bioinformático de datos de secuenciación

Las lecturas de secuencia generadas por el Sistema de Secuenciación MiniSeq™ se alinearon con el genoma de referencia UMD 3.1.1 de *Bos taurus* utilizando el alineador Burrows-Wheeler (BWA-MEM) v0.⁽²¹⁾ Las lecturas se procesaron utilizando Picard v1.135 (<http://broadinstitute.github.io/picard>) y se limpiaron marcando y eliminando lecturas duplicadas para generar archivos BAM. Las variaciones se identificaron utilizando el flujo de trabajo del formato de llamada de variante genómica (GVCF, del inglés *genomic variant call format*) con HaplotypeCaller⁽²²⁾. Los SNP se generaron en archivos VCF y se filtraron utilizando los siguientes criterios: confianza de variante normalizada por profundidad (QD) <2.0, calidad de mapeo (MQ) <40.0, sesgo de hebra (FS) >60.0, HaplotypeScore >13.0, MQRankSum <-12.5 y ReadPosRank-Sum <-8.0⁽²³⁾.

Predicción del efecto de SNP no codificantes en sitios de empalme

Para estudiar el efecto de los 58 SNP identificados en las secuencias no codificantes de la secuenciación específica del exoma de los genes *SNCA* y *APP*, se utilizó la interfaz web online ESE finder3.0 (<http://krainer01.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3>)⁽²⁴⁾; las secuencias de

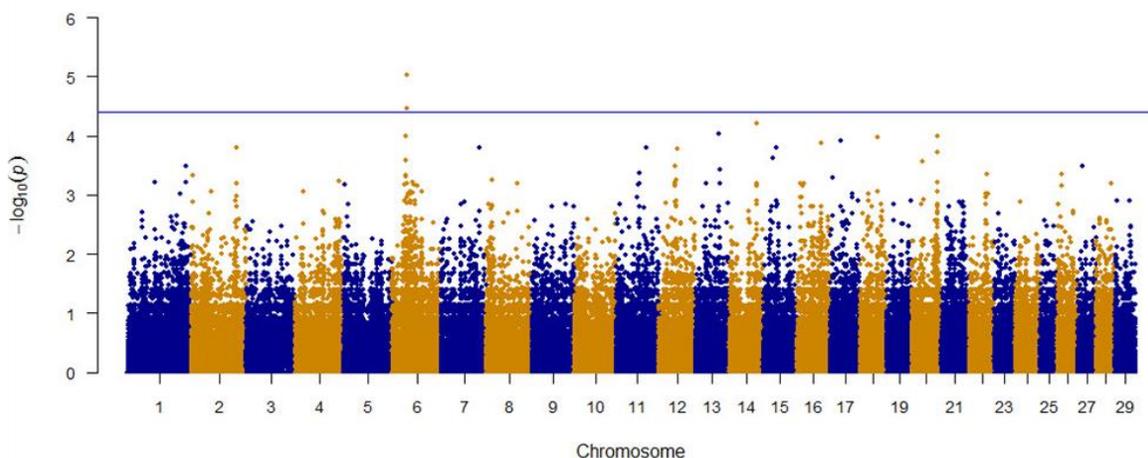
SNCA NC_037333.1 y *APP*: NC_037328.1 se utilizaron como entrada, introduciéndolas intrón por intrón (<5,000 pb) sin y con mutaciones, según la ubicación de los SNP. Este proceso permitió determinar si los SNP formaban parte de un motivo del sitio de empalme donante (5') o aceptor (3'); el programa asigna una puntuación a la secuencia de entrada de acuerdo con la pérdida de la secuencia de consenso, de modo que se predice que las puntuaciones por encima de un valor umbral predeterminado (donante: 6.67; aceptor: 6.632) actuarán como un sitio de empalme, lo que permite analizar si los SNP afectan a los motivos de los sitios de empalme.

Resultados

Análisis GWAS e identificación de genes candidatos junto con análisis de interacciones proteína-proteína

La Figura 1 muestra un gráfico de Manhattan con los resultados del análisis GWAS de los SNP evaluados por su asociación con el temperamento en el ganado Brangus y Angus. Rs133956611 y rs81144933 se asociaron con un temperamento dócil (Cuadro 1). Los genes *SNCA* (alfa-sinucleína; GenID 282857) y *MMRNI* (multimerin 1; GenID 516574) se encuentran aproximadamente a 222.8 y 435.9 Kb corriente arriba, respectivamente, de rs81144933; mientras que el gen *GPRIN3* (miembro 3 de la familia GPRIN; GenID 517995) se identificó a 245.7 Kb corriente abajo de rs133956611.

Figura 1: Gráfico de Manhattan de $-\log_{10}(\text{valores } P)$ para la asociación del genoma completo con la velocidad de salida



Cuadro 1: SNP asociados con el temperamento bovino en ganado Angus y Brangus

CHR	ID de rs	Posición pb	Frecuencia		Valor- <i>P</i>
			T	D	
6	rs133956611	36,676,986	0.14	0.67	9.2 E-06
6	rs81144933	36,655,249	0.20	0.70	3.48 E-05

T= temperamental; D= dócil.

La línea horizontal corresponde a un umbral significativo de $P=3 \times 10^{-5}$. Utilizando los genes identificados, se procedió a realizar un análisis IPP consultando la base de datos STRING⁽²⁰⁾. Para *MMRN1*, el análisis IPP mostró interacciones con genes como *F5* y *VWF*, involucrados en el proceso de coagulación (Figura 2), en la base de datos Gene Ontology (GO), *MMRN1* está anotado con el término GO: 0007596, llamado coagulación sanguínea. Para *GPRIN3*, el motor de búsqueda mostró interacciones entre el proceso de fosforilación codificado por los genes *LOC790121* y *OR6N1* con proteínas que están involucradas principalmente en el ensamblaje citoesquelético y la modulación de la neurotransmisión (Figura 3). La base de datos GO mostró que este gen fue anotado con el término GO:0031175, proceso biológico llamado desarrollo de proyección neuronal, progresión de una proyección neuronal desde su formación hasta la estructura madura.

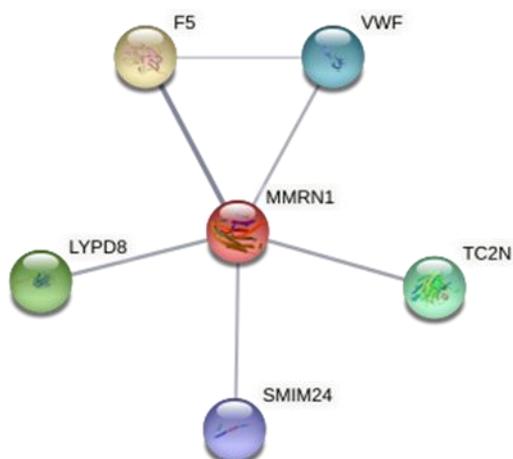
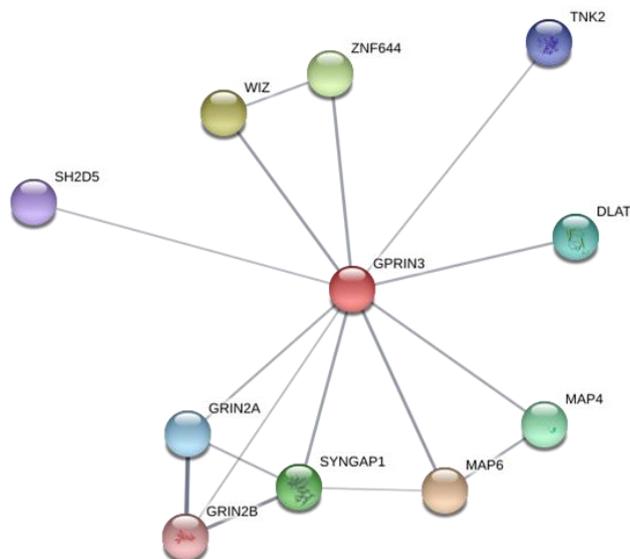
Figura 2: Interacciones proteína-proteína reportadas para *MMRN1* bovina en la base de datos STRING

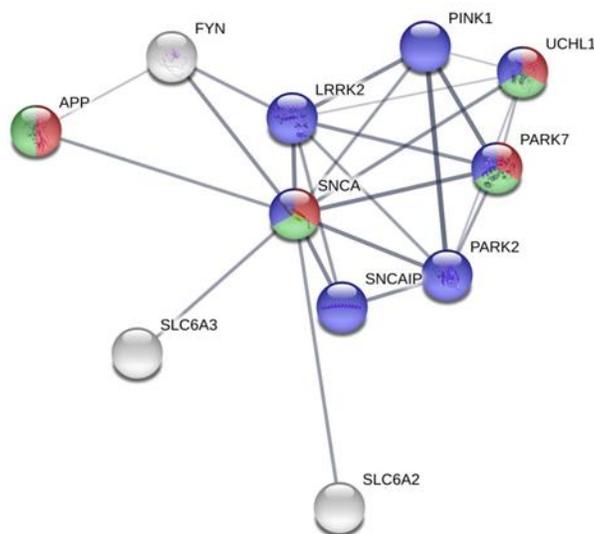
Figura 3: Interacciones proteína-proteína reportadas para *GPRIN3* bovina en la base de datos STRING



Finalmente, se encontró que la proteína *SNCA*, algunos términos GO identificados (GO: 0045920, GO: 004241 y GO: 0014059) están involucrados en la regulación, síntesis y secreción de dopamina. Curiosamente, el gen *SNCA* se asoció con los términos asociados con el comportamiento, incluidos los relacionados con el “comportamiento de vuelo” y las respuestas de los animales (a través de saltar, pararse o caminar) a estímulos internos y externos (términos GO: 0007610, GO: 0007629, GO: 0007628, GO: 0007630, respectivamente).

El análisis de IPP indicó que *SNCA* interactúa con las proteínas *APP* (proteína precursora de β -amiloide), *PARK7* (deglicasa asociada al parkinsonismo) y *UCHL1* (ubiquitina C-terminal hidrolasa L1) ($P= 5.88e-06$) involucradas en el comportamiento locomotor adulto. Además, el término GO:0008344 revela fuertes interacciones de *SNCA* con genes pertenecientes a una familia de transportadores de neurotransmisores (*SLC6A*) en la red (Figura 4).

Figura 4: Interacciones proteína-proteína reportadas para *SNCA* bovino en la base de datos STRING



Nodos rojos anotados con el término GO:0008344, comportamiento locomotor adulto (valor p 5.88E-06). Nodos verdes anotados con el término GO:0043005, proyección neuronal (valor p 0.000966). Nodos azules anotados con el ID de vía 05012 KEGG, enfermedad de Parkinson (valor p 6.49E-11).

Con base en su papel funcional reportado, *GPRIN3* y, en particular, los genes *SNCA* podrían considerarse como genes candidatos asociados con el temperamento del ganado, el análisis del gen *MMRNI* no indica implicaciones obvias para este rasgo, sin embargo, su identificación podría ser importante para un análisis posterior.

Variación genética en genes candidatos

De acuerdo con los resultados del análisis de IPP, inferimos que los genes *APP*, *PARK7*, *SLC6A2*, *UCHL1*, *PARK2*, *SLC18A2* y *POMC* fueron candidatos asociados con el temperamento bovino (Cuadro 2). Se resecuenciaron para descubrir la variación genética para explicar potencialmente el temperamento del ganado. Se encontraron cincuenta y ocho (58) SNP en las regiones no codificantes de los genes *SNCA* y *APP*. Se identificaron tres SNP en los intrones 2 y 3 del gen *SNCA*, y se identificaron 55 SNP en los intrones 1, 5, 8, 11, 13, 14 y 17 del gen *APP* (Cuadro 3). Quince de los 58 SNP eran exclusivos de la raza Angus, 1 en el gen *SNCA* y el resto en el gen *APP*. Los SNP restantes ($n=43$) fueron informativos (polimórficos) en las razas Brahman y Charolais, a diferencia de la raza Angus en la que no eran informativos (monomórficos). Las frecuencias alélicas y el patrón de distribución de los SNP variaron según la raza.

Cuadro 2: Funciones y procesos biológicos asociados con genes *SNCA* interactuantes

Gen	Descripción
<i>PARK7</i>	No hay información en ganado. En humanos, protege las neuronas dopaminérgicas contra el daño oxidativo y la degeneración; inhibe indirectamente la agregación de α -sinucleína ⁽²⁵⁾ ; por lo tanto, se ha demostrado que las mutaciones en este gen causan la enfermedad de Parkinson ⁽²⁶⁾ .
<i>SLC6A2</i>	No hay información en ganado. En humanos, controla la acción de la norepinefrina que apoya la excitación, el estado de ánimo, la atención y las reacciones al estrés; por lo tanto, se ha asociado con dimensiones temperamentales de la personalidad (búsqueda de novedad, evitación de daños, dependencia de la recompensa y persistencia) ⁽²⁷⁾ .
<i>UCHL1</i>	No hay información en ganado. En humanos, se expresa abundantemente en las neuronas e interactúa con APP, y los SNP; este gen se ha implicado en los trastornos neurodegenerativos enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer ⁽²⁸⁾ .
<i>PARK2</i>	En ganado se ha asociado con el temperamento (velocidad de vuelo) ⁽⁹⁾ y en humanos en las funciones de las neuronas dopaminérgicas debido a las mutaciones en este gen asociado a la enfermedad de Parkinson ⁽²⁹⁾ .
<i>SLC18A2</i>	En ganado se ha asociado con el temperamento (puntuación en corral) (Garza-Brenner <i>et al</i> ⁽⁵⁾). Participa en el transporte de dopamina, previniendo su acumulación y muerte neuronal dopaminérgica; por lo tanto, es un factor de riesgo para la enfermedad de Parkinson ⁽³⁰⁾ .
<i>POMC</i>	En ganado se ha asociado con el temperamento (puntuación en corral) ⁽⁵⁾ . <i>POMC</i> es el precursor de la hormona corticotrópica (ACTH), que aumenta la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC) responsable de la proliferación, diferenciación y supervivencia de las neuronas; por lo tanto, se ha implicado en la enfermedad de Parkinson ⁽³¹⁾ .

De los 58 SNP identificados en las regiones no codificantes de los genes *SNCA* y *APP*, tres SNP formaron parte de un motivo del sitio de empalme de acuerdo con los umbrales establecidos (donante: 6.67; aceptor: 6.632), como se muestra en el Cuadro 4; los SNP identificados se localizaron en los intrones 5, 8 y 11. Todos los motivos del sitio de empalme eran del tipo aceptor, es decir, estaban ubicados en el extremo 3'. El SNP g. 9770593 (C/T) no añadió ni abolió ningún motivo del sitio de empalme, sino que sólo aumentó el valor de la puntuación, mientras que los SNP g. 9806689 (G/T) y g. 9845821 (C/G) añadieron y abolieron los motivos del sitio de empalme, respectivamente.

Discusión

Los estudios genómicos dirigidos a la exploración del temperamento del ganado son aún escasos, principalmente debido a la complejidad biológica del sistema, las diferencias en la medición del temperamento (objetivo/subjetivo) y las diferencias entre las razas de ganado estudiadas. En este trabajo, se utilizaron los GWAS como una herramienta exploratoria para encontrar genes candidatos asociados con VS, contrastando por temperamento un grupo de animales Angus y Brangus. El GWAS permitió identificar una región genómica en BTA6 que alberga tres genes candidatos asociados con VS [*SNCA* (GenID 282857), *MMRNI* (GenID 516574) y *GPRIN3* (GenID: 517995)]. Para estos genes, Chen *et al*⁽³²⁾ reportaron una expresión elevada de *GPRIN3* en el cerebro humano, y la información de UniProtKB⁽³³⁾ indica que la proteína *GPRIN3* puede estar involucrada en el crecimiento de neuritas. Sin embargo, los datos de la literatura (con respecto a la función y los genes interactuantes) apoyan fuertemente el gen *SNCA* bovino como un nuevo candidato asociado con el temperamento del ganado^(9,34).

El gen *SNCA* es una proteína altamente conservada que es abundante en el cerebro de los humanos y otras especies como ratas, ratones y monos⁽³⁵⁾; se encuentra en las neuronas, especialmente en los terminales presinápticos⁽³⁶⁾. La función molecular de *SNCA* es bastante ambigua, y con base en su estructura, propiedades físicas y socios interactuantes, se han propuesto varias hipótesis sobre su función normal en humanos. Por ejemplo, se cree que está involucrado en la regulación de la liberación y el transporte de dopamina⁽³⁴⁾. En consecuencia, en humanos juega un papel importante en los trastornos neurodegenerativos. Según Giasson *et al*⁽³⁷⁾, los agregados de proteína *SNCA* en humanos causan lesiones cerebrales que son características de las sinucleinopatías neurodegenerativas. El gen *SNCA* está asociado, en la Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG, por sus siglas en inglés)⁽³⁸⁾, con vías biológicas de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (ko05010) y la enfermedad de Parkinson (ko05012). Ambas enfermedades son trastornos cerebrales importantes en humanos. La enfermedad de Parkinson se caracteriza por síntomas relacionados con la locomoción (temblor involuntario, rigidez muscular e inestabilidad postural), así como depresión y psicosis, e implica la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas, presentándose la característica principal como la aparición de cuerpos de inclusión llamados cuerpos de Lewy, cuyo componente principal es *SNCA*⁽³⁷⁾.

Aunque las alteraciones patológicas relacionadas con esas enfermedades humanas no se pueden extrapolar a este modelo de estudio, este vínculo biológico proporciona alguna evidencia para apoyar los hallazgos porque la comprensión de la relación entre genotipo y fenotipo en humanos se derivó de animales modelo con mutaciones en genes ortólogos. Las especies animales grandes, como perros, cerdos, ovejas y vacas, han sido algunos de los animales modelo más importantes, principalmente porque son más similares a los humanos

que los ratones (tamaño, genética y fisiología similares). Así, los descubrimientos en humanos pueden servir como referencia para inferir efectos sobre el temperamento bovino⁽³⁹⁾.

Conectando redes genéticas para explicar el temperamento del ganado

A pesar de los escasos intentos de identificar genes y regiones genómicas subyacentes a la arquitectura genética del temperamento, hasta ahora no ha habido reportes que conecten las redes genéticas asociadas con este rasgo complejo.

El análisis de las interacciones proteína-proteína del gen *SNCA* permitió identificar y analizar seis genes adicionales, de los cuales dos miembros génicos de la familia *SLC* (*SLC18A2* y *SLC6A4*) ya han sido identificados por Garza-Brenner *et al*⁽⁵⁾ como genes interactuantes en una red proteína-proteína basada en genes relacionados con la dopamina y la serotonina. Estos autores también encontraron un SNP localizado en el gen *SLC18A2* que causa un cambio en la secuencia de aminoácidos de alanina a treonina, con efectos significativos sobre el temperamento medidos por las puntuaciones en corral. Además, el análisis IPP incluyó genes de la familia *PARK* (*PARK2* y *PARK7*), que codifican proteínas de ubiquitina ligasa, incluida la parkina RBR E3. El gen *PARK2* fue identificado por Valente *et al*⁽⁹⁾ como un gen candidato asociado con el temperamento en el ganado Nellore; los autores utilizaron la VS como prueba para evaluar el temperamento bovino. Múltiples estudios han utilizado la estrategia GWAS para identificar genes que están vinculados a fenotipos de temperamento bovino⁽⁸⁻¹⁰⁾, pero en ninguno de estos casos ha sido posible establecer interacciones entre los genes identificados, y la información de cada estudio parece ser aislada e independiente, impidiendo la clarificación de la arquitectura genética del temperamento a partir de la información disponible hasta la fecha. Además, el conjunto de genes candidatos no parece estar asociado con un proceso biológico representativo que sugiera la participación en el temperamento. La identificación de *SNCA* en el presente trabajo permite conectar los resultados de Valente *et al*⁽⁹⁾ y Garza-Brenner *et al*⁽⁵⁾, mostrando que los genes identificados a través de diferentes estrategias (GWAS y análisis de redes de interacción proteína-proteína) presentan una conexión importante. De acuerdo con estos resultados, se exploró la variación genética de estos genes en el ganado con énfasis en sus secuencias codificantes, y los resultados revelaron una alta conservación de las secuencias exónicas en los siete genes analizados. En humanos, se ha reportado una baja variación genética entre genes como *SNCA* y *UCHLI*⁽⁴⁰⁾.

Curiosamente, y según reportes anteriores, se encontró una alta variación genética en las regiones no codificantes de los genes bovinos *SNCA* y *APP*. La función exacta del gen de la proteína (*APP*) precursora de beta amiloide (A4) es desconocida, pero se ha asociado con la suavidad de la carne en cerdos⁽⁴¹⁾, puede participar en la formación de neuronas y es conocida

por su participación en la enfermedad de Alzheimer⁽⁴²⁾. Debido a que los pacientes con enfermedad de Alzheimer muestran la presencia y acumulación de proteínas *SNCA* y *APP*, se ha propuesto que pueden estar relacionadas de alguna manera. Roberts *et al*⁽⁴³⁾ han demostrado que la sobreexpresión de *SNCA* aumenta los niveles de *APP*, y ciertas mutaciones en *SNCA* aumentan el procesamiento de *APP*, por lo que el descubrimiento de mutaciones en las regiones codificantes de estos genes podría tener un impacto funcional en ellos y, por lo tanto, en el temperamento bovino.

Se ha documentado que en aproximadamente el 21 % de los genes bovinos se produce empalme alternativo⁽⁴⁴⁾. El análisis *in silico* identificó tres *APP*-SNP con el potencial de tener un efecto funcional en el proceso de empalme de pre-ARNm y, por lo tanto, la expresión del temperamento bovino. Hasta donde se sabe, no se han reportado diferentes isoformas del gen *APP* bovino, pero se ha reportado que los motivos del sitio de empalme en genes bovinos están altamente conservados en relación con los humanos⁽⁴⁴⁾. Los genes humano y bovino para *APP* son ortólogos, con el mismo número de aminoácidos (770) y una secuencia idéntica de aminoácidos. En humanos, se han identificado 8 isoformas diferentes del gen *APP* debido al empalme alternativo en los exones 7, 8 y 15, que termina la expresión del gen *APP* en las neuronas, resultando en la implicación de un papel fundamental en la enfermedad de Alzheimer⁽⁴⁵⁾. Aquí se identificaron 3 SNP que afectan, agregan y abolen los motivos del sitio de empalme en el gen *APP*, en los intrones 5, 8 y 11, por lo que probablemente podrían afectar el producto final y tener un efecto en la expresión del temperamento bovino.

En el presente estudio, se utilizó la estrategia de fenotipo contrastante para realizar un análisis GWAS exploratorio para identificar genes candidatos para el temperamento en el ganado, e incluso con la limitación del tamaño de muestra pequeño, los presentes resultados que muestran una conexión entre *SNCA* y el temperamento son consistentes con estudios GWAS más grandes. Adicionalmente, el acoplamiento de estos resultados con un análisis IPP permitió establecer conexiones entre diferentes genes que fueron previamente identificados dentro de la asociación al aparato locomotor. El mapeo fino de los genes candidatos predijo que el GWAS y los genes IPP confirmaron la existencia de SNP con el potencial de afectar el temperamento bovino. El presente estudio proporciona información valiosa que contribuye a los aún escasos esfuerzos por describir la arquitectura genética del temperamento del ganado, y muestra que esta estrategia analítica es apropiada para su aplicación en estudios con un tamaño de muestra limitado, especialmente en países donde el fenotipado para este rasgo complejo es limitado.

Conclusiones e implicaciones

Una región genómica BTA6 (36,655,249-36,676,986 pb) vecina al gen *SNCA* se asoció con el rasgo de temperamento en las razas Angus y Brangus. Se identificaron seis genes,

vinculados a SNCA, como potencialmente asociados con el temperamento. De ellos, el gen *APP* albergó tres SNP con un efecto potencial sobre el proceso de empalme de pre-ARNm y la expresión del temperamento bovino.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por becas de investigación financiadas por CONACYT e IPN (proyecto 294826, SIP 20171674) y apoyo financiero parcial de CONARGEN, A.C. para financiar las pruebas de eficiencia alimenticia. Los autores también desean reconocer a los diferentes propietarios de rebaños y al personal técnico del complejo Palomas UGRCH, que recolectaron y proporcionaron los datos y muestras utilizados en este estudio. La mención del nombre comercial, productos patentados o equipos especificados no constituye una garantía por parte del USDA y no implica la aprobación para la exclusión de otros productos que puedan ser adecuados. El USDA es un empleador con igualdad de oportunidades.

Literatura citada:

1. Buchenauer D. Genetics of behaviour in cattle. In: Fries R Ruvinsky A, editors. The genetics of cattle. CABI Publishing, Wallingford;1999:365–390.
2. Mormède P. Molecular genetics of behaviour: research strategies and perspectives for animal production. *Livest Prod Sci* 2005;93(1):15–21.
3. Schmutz SM, Stookey JM, Winkelman-Sim DC, Waltz CS, Plante Y, Buchanan FC. A QTL study of cattle behavioural traits in embryo transfer families. *J Hered* 2001; 92(3):290–292.
4. Hiendleder S, Thomsen H, Reinsch N, Bennewitz J, Leyhe-Horn B, Looft C, *et al.* Mapping of QTL for body conformation and behavior in cattle. *J Hered* 2003; 94(6):496–506.
5. Garza-Brenner E, Sifuentes-Rincón AM, Randel RD, Paredes-Sánchez FA, Parra-Bracamonte GM, Arellano-Vera W, *et al.* Association of SNPs in dopamine- and serotonin-pathway genes and their interacting genes with temperament traits in Charolais cows. *J Appl Genetics* 2016;58(3):363–371.
6. Garza-Brenner E, Sifuentes-Rincón AM, Rodríguez-Almeida FA, Randel RD, Parra-Bracamonte GM, Arellano-Vera W. Influence of temperament-related genes on live weight traits of Charolais cows. *R Bras Zootec* 2020;49:e20180121.

7. Garza-Brenner E, Sifuentes-Rincón AM, Rodríguez Almeida FA, Randel RD, Parra-Bracamonte GM, Arellano Vera W. Influence of genetic markers on the feeding behavior of yearling bulls. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2019;32(1):14-20.
8. Lindholm-Perry AK, Kuehn LA, Freetly HC, Snelling WM. Genetic markers that influence feed efficiency phenotypes also affect cattle temperament as measured by flight speed. *Anim Genet* 2014;46(1):60-64.
9. Valente TS, Baldi F, Sant'Anna AC, Albuquerque LG, Da Costa MJRP. Genome-wide association study between single nucleotide polymorphisms and flight speed in Nellore cattle. *PLoS One* 2016;11(6):1-18.
10. Dos Santos FC, Campolina PMG, De Souza PA, Ávila PMF, Ventura RV, Rosse IC, *et al.* Identification of candidate genes for reactivity in Guzerat (*Bos indicus*) cattle: a Genome-Wide Association Study. *Plos One* 2017;12(1):1-15.
11. Jiang L, Liu X, Yang J, Wang H, Jiang J, Liu L, *et al.* Targeted resequencing of GWAS loci reveals novel genetic variants for milk production traits. *BMC Genomics* 2014;15(1):1105.
12. Kurz JP, Yang Z, Weiss RB, Wilson DJ, Rood KA, Liu GE, Wang Z. A genome-wide association study for mastitis resistance in phenotypically well-characterized Holstein dairy cattle using a selective genotyping approach. *Immunogenetics* 2019;71(1):35-47.
13. Burrow HM. Measurements of temperament and their relationships with performance traits of beef cattle. *Anim Breed* 1997;65(7):477-495.
14. Curley KOJr, Paschal JC, Welsh THJr, Randel RD. Exit velocity as a measure of cattle temperament is repeatable and associated with serum concentration of cortisol in Brahman bulls. *J Anim Sci* 2006;84(11):3100-3103.
15. Burrow HM. Effect of intensive handling of zebu crossbred weaner calves on temperament. *Proc Assoc Advmt Anim Breed Genet* 1991;9:208-211.
16. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;8(3):559-575.
17. Turner SD. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. *bioRxiv* 2014;3(25):005165.
18. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res* 2018;46(D1):754-761.

19. Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, Thomas PD. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D419-D426.
20. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, *et al.* The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 2017;45(D1):362-368.
21. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009;25(14):1754–1760.
22. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, LevyMoonshine A, *et al.* From FastQ data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinf* 2013;43(1110):11101–111033.
23. Choi JW, Liao X, Stothard P, Chung WH, Jeon HJ, Miller SP, *et al.* Whole-genome analyses of Korean native and Holstein cattle breeds by massively parallel sequencing. *PLoS One* 2014;9(7):e101127.
24. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acid Res* 2003;31(13):3568-3571.
25. Dolgacheva LP, Berezhnov AV, Fedotova EI, *et al.* Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr* 2019;51(3):175–188.
26. He L, Lin S, Pan H, Shen R, Wang M, Liu Z, *et al.* Lack of association between DJ-1 gene promoter polymorphism and the risk of parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* 2019;11(24):1-11.
27. Narita SI, Kazuhiko N, Kenta N, Maki Y, Eiji O, Nobuyo I. Analysis of association between norepinephrine transporter gene polymorphisms and personality traits of NEO-FFI in a Japanese population. *Psychiatry Investig* 2015;12(3):381-387.
28. Rydning SL, Backe PH, Sousa MML, Iqbal Z, Øye AM, Sheng Y, *et al.* Novel UCHL1 mutations reveal new insights into ubiquitin processing. *Hum Mol Genet* 2017;26(6):1031-1040.
29. Bakhit YH, Ibrahim MO, Amin M, Mirghani YA, Hassan MA. *In silico* analysis of SNPs in PARK2 and PINK1 genes that potentially cause autosomal recessive Parkinson disease. *Adv Bioinformatics* 2016;9313746:1-5.
30. Brighina L, Riva C, Bertola F, Saracchi E, Fermi S, Goldwurm S, *et al.* Analysis of vesicular monoamine transporter 2 polymorphisms in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2013;34(6):1712.e9-13.

31. Shadrina M, Nikopensus T, Slominsky P, Illarioshkin S, Bagyeva G, Markova E, *et al.* Association study of sporadic Parkinson's disease genetic risk factors in patients from Russia by APEX technology. *Neurosci Lett* 2006;405(3):212-6.
32. Chen LT, Gilman AG, Kozasa T. A Candidate target for G protein action in brain. *J Biol Chem* 1999;274(38):26931–26938.
33. Chen C, Huang H, Wu CH. Protein bioinformatics databases and resources. *Methods Mol Biol* 2017;1558:3-39.
34. Siddiqui IJ, Pervaiz N, Abbasi AA. The Parkinson disease gene SNCA: Evolutionary and structural insights with pathological implication. *Sci Rep* 2016;6(1):24475.
35. Deng H, Yuan L. Genetic variants and animal models in SNCA and Parkinson disease. *Ageing Res Rev* 2014;15:161-76.
36. Campêlo CLDC, Silva RH. Genetic variants in SNCA and the risk of sporadic Parkinson's disease and clinical outcomes: A review. *Parkinsons Dis* 2017;4318416:1-11.
37. Giasson BI, Duda JE, Murray IVJ, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, *et al.* Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 2000;290(5493):985-989.
38. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* 2017;45(D1):353-361.
39. Pinnapureddy AR, Stayner C, McEwan J, Baddeley O, Forman J, Eccles MR. Large animal models of rare genetic disorders: sheep as phenotypically relevant models of human genetic disease. *Orphanet J Rare Dis* 2015;10:107-115.
40. Dong N, Zhang X, Liu Q. Identification of therapeutic targets for Parkinson's disease via bioinformatics analysis. *Mol Med Rep* 2017;15(2):731-735.
41. Lobjois V, Liaubet L, San Cristobal M, Glénisson J, Fève K, Rallières J. A muscle transcriptome analysis identifies positional candidate genes for a complex trait in pig. *Anim Genet* 2008;39(2):147-162.
42. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(12):4245-4249.
43. Roberts HL, Schneider BL, Brown DR. α -Synuclein increases β -amyloid secretion by promoting β -/ γ -secretase processing of APP. *PLoS One* 2017;12(2):e0171925.

44. Chacko E, Ranganathan S. Genome-wide analysis of alternative splicing in cow: Implications in bovine as a model for human diseases. *BMC Genomics* 2009;10(3):S11.
45. Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. APP gene family. Alternative splicing generates functionally related isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 1996;777:281-287.

Cuadro 3: SNP identificados por secuenciación específica del exoma en cada población de los genes *APP*, *PARK7*, *SLC6A2*, *SNCA*, *UCHL1*, *PARK2*, *SLC18A2* y *POMC*

Gen	Posición (pb)	Región	Alelos		Frecuencia					
					Angus		Brahman		Charolais	
			Ref	Alt	Ref	Alt	Ref	Alt	Ref	Alt
<i>SNCA</i>	36297353	Intrón 3	G	A			0.9924	0.0076	1.0	0.0
	36297374	Intrón 3	A	G			0.8500	0.1500	1.0	0.0
	36297422 ¥	Intrón 2	T	A	0.5000	0.5000				
<i>APP</i>	9674371	Intrón 1	T	C			0.9717	0.0283	1.0	0.0
	9674423	Intrón 1	A	C			0.9403	0.0597	1.0	0.0
	9674429	Intrón 1	T	A			0.9478	0.0522	1.0	0.0
	9674430 ¥	Intrón 1	T	A	0.9722	0.0278				
	9674431*	Intrón 1	A	T	0.9706	0.0294	0.9925	0.0075	1.0	0.0
	9674437	Intrón 1	T	C			1.0000	0.0	0.9000	0.1000
	9674448	Intrón 1	T	C			0.9921	0.0079	1.0	0.0
	9674451	Intrón 1	A	G			0.9921	0.0079	0.9000	0.1000
	9674455*	Intrón 1	G	A	0.6071	0.3929	0.0093	0.9907	0.5000	0.5000
	9770586*	Intrón 5	A	G/T	0.6944	0.3056/0.0	0.8772	0.0395/0.0833	0.8000	0.2000/0.0
	9770593	Intrón 5	C	T			0.3507	0.6493	1.0	0.0
	9770633	Intrón 5	G	A			0.5373	0.4627	1.0	0.0
	9803985*	Intrón 8	C	T	0.9722	0.0278	0.0944	0.9056	1.0	0.0
	9803991*	Intrón 8	A	G	0.9722	0.0278	0.0909	0.9091	1.0	0.0
	9806624*	Intrón 8	A	G	0.9167	0.0833	0.0574	0.9426	0.8000	0.2000
	9806672	Intrón 8	T	C			0.9769	0.0231	0.8000	0.2000
	9806689	Intrón 8	G	T			0.9851	0.0149	1.0	0.0
	9845631	Intrón 11	C	A			1.0000	0.0000	0.8000	0.2000
	9845821	Intrón 11	C	G			0.7177	0.2823	1.0	0.0
	9845862 ¥	Intrón 11	G	T	0.8750	0.1250				
	9845934	Intrón 11	G	A			0.9844	0.0156	1.0	0.0
	9845944	Intrón 11	G	A			0.8750	0.1250	1.0	0.0
	9845966	Intrón 11	G	A			0.9692	0.0308	1.0	0.0
	9845980	Intrón 11	A	G			0.8056	0.1944	1.0	0.0
	9863873*	Intrón 13	T	C	0.9722	0.0278	0.0522	0.9478	1.0	0.0
	9863960	Intrón 13	T	C			0.0818	0.9182	1.0	0.0

9863974¥	Intrón 13	T	C	0.6666	0.3333				
9863983¥	Intrón 13	T	C	0.0	1.0				
9863984¥	Intrón 13	G	T	0.0	1.0				
9866489	Intrón 13	G	A			0.8433	0.1567	1.0	0.0
9866528	Intrón 13	A	G			0.9925	0.0075	1.0	0.0
9866542¥	Intrón 13	A	G	0.9722	0.02				
9866545	Intrón 13	C	T			0.8433	0.1567	1.0	0.0
9866552¥	Intrón 13	T	C	0.9118	0.08				
9866569	Intrón 13	C	T			0.8624	0.1376	1.0	0.0
9879860	Intrón 13	T	C			0.7881	0.2119	1.0	0.0
9880018	Intrón 13	C	A			0.5694	0.4306	1.0	0.0
9880025	Intrón 13	G	T			0.7787	0.2213	1.0	0.0
9889605¥	Intrón 14	C	G	0.6250	0.3750				
9889627	Intrón 14	G	A			0.9462	0.0538	1.0	0.0
9889677*	Intrón 14	G	T	0.0	1.0	0.9925	0.0075	0.0	1.0
9889687¥	Intrón 14	T	C	0.4167	0.5833				
9891054¥	Intrón 14	C	T	0.5833	0.4167				
9891056¥	Intrón 14	T	C	0.5000	0.5000				
9891124¥	Intrón 14	G	T	0.4000	0.6000				
9891130¥	Intrón 14	A	G	0.4063	0.5938				
9891155¥	Intrón 14	T	G	0.4063	0.5938				
9918483	Intrón 17	C	T			0.9841	0.0159	1.0	0.0
9918506*	Intrón 17	A	G	0.1389	0.8611	0.9250	0.0750	0.2000	0.8000
9918508	Intrón 17	C	T			0.9655	0.0345	1.0	0.0
9918512	Intrón 17	C	T			0.9914	0.0086	1.0	0.0
9931517	Intrón 17	C	G			0.9924	0.0076	1.0	0.0
9931524	Intrón 17	C	G			0.9924	0.0076	1.0	0.0
9931525	Intrón 17	T	G			0.9924	0.0076	1.0	0.0
9931529	Intrón 17	C	T			1.0000	0.0000	0.9000	0.1000

* Variaciones presentes en las tres poblaciones. ¥ Variaciones específicas en la población Angus.

Cuadro 4: Resultados del buscador ESE para SNP no codificantes identificados en los genes *SNCA* y *APP*

Gen	Posición	Intrón	SNP		Secuencia del sitio	Donante/aceptor	Puntuación
APP	9770593	5	C	TS	CTCTCCCCTCGTCAGTGCTGTAGTTCAGGT	aceptor	6.74720
			T	M	CTTCCCCTCGTCAGTGCTGTAGTTCAGGT	aceptor	7.11480 ↑
	9806689	8	G	TS	-----	-----	-----
			T	M	CTTTGGATTTGCCAGGCACACTCACCTCCA	aceptor	6.81380 ↑
	9845821	11	C	TS	CTCCTTCCACAACAGAAGGCGCTATTTTAA	aceptor	6.71530
			G	M	-----	-----	-----

El nucleótido SNP se resalta en negritas en la secuencia. TS: tipo salvaje. M: secuencia con SNP no codificante. ↑ indica una puntuación mayor en comparación con la secuencia de tipo salvaje.