

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA
POSGRADO DE LA RED INSTITUCIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**

**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN DOPAMINA BETA HIDROXILASA
(DBH) Y SU ASOCIACIÓN A TEMPERAMENTO EN BOVINOS**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA**

Presenta:

M. en C. Diana Lelidett Lourenco Jaramillo

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tamaulipas el día 25 del mes Junio del año 2013, el (la) que suscribe DIANA LELIDETT LOURENCO JARAMILLO alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro B091311, adscrito al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Ana Ma. Sifuentes Rincón y el Dr. Carlos Galavíz Hernandez, y cede los derechos del trabajo intitulado “Análisis funcional del gen DBH y su asociación a temperamento en bovinos”, 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 director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Blvd. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa Tamaulipas México Tels. 01 (899) 924-36-27 y 01 (899) 925-16-56. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


M. en C. Diana Lelidett Lourenco Jaramillo

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS (SIP-14)



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamaulipas siendo las _____ horas del día _____ del mes de _____ del _____ 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:
"Análisis funcional del gen DBH y su asociación a temperamento en bovinos"

Presentada por el alumno:

Diana Lelidett Lourenco Jaramillo
Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno

Con registro:

B	0	9	1	3	1	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

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

Dr. Carlos Galaviz Hernández

Dr. Gaspar Manuel Parra Bracamonte

Dr. Juan Manuel González Prieto

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. Ninfa María Rosas García



INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA
GENÓMICA

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal del Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), bajo la dirección de la Dra. Ana María Sifuentes-Rincón y la co-dirección del Dr. Carlos Galavíz-Hernández.

DEDICATORIA

*Mi tesis de doctorado la dedico **A:***

***D**ios por darme la fortaleza para continuar adelante pese a las adversidades.*

***M**is padres por su apoyo incondicional y darme las alas para llegar muy lejos.*

***L**os que están en el cielo que siempre llevaré conmigo en el corazón y la mente.*

***G**racias por el privilegio de poder hacer lo que quiero y ser inmensamente feliz.*

AGRADECIMIENTOS

-Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México por el gran apoyo de estos cuatro años otorgado mediante el Programa de Becas para Estudios de Posgrado en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

-Al Programa Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI) de la Secretaría de Educación Pública, a través del Instituto Politécnico Nacional (IPN) por las becas otorgadas en cada semestre para la realización de mis estudios de doctorado.

-Al banco Santander y al Instituto Politécnico Nacional (IPN) con el programa de Becas Santander-ECOES, por el apoyo económico para la realización de la movilidad académica en el Instituto de Neurobiología de la UNAM en Querétaro.

-Al Dr. Ataúlfo Martínez-Torres por su gran colaboración, orientación y su tiempo, para realizar los ensayos in vitro en su laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Querétaro.

-Al Dr. Bulmaro Cisneros-Vega, del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV por su gran ayuda al facilitarme desinteresadamente las líneas celulares productoras de catecolaminas.

-Al Centro de Biotecnología Genómica (CBG) y al Doctorado en Red en Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional (IPN) por toda la cooperación prestada siempre en su momento oportuno mediante su personal académico y administrativo.

-Al Dr. Jorge Quiroz-Valiente y al M.C. Lorenzo Granados-Zurita del Centro Experimental Huimanguillo, INIFAP (Villahermosa, Tabasco) por su gran colaboración en la logística, y la toma de muestras de los animales de raza Brahman y a los propietarios de estas ganaderías Brahman, el Sr. Carlos Cruz-Mondragón y el Sr. Felipe Casanova-Lastra, por la receptividad para facilitar el

material biológico y las bases de datos para este estudio. Por la colaboración de los propietarios de las ganaderías Charolais al facilitar el material biológico y sus bases de datos.

-A mi comité revisor: Dra. Ana María Sifuentes-Rincón, Dr. Carlos Galavíz-Hernández, Dr. Gaspar Manuel Parra-Bracamonte, Dr. Ataúlfo Martínez-Torres y Dr. Juan Manuel González-Prieto, por estos cuatro años siendo mis guías, orientarme y enseñarme tantas cosas en lo profesional y en lo personal.

-A mi laboratorio de Biotecnología Animal en el CBG, donde compartimos tantos momentos de alegrías con la Dra. Ana, el Dr. Parra, el Dr. Victor Moreno, Xochitl, William, Paz, Pacheco, Luis, Ana, Paco y Gaby.

-A mis buenos compañeros del Doctorado por su amistad y por todo lo que hemos compartido, Arlette Marín, Fernando Vázquez, Sibley González, Leandro Páramo, Susana Frías, Claudia Soto, Hemma Gopal y Yajuan Fu.

-A mis amigos del CBG, de México y otras latitudes que siempre me han apoyado: familia Almora, familia Ramírez-Vega, familia Gil-Arcos, Ana María Conforto y familia, Ana María Quintela, Elaiza Díaz, Mary Jane, Rodolfo Torres, Elma Laura Salazar, Rosita, Norita Rodríguez, Maxito, Alex, Sussy Fernández, así como los que olvidé en este momento.

-A mis grandes amigas Paty Juárez y Areli Huanosta, por ser como mis hermanas, gracias por ayudarme en todo momento.

-A los integrantes del D-15, Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular de la UNAM en Querétaro, en especial por su gran ayuda para la culminación de mis experimentos, a Ernesto Mora, Marianne Mendoza y Edith Espino, gracias por todos sus consejos y su tiempo.

6.1.4.-LINEAS DE CULTIVO CELULAR PARA LAS TRANSFECCIONES.....	16
6.2.-MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	18
6.2.1.-DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS	18
6.2.2.-EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO.....	20
6.2.3.-TIPIFICACIÓN DE LOS nsSNPS	21
6.2.4.-CUANTIFICACIÓN PLASMÁTICA DE NORADRENALINA.....	21
6.2.5.-EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL	24
6.2.6.-REACCIÓN DE RT-PCR PARA LA OBTENCIÓN DEL cDNA DE DBHb	24
6.2.7.-CLONACIÓN MOLECULAR PARA LOS PRODUCTOS DE RT-PCR....	25
6.2.8.-SECUENCIACIONES BIDIRECCIONALES.....	26
6.2.9.-EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.....	26
6.2.10.-SUBCLONACIÓN MOLECULAR EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN DE MAMÍFERO	26
6.2.11.-MUTAGENESIS SITIO DIRIGIDA (MSD) PARA LA INCORPORACIÓN DEL INICIO KOZAK.....	28
6.2.12.-TRANSFECCIONES EN CULTIVO CELULAR	28
6.2.13.- EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES....	29
6.2.14.-CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE DBH POR WESTERN BLOT	29
6.2.15.-CUANTIFICACIÓN DE NORADRENALINA EN CULTIVO CELULAR	30
6.3.-MÉTODOS ESTADÍSTICOS	31
6.3.1.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS GENOTIPOS	31
6.3.2.-EVALUACIÓN DEL TEMPERAMENTO BOVINO	32
6.3.2.1.-COMPORTAMIENTO EN LA MANGA Y EN LA SALIDA.....	32
6.3.2.2.-VELOCIDAD DE SALIDA	33
6.3.3.-ELISA CUANTITATIVO DE NORADRENALINA.....	34
6.3.4.-DETERMINACIÓN DE LAS ASOCIACIONES GENOTIPO-FENOTIPO	34
7.-RESULTADOS	36
7.1.-ENSAYOS IN VIVO.....	36
7.1.1.-DIVERSIDAD ALÉLICA Y HAPLOTÍPICA EN DBH EN POBLACIONES DE BOVINOS.....	36
7.1.2.-EVALUACIÓN DEL TEMPERAMENTO BOVINO.....	41
7.1.3.-MEDICIONES DE NORADRENALINA EN PLASMA BOVINO.....	43

7.1.4.-ESTIMACIONES DE LAS ASOCIACIONES ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS EVALUADAS	44
7.2.-ENSAYOS IN VITRO	50
8.-DISCUSIÓN	53
8.1.-ENSAYOS IN VIVO.....	53
8.2.-ENSAYOS IN VITRO	63
9.-CONCLUSIONES.....	64
10.-PERSPECTIVAS	65
11.-BIBLIOGRAFÍA.....	66
12.-GLOSARIO.....	81
13.-ANEXOS.....	84

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico (desoxyribonucleic acid)
ACRS	Amplificación de sitios de restricción creados (amplification created restriction site)
ARN	Ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
BTA	Autosoma de <i>Bos taurus</i> (Autosome of <i>Bos taurus</i>)
CA	Catecolaminas (catecholamines)
°C	Grados Celsius (Celsius degrees)
DA	Dopamina (Dopamine)
DBH	Dopamina beta hidroxilasa (Dopamine beta hydroxylase)
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados (triphosphatade desoxyribonucleotides)
EP	Epinefrina o adrenalina (epinephrine or adrenaline)
He	Heterocigoto (heterozygote)
Ho	Homocigoto (homozygote)
µL	Microlitro (microliter)
mM	Milimolar (milimolar)
mL	Mililitro (mililiter)
MAO A	Monoamino oxidasa A (monoamine oxidase A)
MAO B	Monoamino oxidasa B (monoamine oxidase B)
mDBH	Forma unida a la membrana de la enzima DBH (membrane bound form of DBH)
NE	Noradrenalina o norepinefrina (noradrenaline or norepinephrine)
nsSNP	Polimorfismo de un solo nucleótido no sinónimo (non-synonymous single nucleotide polymorphisms)
pb	Pares de bases (base of pare)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (restriction fragment length polymorphisms)
rpm	Revoluciones por minuto (revolutions by minute)
sDBH	Forma soluble de la enzima DBH (soluble form of DBH)
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido (single nucleotide polymorphisms)
sSNP	Polimorfismos de un solo nucleótido sinónimo (synonymous single nucleotide polymorphisms)

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores para la amplificación de los exones I, II y XII del gen DBH y condiciones de PCR.	19
Cuadro 2. Iniciadores para la amplificación del cDNA del gen de DBH bovino por RT-PCR.	19
Cuadro 3. Estrategias de detección de los genotipos para cada nsSNPs de DBH.....	21
Cuadro 4. Frecuencias genotípicas y alélicas de los 8 SNPs del gen DBH.....	36
Cuadro 5. Equilibrio de Hardy-Weinberg por locus de DBH en cada raza bovina.....	38
Cuadro 6. Frecuencias de los haplotipos de DBH observados en dos razas bovinas.	39
Cuadro 7. Frecuencias de los haplotipos mayoritarios observados en DBH con los ocho SNPs en dos razas bovinas contrastantes por su fondo genético.	40
Cuadro 8. Clasificación de la población Brahman por temperamento en la velocidad de salida.....	42
Cuadro 9. Resumen de los porcentaje de individuos por temperamento en las tres técnicas de evaluación.....	43
Cuadro 10. Selección por haplotipos en la población tipificada de Brahman.....	43
Cuadro 11. Medias de cuadrados mínimos de las concentraciones de noradrenalina por haplotipos.	43
Cuadro 12. Medias de cuadrados mínimos y error estándar por genotipos en las 3 técnicas de evaluación del comportamiento bovino.....	45
Cuadro 13. Medias de cuadrados mínimos y error estándar por rasgo productivo para los genotipos del nsSNP 8 y el temperamento evaluado en tres pruebas (n=67).	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta biosintética y metabólica de las catecolaminas.	3
Figura 2. Estructura del gen DBH y ubicación de los ocho nsSNPs.	7
Figura 3. Células PC12.	17
Figura 4. Células HEK-293.	17
Figura 5. Células SH-SY5Y.	18
Figura 6. Estructura del vector de expresión pcDNA 3.	27
Figura 7. Análisis de correspondencia que muestra la segregación de los 21 haplotipos en las dos razas bovinas de diferente fondo genético.	39
Figura 8. Frecuencias de los siete haplotipos mayoritarios en DBH para dos razas bovinas contrastantes por su fondo genético.	40
Figura 9. Clasificación de la población general de Brahman por el temperamento en la velocidad de salida. Se estimó que los grupos son significativamente diferentes ($p < 0.05$).	41
Figura 10. Medias de cuadrados mínimos del comportamiento en la manga por genotipos del SNP 6.	46
Figura 11. Análisis de contingencia de los genotipos del SNP 6 para el temperamento en la manga.	46
Figura 12. Análisis de correspondencia en el manejo en manga para el SNP 6.	47
Figura 13. Análisis de contingencia de comportamiento por genotipos del SNP 7.	47
Figura 14. Medias de cuadrados mínimos para el SNP 7 en el comportamiento en la manga.	48
Figura 15. Productos del cDNA de DBH bovino obtenido por RT-PCR.	50
Figura 16. Gel de proteínas teñidos con Azul de Coomassie.	51
Figura 17. Western Blot de células transfectadas.	52

RESUMEN

La Dopamina Beta Hidroxilasa (DBH) es la enzima clave para la producción de noradrenalina. En un estudio previo de este gen se han encontrado 62 polimorfismos, entre los cuales, ocho son no sinónimos (nsSNPs) y constituyen el eje central del presente estudio. Donde primeramente se establecieron las frecuencias alélicas y genotípicas para la validación de los polimorfismos, observándose significativas diferencias inter-razas bovinas según su fondo genético siendo los genotipos sin mutaciones (AA) más frecuentes en Charolais (0.731 a 1.0), mientras que en Brahman las frecuencias alélicas son a favor del alelo que posee siete de los nsSNPs (0.851-0.967). En los ocho nsSNPs existe desviación del EHW, con deficiencia de heterocigotos e inclinación hacia un homocigoto en específico; y la prueba de DL muestra que con excepción del SNP6 todos los *loci* están ligados. Se obtuvieron 21 haplotipos con una distribución específica, haplotipos exclusivos y divergencia haplotípica en las dos razas bovinas por su fondo genético.

Para el análisis *in vivo*, se realizaron tres pruebas de temperamento (velocidad de salida, comportamiento en la manga y comportamiento a la salida) en 67 bovinos Brahman de élite. La población de análisis fue clasificada con base a los resultados de cada prueba, en la velocidad de salida la mayoría de la población es de temperamento intermedio y toda la población presenta una distribución normal, mientras que en la evaluación de comportamiento en la manga el grupo más numeroso es calmado con el 76% y en la evaluación del comportamiento en la salida los tres grupos presentan valores más semejantes estando repartidos equitativamente.

La asociación de estos parámetros de comportamiento con el genotipo de DBH mostró que los genotipos del SNP 6 en las evaluaciones del comportamiento en la manga, muestran un efecto significativo ($p=0.0326$) encontrándose que son más calmados los individuos de genotipo AA, y esto podría explicarse por la selección empírica del ganado, hacia aquellos de comportamiento más manejable y calmado.

Se observaron también dos tendencias entre el SNP 7 en el temperamento medido en la manga ($P=0.136$) siendo más calmados los homocigotos del alelo G, y para los genotipos del SNP 8 en el temperamento medido en la salida ($p=0.1$).

Adicionalmente, en esta población se determinaron las concentraciones plasmáticas de noradrenalina, las cuales fueron inferiores a 550 pg/ml, los animales que portan el haplotipo 1/1 poseen 514.13 pg/ml de noradrenalina, para el haplotipo 1/3 se obtuvo 485.84 pg/ml y para el haplotipo 3/3 (homocigotos mutados AA) 371.20 pg/ml. Las concentraciones de noradrenalina en los tres haplotipos no son estadísticamente significativos ($P>0.05$), pero la diferencia entre los dos genotipos homocigotos presento una tendencia ($P=0.1803$).

En los ensayos *in vitro* se realizó la construcción de plásmidos recombinantes del cDNA de DBH con y sin los nsSNPs, los cuales se transfectaron en tres líneas celulares de mamífero (HEK 293, PC12 y SH-SY5Y). El análisis de Western Blot no mostró señales de expresión de los plásmidos transfectados lo cual fue corroborado mediante la cuantificación de noradrenalina con una prueba de ELISA, este resultado puede deberse a la inestabilidad de la proteína y por la inestabilidad estructural del gen de DBH.

SUMMARY

Dopamine beta hydroxylase (DBH) is the key enzyme for the production of noradrenaline. In a previous study of this gene have been found 62 polymorphisms, among which eight are non-synonymous (nsSNPs) and are central to this study. Where first settled allelic and genotypic frequencies for validation of polymorphisms, significant differences observed inter-breeds of cattle according to their genetic background genotypes being without mutations (AA) more frequent in Charolais (0.731 to 1.0), while Brahman the allelic frequencies are in favor of the allele that has seven of the nsSNPs (0.851-0.967). In the eight nsSNPs EHW deviation exists, and heterozygous deficient homozygote tilt specific, and DL test sample except SNP6 all loci are linked. Twenty one haplotypes were obtained with a specific distribution, exclusive haplotypes and divergence haplotype in the two cattle breeds by their genetic background.

For *in vivo* analysis, there were three tests of temperament (exit velocity, behavior in chute and behavior in exit) in 67 elite Brahman cattle. Analysis population was classified based on the results of each test, the exit velocity in most of the population is intermediate temperament the entire population has a normal distribution, whereas the assessment of behavior in chute 76% of population is calm, and the assessment of behavior in exit, the three groups have similar values being shared fairly.

The association of these behavioral parameters with DBH genotype showed, that genotypes of SNP 6 in the behavior in chute, show a significant effect ($p = 0.0326$) were found to calmer AA genotype individuals, and this could be explained by the empirical selection of cattle, to those of more manageable and calm behavior. Two trends were also observed, between SNP 7 with the behavior in chute ($P = 0.136$) being calmer G homozygotes, and genotypes SNP 8 with temperament measured in exit ($p = 0.1$).

Additionally, in this population, plasma concentrations of noradrenaline, which were less than 550 pg/ml, animals carrying the haplotype 1/1 possess 514.13 pg/ml of norepinephrine, for haplotype 1/3 was obtained 485.84 pg/ml and for the haplotype 3/3 (mutant homozygous AA) 371.20 pg/ml. Noradrenaline concentrations in the three haplotypes are not statistically significant ($P > 0.05$), but the difference between the two homozygous genotypes presented a trend ($P = 0.1803$).

In assays performed *in vitro*, construction of cDNA recombinant plasmids with and without DBH nsSNPs, which were transfected three mammalian cell lines (HEK 293, SH-SY5Y and PC12). Western Blot analysis showed no evidence of expression of transfected plasmids which was confirmed by quantification of noradrenaline with ELISA test, this result may be due to protein instability and structural instability DBH gene.

1.-INTRODUCCION

Las razas bovinas en su mayoría se encuentran genéticamente aisladas por la selección que ha realizado el hombre hacia rasgos de interés económico, como características productivas, resistencia a enfermedades y facilidad de manejo. La variabilidad fenotípica es el reflejo de la varianza genotípica inter-razas bovinas, la cual, en las últimas décadas ha comenzado a ser explorada, encontrándose genes de gran importancia que determinan el fenotipo, la productividad y la salud de los animales, siendo así, una herramienta que incorporada en los programas de mejoramiento permite seleccionar animales élite con el más alto valor genético para la próxima generación y obtener un aumento exponencial en la productividad ganadera.

Entre las características fenotípicas que afectan la productividad, el temperamento animal, es fundamental en la regulación biológica y manifiesta el bienestar del animal, por lo tanto, afecta directamente su productividad (Mormède, 2005), sin embargo, actualmente existen pocos estudios del temperamento a nivel genético-molecular, debido al complejo sistema epistático que lo debe enmarcar, pero el análisis de genes candidatos y polimorfismos nucleotídicos inter-razas es una estrategia que se ha propuesto como alternativa para elucidar algunos de los genes con efecto mayor en este rasgo.

Se ha demostrado que existen diferencias significativas en el temperamento entre razas de fondo genético *Bos taurus taurus* (*B.t. taurus*) y razas *Bos taurus indicus* (*B.t. indicus*) (Hearnshaw *et al.*, 1984), es mayor la distancia de fuga en ganado Brahman que en razas taurinas (Grandin, 1980b) y estas diferencias fenotípicas pueden ser el efecto de las variaciones genéticas que repercuten en las funciones biológicas en genes candidatos.

Estudios en diversas razas bovinas indican que el comportamiento afecta varias características de la eficiencia productiva, como el crecimiento, la eficiencia alimenticia en ganado de carne (Nkrumah *et al.*, 2007b), la respuesta inmunológica, el crecimiento y la reproducción (Burdick *et al.*, 2011b) y la producción láctea (Hiendleder *et al.*, 2003). En resumen, se considera que el comportamiento refleja el bienestar del animal y afecta directamente su productividad, al modificar su balance general y gasto energético diario, si los animales se enfrentan a diversos

agentes estresantes, los que pueden ser agudos o crónicos, siendo estos últimos los que impactan más significativamente en los rasgos de productividad bovina.

Hasta ahora, se han realizado estudios en especies como ratón (Brodkin *et al.*, 2002), (Turri *et al.*, 2001), perros (Hejjas *et al.*, 2007b), (Maejima *et al.*, 2007), (Ito *et al.*, 2004), (Topál, 2009), (Arata *et al.*, 2008), lobos (Hejjas *et al.*, 2007a), caballos (Momozawa *et al.*, 2005), gallinas (Sugiyama *et al.*, 2004), monos (Arnsten *et al.*, 2000; Bailey *et al.*, 2007), la mosca de la fruta (Edwards *et al.*, 2006) y aves (Korsten *et al.*, 2010), donde se han estudiado variaciones del comportamiento y sus causas genéticas, analizando diversos polimorfismos en genes que codifican enzimas biosintéticas, receptores o enzimas del metabolismo (Tochigi *et al.*, 2006) de los neurotransmisores de las rutas tanto dopaminérgica como serotoninérgica.

Entre estos, destaca el gen que codifica para la Dopamina Beta Hidroxilasa (DBH), enzima indispensable para la síntesis de noradrenalina. El gen DBH ha sido estudiado ampliamente en humanos y diversas especies animales. En particular en bovinos, se han encontrado 62 polimorfismos (Lourenco-Jaramillo *et al.*, 2012), entre los cuales, ocho SNPs son no sinónimos (rs109440428, rs109353933, rs110234325, rs110606764, rs109388371, rs109805094, rs110864292 y rs110796564) y constituyen el eje central del presente estudio, para determinar la variabilidad genética y evaluar su efecto en rasgos productivos de dos razas bovinas de fondo genético contrastante.

2.-ANTECEDENTES

2.1-GEN DOPAMINA BETA HIDROXILASA (DBH)

El sistema catecolaminérgico ha sido estudiado por más de un siglo, tiempo durante el cual, numerosos estudios han permitido clarificar diversos aspectos acerca de este complejo sistema. En 1897, la adrenalina (A) fue la primera catecolamina identificada (Abel, 1897), luego en 1946 fue descubierta la noradrenalina (NA) (Von Euler, 1946) como el precursor de la adrenalina, por último, en 1958 fue identificada la dopamina (Carlsson, 1959).

La enzima DBH sintetiza de norepinefrina o noradrenalina (N) a partir de la hidroxilación de dopamina (DA) en los gránulos cromafines (Kirshner, 1962) (figura 1).

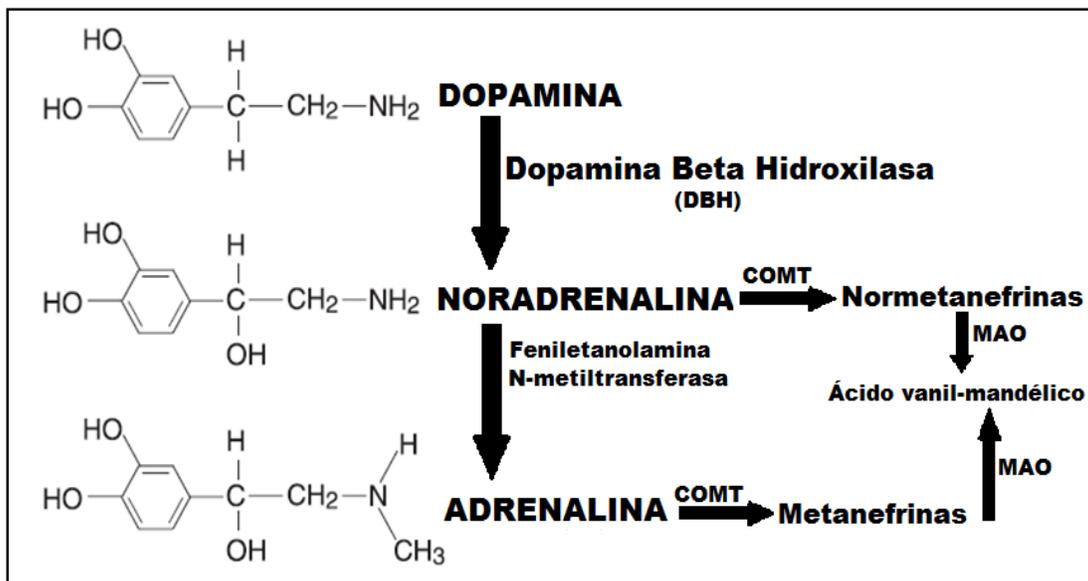


Figura 1. Ruta biosintética y metabólica de las catecolaminas.

La biosíntesis de las catecolaminas es regulada por diferentes enzimas como la de DBH, que se encuentra en las vesículas cuando la dopamina es transformada en noradrenalina y liberada por exocitosis, este proceso de biosíntesis se incrementa bajo condiciones particulares como los cambios en la expresión genética de las enzimas, splicing alternativo del RNA y modificaciones post-traduccionales que generan variaciones de la actividad enzimática (Garland *et al.*, 2002).

La enzima DBH (E.C. 1.14.17.1) a través de su producto (la noradrenalina) realiza importantes funciones a nivel del sistema nervioso central (SNC) y a nivel hormonal por ser un modulador fisiológico, por ejemplo, en el desarrollo fetal y en el sistema inmune mediado por las células T (Thomas *et al.*, 1998). La noradrenalina es el mayor neurotransmisor post-ganglionar del sistema nervioso simpático, liberándose en la médula suprarrenal en respuesta a situaciones de estrés, fuga o defensa; su liberación masiva tiene efectos hormonales en todo el organismo, como el incremento en la liberación de glucosa, el mantenimiento de la homeotermia y el aumento de las respuestas cardíaca y respiratoria. En resumen, la noradrenalina es vital para la homeostasis corporal por su participación en amplias funciones fisiológicas, cognitivas y de comportamiento (Arnsten, 2000b), (Grace *et al.*, 1998a).

La DBH se localiza en las neuronas noradrenérgicas en dos formas soluble (sDBH) y unida a la membrana (mDBH) de las vesículas secretoras de noradrenalina y adrenalina en las células neurosecretoras (Winkler, 1976), (Cubells, 1998). Estas células se concentran principalmente en el locus ceruleus y se proyectan a numerosas áreas subcorticales y neocorticales del cerebro que están enriquecidas con las fibras que contienen noradrenalina (Amaral *et al.*, 1977; Moore *et al.*, 1979c).

En ratones, se ha estudiado que los comportamientos sociales y la agresividad poseen una influencia de la vía dopaminérgica, ya que mediante una disminución de las funciones noradrenérgicas específicamente en ratones knock-out del gen dopamina beta hidroxilasa (*DBH*^{-/-}) se demostró la deficiencia en la discriminación social y la disminución de la agresividad (Marino *et al.*, 2005). Por otro lado, en ratones doble knock-out para MAOA y MAOB (Monoamino oxidasa A y B), se observó alteraciones del comportamiento como ansiedad, persecución y escape aunado al incremento de las catecolaminas, sustratos de MAOA y MAOB (Chen *et al.*, 2004), previa comprobación de que en situaciones de estrés decrece sustancialmente la actividad metabólica de MAO A y B (Obata *et al.*, 1994).

En los últimos años, los estudios genéticos de DBH asociados a enfermedades humanas han sido el centro de algunas investigaciones, permitiendo descubrir la secuencia del gen, sus elementos reguladores, polimorfismos y la variabilidad genética del gen en diferentes especies. En el caso particular de los humanos, los polimorfismos del gen DBH han sido asociados a las

alteraciones en la actividad plasmática de DBH y a las concentraciones de noradrenalina, relacionándose fuertemente a diferentes enfermedades neurológicas, como Parkinson (Weintraub *et al.*, 2006), (Kimber *et al.*, 2008), (Voon, 2007), esquizofrenia (Grace *et al.*, 1998b; Arrufat *et al.*, 2000), (Laruelle *et al.*, 1996), (Reynolds, 1983), déficit de atención e hiperactividad (Muller *et al.*, 2010), (Viggiano *et al.*, 2003), (Arnsten, 2000a).

Además, se ha establecido que existe una asociación alélica del gen de DBH con la susceptibilidad a la migraña típica (Lea *et al.*, 2000) (Todt *et al.*, 2009) y se determinó que un SNP ubicado en el promotor de DBH (-1021C→T) afecta en un 52% la actividad plasmática de DBH y se asocia a la migraña (Fernandez *et al.*, 2009), (Cubells, 1998).

Asimismo, algunas variaciones genéticas en el gen de DBH han sido asociadas con diversos comportamientos como la respuesta a drogas como las anfetaminas (Hoebel, 1985), el comportamiento materno (Thomas *et al.*, 1997), el comportamiento impulsivo (Adriani *et al.*, 2009), la motivación y aprendizaje (Luksys *et al.*, 2009), así como la alimentación (Geiger *et al.*, 2009), (Szczyпка *et al.*, 1999), donde se ha determinado que existe una relación entre el comportamiento de alimentación y la deficiencia de catecolaminas, porque el déficit de dopamina deteriora la actividad motora, se disminuye la búsqueda de alimento y los animales no comen suficiente, por ende no hay ganancia de peso (Marino *et al.*, 2005).

Los análisis que se han ejecutado en esta temática han establecido que las neuronas dopaminérgicas tienen un rol fundamental en el control del comportamiento de alimentación ya que las lesiones en el sistema nigro-estriatal con 6-OHDA (6-hidroxidopamina) produce afagia y adipsia, por lo tanto, el sistema nigro-estriatal es crítico para aspectos sensomotores del comportamiento de alimentación (Ungerstedt, 1971), (Zis *et al.*, 1975b), (Zis *et al.*, 1975a).

Otros estudios con antagonistas dopaminérgicos indican que se reduce el efecto de reforzamiento de la alimentación, otros reportan que se presenta un incremento en el metabolismo central de dopamina con la alimentación de ratas después de un período de privación de alimentos, esta ha sido la primera clara correlación entre el sistema mesolímbico dopaminérgico y la alimentación, luego se han realizado otros estudios que determinan el incremento dopaminérgico en áreas como el hipotálamo, el núcleo accumbens y la amígdala, así como aspectos específicos

de la alimentación como el tiempo de duración, el tipo de alimento y la cantidad (Biggio *et al.*, 1977), (Heffner *et al.*, 1980), (Zigmond *et al.*, 1980), (Blackburn *et al.*, 1986), (Breese *et al.*, 1973), por lo cual, se vislumbra que probablemente el control genético de la alimentación se encuentre en los genes implicados en la biosíntesis de las catecolaminas, como DBH.

De la misma manera, se han realizado varios estudios de DBH en diversas poblaciones humanas en búsqueda que establezca asociaciones con diversas enfermedades, como por ejemplo, la enfermedad congénita autosómica recesiva donde una serie de mutaciones en el gen de DBH producen una deficiente actividad enzimática, ausencia plasmática de adrenalina y noradrenalina aunado al incremento de dopamina y en consecuencia producen hipotensión ortostática severa y desórdenes cardiovasculares (Weinshilboum *et al.*, 1975), (Timmers *et al.*, 2004), (Robertson *et al.*, 1986), (Senard *et al.*, 2006), (Garland *et al.*, 2002).

Recientemente el estudio génico de DBH se ha enfocado en determinar la correlación entre la actividad plasmática de DBH y polimorfismos en el gen, realizando evaluaciones en diversas poblaciones humanas como la Indú (Bhaduri *et al.*, 2008), poblaciones Afroamericanas (Tang *et al.*, 2007), Europeas y Japonesas (Zabetian *et al.*, 2001), Alemanes y Americanos-Europeos (Zabetian *et al.*, 2003), Croatas (Pal *et al.*, 2009). También, se ha tratado de relacionar la hipertensión y la diabetes con la actividad plasmática de DBH (Cubeddu *et al.*, 1981).

2.2.-EL GEN DBH EN BOVINOS

El gen DBH bovino se localiza en el cromosoma 11, de la posición 104554824 a la 104572619 (NCBI Gene ID: 280758) el gen está formado por doce exones y once intrones, en la figura 2 se observa que cada exón e intrón posee un tamaño variable.

Su secuencia está catalogada como AC_000168.1 en la base de datos del NCBI pero estos registros de DBH tanto su gen, RNAm y proteína (EC 1.14.17.1) han cambiado en pocos años, ya que en 2009 estaba reportado que el gen poseía 17798 pb y posteriormente fue modificado, en la última actualización al 16 de marzo de 2013, se encuentra que tiene 17796 bp con cambios en casi todos los exones, así mismo ha cambiado el codón de inicio y de stop, el RNA mensajero (NM_180995.2), el cDNA reportado y más aún la proteína que anteriormente contaba con 597 aminoácidos (siendo 19 el péptido señal) y hoy en día se reporta que posee 610 aminoácidos con

31 aminoácidos que conforman el péptido señal (NP_851338.1), esto es debido a fuertes discrepancias que existen en cuanto a la transcripción y traducción del RNA, por lo cual, para el presente estudio empleamos la información más actualizada del NCBI.

A nivel molecular es importante destacar como antecedente más directo, el estudio realizado por Lewis (Lewis *et al.*, 1990), donde partiendo de una librería de cDNA de médula adrenal se obtuvo la secuencia codificante completa de DBH bovina, con un cDNA de 2.4kb que codifica para la proteína de DBH de 597 aminoácidos de 66KDa, adicionalmente obtuvieron un segundo RNA de 5.5kb expresado en cuatro copias menos y que genera la proteína de 68kDa, la cual, podría representar una forma alternativa de DBH como la forma de DBH que es unida a la membrana. Además, observaron mediante Western Blot dos bandas inmunoreactivas de 75KDa, que pueden corresponder a las dos formas de DBH reportadas por otros investigadores (Wallace *et al.*, 1973), (McHugh *et al.*, 1985), (Sabban *et al.*, 1983b), (Sabban *et al.*, 1983a), (Saxena *et al.*, 1983).

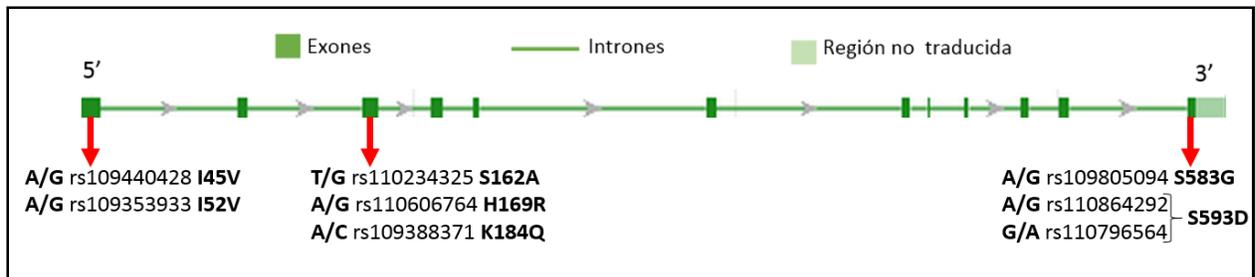


Figura 2. Estructura del gen DBH y ubicación de los ocho nsSNPs.

En un estudio previo, realizado por Lourenco (Lourenco-Jaramillo, 2009) se secuenció el gen DBH en once individuos de cuatro razas bovinas de diferente fin productivo y fondo genético. El análisis de las secuencias nucleotídicas permitió identificar 62 cambios nucleotídicos, de estos, 41 cambios (66%) se ubican en los intrones y 21 SNPs (34 %) se localizan en los exones, donde ocho son cambios no sinónimos modificándose la inserción aminoácídica (nsSNPs) y 13 son cambios sinónimos (sSNPs), determinándose que en este gen la frecuencia de cambios exónicos es de un SNP cada 85pb (1775 pb/21 SNPs).

Los ocho cambios no sinónimos (nsSNPs) detectados en el gen de DBH se localizan en los exones I, III y XII formando parte del dominio funcional enzimático. Por ello, son de gran importancia y conforman el antecedente directo para la presente investigación, ya que los análisis *in silico* empleando la base de datos PFAM 23.0 del Instituto Sanger (Punta *et al.*, 2012), el programa IPTREE-STAB (Huang *et al.*, 2007) y la base de datos ELM (Puntervoll *et al.*, 2003), sugieren que se modifican las características de los aminoácidos incorporados en la proteína funcional, todos los cambios son termodinámicamente desestabilizantes de la proteína DBH, debido a que modifican la estabilidad de las hojas beta, esto podría implicar modificaciones significativas en la funcionalidad biológica.

La presencia de dos nsSNPs (A17299G y G17300A en individuos analizados de la raza Brahman, genera la pérdida del motivo funcional MOD_GSK3_1, el cual, es un sitio de reconocimiento para la fosforilación Serina/Treonina, estas regiones en otras proteínas son muy importantes para la funcionalidad y por lo cual, se podría decir hipotéticamente que estas alteraciones generarían modificaciones en las características de la proteína y afecta la actividad enzimática de DBH.

Por otra parte, se han realizado varios estudios donde se determina la concentración plasmática de diversas catecolaminas y se ha establecido que se presentan en sangre de humanos y animales experimentales con las mismas características inmunobioquímicas que en otros tejidos. De igual forma, su volumen circulante en plasma se incrementa en situaciones de estrés y decrece en ratas tratadas donde existe destrucción de las terminaciones nerviosas simpáticas, por lo tanto, la medición de catecolaminas en sangre se correlaciona directamente con la concentración en otros tejidos como el cerebro y con la actividad funcional de DBH y otros genes involucrados en la biosíntesis de catecolaminas como TH (Weinshilboum *et al.*, 1975).

Además, se ha determinado que la mayor variabilidad interindividual de la actividad de DBH es determinada genéticamente (Ross *et al.*, 1973), (Oxenstierna *et al.*, 1986), (Weinshilboum *et al.*, 1973) según los estudios realizados en seres humanos y no se han analizado en bovinos, por lo cual, es de gran importancia este análisis.

2.3.-EL GEN DBH COMO CANDIDATO PARA EL TEMPERAMENTO BOVINO

El temperamento bovino refleja el bienestar animal y afecta la producción, este rasgo tiene un gran impacto económico en la industria ganadera mundial con pérdidas anuales en EEUU US\$ 120 Millones y en México US\$ 31 Millones; ya que repercute en características como: el crecimiento, eficiencia alimenticia, respuesta inmunológica, calidad de la carne y producción láctea (Burrow, 1997b), (Cafe *et al.*, 2011), (Hall *et al.*, 2011), (Hulbert *et al.*, 2011), (Sewalem *et al.*, 2011), (Sutherland *et al.*, 2012).

El temperamento animal fue definido por Burrow como la respuesta de comportamiento de un animal a la manipulación por humanos (Burrow, 1997b), lo cual, comprende un amplio rango de reacciones desde la inhibición hasta la agresión, la docilidad, el miedo, el nerviosismo y el intento de fuga, donde son observables diversos parámetros como el nivel de actividad locomotriz general del animal, los hábitos persistentes, la emocionalidad, el grado de alerta y la reactividad al estrés (Hurnik, 1995). Este rasgo es afectado por la edad, las experiencias previas del animal, el sexo, la manipulación de los animales, efectos maternos, factores ambientales, la herencia, la especie y la raza; lo que hace complejo su estudio (Burrow, 1997a; Mormède, 2005).

Otros autores restringen el concepto de temperamento a la expresión o forma en que los animales perciben y reaccionan a los estímulos, principalmente aquellos que originan miedo (Boissy, 1995), (Boissy *et al.*, 1995) en esta temática son muy importantes los estudios para valorar el bienestar animal, ya que puede tener efectos negativos en la productividad (Boissy *et al.*, 1997), (Adeyemo *et al.*, 1982), (Boissy *et al.*, 1988), (Rushen *et al.*, 2010). Además, la selección de ciertos comportamientos es considerado muy útil para los humanos, según las actividades en que se empleen los animales como los perros (Schmutz *et al.*, 1998).

De forma general, el temperamento es fundamental en la regulación biológica, refleja el bienestar del animal, afecta directamente la producción animal y se encuentra estrechamente relacionado a la expresión génica a diferentes niveles, ya que cuando el ganado bovino se encuentra en condiciones de estrés, ya sea en períodos de traslado, manejo sanitario o revisión, presenta importantes cambios psicobiológicos (Beatty *et al.*, 2006). En algunos países como Estados Unidos y Australia se realiza la selección de algunas razas de bovinos por su temperamento en la manga

de manejo, evaluando en una escala desde uno para la máxima docilidad, a cinco para la máxima agresividad (Tier, 2001).

Esta reactividad psicobiológica posee un componente genético fundamental que contribuye a las diferencias individuales, por ejemplo se ha evaluado la heredabilidad de la reacción de defensa a los seres humanos en varias especies domésticas, como cerdos (Hemsworth *et al.*, 1990), bovinos lecheros de la raza Holstein (Khan, 1970), en la raza Limousin se han realizado varios estudios, donde se ha observado alta correlación genética entre la edad y el comportamiento (0.84 ± 0.20), con heredabilidades moderadas (0.11-0.31), observándose que las mediciones del temperamento fueron reproducibles y heredables, lo cual, puede responder a la selección genética del ganado, siendo el inicio del uso práctico de la evaluación genética del temperamento y la apertura a mayores investigaciones genéticas del comportamiento bovino, en virtud de las metas de los ganaderos para las diversas razas en relación a la agresividad o docilidad deseable para cada raza (Le Neindre *et al.*, 1995), (Phocas, 2006), (Benhajali *et al.*, 2010), (Grignard, 2001).

En otro análisis de parámetros productivos cárnicos se observó una alta correlación con el temperamento mediante la medición de la velocidad de salida en cruzas *B. indicus*, se indicó que la velocidad de salida puede ser un buen predictor del desempeño ya que los animales con temperamento nervioso presentan menores ganancias de peso, baja eficiencia en la conversión alimenticia y en la condición corporal (Petherick *et al.*, 2002).

En un estudio con 3594 animales de razas Brahman, Belmont Red y Santa Gertrudis, relacionando la calidad de la carne y el temperamento medido por la velocidad de salida y el comportamiento en la manga, determinaron post-destete de los animales que la heredabilidad del comportamiento medido por la velocidad de salida es 0.34, mientras que para el comportamiento en la manga fue de 0.21, con una correlación genética cruzada de las dos mediciones del temperamento de 0.96 indicando la fuerte relación genética en estas características de temperamento.

Adicionalmente, se observó que los animales con mayores tiempos de salida (más calmados, con mejor temperamento) fueron genéticamente correlacionados con mejor calidad de

la carne, al presentar menor fuerza de corte y mayor suavidad con -0.42 y 0.33 respectivamente; mientras que se observó para la evaluación en la manga y la calidad de la carne 0.39 y -0.47 respectivamente, por lo cual, la selección de bovinos mediante las mediciones del temperamento podrían emplearse en el mejoramiento de la calidad de la carne producida de ganado adaptado al trópico (Kadel *et al.*, 2006).

Por lo tanto, la evidencia teórica sugiere que es posible realizar análisis genéticos del temperamento e incluirlos en los programas de selección para mejorar el bienestar y la eficiencia productiva animal. Para esto, es indispensable conocer los mecanismos fisicoquímicos que surgen como respuesta fisiológica al estrés, por ejemplo, se ha registrado que en condiciones de estrés se incrementa la actividad del sistema simpático-adrenal aumentando la liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) con mayor producción y transporte de los neurotransmisores, así como mayor actividad del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, donde el hipotálamo libera CRF (Factor Liberador de Corticotropina), se aumenta la liberación de ACTH (Hormona Adrenocorticotropa) que estimula la producción de glucocorticoides (Cortisol y Corticosterona) en la glándula adrenal que actúan en retrocontrol de CRF y ACTH.

Al mismo tiempo, los temperamentos nerviosos o agresivos implican costos energéticos que impactan la productividad animal (Deerenberg *et al.*, 1999), estos comportamientos con alto costo energético decrecen en los animales domésticos debido a la selección para incrementar la productividad (Schutz *et al.*, 2002). Los glucocorticoides aumentan la actividad enzimática de TH, DBH y por ende, las catecolaminas, para que en conjunto se produzca mayor gluconeogénesis, lipólisis, proteólisis, que afecta la productividad animal, generando menor cantidad de carne por la proteólisis y menos volumen de leche por la disminución de oxitocina que se relaciona con el incremento de cortisol; en general el catabolismo aumentado es productivamente negativo y puede emplearse como herramienta de diagnóstico (Aguera *et al.*, 2001), (Viskupic *et al.*, 1994).

A nivel genético, no existen muchos estudios encaminados a la exploración de las características del temperamento en modelos animales, debido principalmente a la complejidad biológica del sistema, las dificultades en el manejo de estos modelos y en los análisis estadísticos.

En el ser humano la mayoría de los estudios se han basado en la búsqueda de polimorfismos en genes que codifican las enzimas y receptores que participan en las principales vías neuroquímicas. En ganado bovino, existen pocos estudios de mapeo de regiones genómicas (Wegenhoft, 2005) en ganado destinado a la producción de carne y leche (Schrooten *et al.*, 2000), (Spelman *et al.*, 1999). Por ejemplo, en 130 bovinos Canadienses de carne se evaluó el temperamento y se genotipificaron 162 microsatélites en todo el genoma bovino, determinaron la heredabilidad del temperamento en 0.36 y detectaron seis QTLs para el temperamento, estos se ubican en los cromosomas 1, 5, 9, 11, 14, 15; destacando que el gen DBH bovino está localizado en el cromosoma 11 donde se detectó ILSTS036, siendo un microsatélite de importancia (Schmutz *et al.*, 2001).

En ganado Holstein evaluando 264 marcadores genéticos distribuidos en todo el genoma bovino y evaluando el temperamento durante la ordeña por el nerviosismo, agresividad y docilidad de las vacas, se detectó un QTL en el cromosoma 29 asociado a producción láctea y temperamento, siendo el primer QTL de este tipo (Hiendleder *et al.*, 2003).

Otro estudio realizado en bovinos de tres generaciones Holstein × Charolais, donde se tipificaron 165 microsatélites y el temperamento, se identificaron 29 regiones genómicas significativas en 17 cromosomas, obteniéndose un QTL en el cromosoma 11 donde se localiza el gen DBH.

También, en el BTA 29 se ubica el gen de Tirosina Hidroxilasa (TH) indispensable en la síntesis del sustrato para DBH, en este cromosoma localizaron tres QTLs de interés, uno de los cuales fue significativo para los dos test de temperamento y puede relacionarse al QTL reportado por Hiendleder. Y no se obtuvo traslape de los QTLs relacionados a los dos ensayos de temperamento, lo cual, mantiene la hipótesis que existen diferentes factores genéticos que influyen en las respuestas de temperamento en diferentes situaciones (Gutiérrez-Gil, 2008).

Además, un estudio en bovinos Angus identificó un QTL en el BTA 29 y señalan como gen candidato al DRD4 para el temperamento en este tipo de ganado cárnico (Glenske *et al.*, 2011). Otro estudio de QTLs con 2194 marcadores evaluados (101 microsatelites y 2093 SNPs) en 20

familias y 400 crías de Angus y Charolais, determinó varios QTLs relacionados a la eficiencia alimenticia y dos de ellos se ubican en el BTA 11 (Sherman *et al.*, 2009).

Los escasos estudios genéticos en esta área hacen que el presente análisis sea innovador ya que hasta la actualidad, no se encuentran reportes de análisis a nivel molecular de los genes que participan en la vía dopaminérgica en ganado bovino.

3.-JUSTIFICACIÓN

El temperamento animal es un rasgo elemental en la regulación biológica y manifiesta el bienestar del animal. En ganado bovino, este rasgo afecta la producción y tiene un considerable impacto económico en la industria ganadera mundial.

Hasta ahora la disección del componente genético del temperamento en bovinos ha sido escasa, por lo tanto es necesario su análisis extenso, para su posible aplicación como herramienta en las estrategias de selección y manejo del ganado bovino.

La dopamina beta hidroxilasa (DBH) es la enzima clave en la producción de los neurotransmisores noradrenalina y adrenalina, que juegan un papel importante para responder a situaciones que requieren mayor desempeño físico como estrés, fuga o ataque; razón por la cual, DBH es un excelente candidato para la búsqueda de polimorfismos que se asocien a rasgos de temperamento.

Se ha reportado que el gen que codifica para DBH en diferentes especies animales muestra variabilidad genética y se ha sugerido que está representada principalmente por SNPs que pueden asociarse al comportamiento animal de las diversas razas.

En bovinos el gen DBH (DBHb) muestra una amplia variabilidad genética, reportándose 62 SNPs (anexo 1), de los cuales, ocho (13%) son del tipo no sinónimos (nsSNPs) y su análisis *in silico* permite predecir posibles cambios desestabilizantes en la proteína. El estudio de los nsSNPs en ganado bovino cobra gran importancia ya que DBH es una enzima fundamental en la vía

dopaminérgica, los resultados de este estudio se espera tengan importantes implicaciones en la disección del componente genético del temperamento en bovinos.

4.-HIPÓTESIS

Los polimorfismos no sinónimos (nsSNPs) del gen Dopamina Beta Hidroxilasa (DBH) tienen un efecto en la función enzimática de DBH y se asocian a cambios en el temperamento bovino.

5.-OBJETIVOS

5.1.-OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto funcional de ocho polimorfismos no sinónimos (nsSNPs) del gen dopamina beta hidroxilasa bovino (DBHb) y su asociación con el temperamento bovino.

5.2.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.-Determinar *in vivo* el efecto de las variantes haplotípicas del gen DBHb sobre el temperamento en poblaciones de ganado bovino.
 - 1.1.-Tipificar los ocho nsSNPs en las poblaciones bovinas bajo estudio.
 - 1.2.-Determinar la concentración plasmática de noradrenalina en las poblaciones bovinas.
 - 1.3.-Realizar las mediciones del temperamento bovino.
 - 1.3.-Establecer las asociaciones entre los haplotipos de los ocho nsSNPs de DBH, las concentraciones plasmáticas de noradrenalina y el temperamento bovino.

- 2.-Analizar *in vitro* el efecto funcional de los ocho SNPs del gen DBHb en tres líneas celulares transfectadas (HEK293, PC12 y SH-SY5Y).
 - 2.1.-Construir las recombinantes con las variantes haplotípicas del cDNA de DBHb.
 - 2.2.-Transfectar las construcciones en células HEK293, PC12 y SH-SY5Y.
 - 2.3.-Cuantificar la proteína DBH por Western Blot.
 - 2.2.-Establecer las asociaciones entre las construcciones recombinantes y la expresión protéica de DBH.

6.-MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.-MATERIALES BIOLÓGICOS

6.1.1.-MUESTRAS DE SANGRE PARA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Se tomaron muestras de sangre por venopunción de 330 individuos de las razas Charolais y Brahman de diversos hatos ganaderos, las muestras de sangre hasta su procesamiento se mantuvieron refrigeradas a 4 °C en tubos vacutainer (que declaran 7.2mg de EDTA para muestras de 4ml).

6.1.2.-MUESTRAS DE PLASMA SANGUINEO PARA CUANTIFICACIÓN DE NORADRENALINA

Fueron seleccionados 29 individuos Brahman en virtud de los haplotipos presentes, conformándose tres grupos. Por venopunción en tubos vacutainer con EDTA se extrajeron las muestras de sangre, se mantuvieron refrigeradas a 4 °C, hasta realizar la separación del plasma por centrifugación a 1500g por 15 minutos y los plasmas obtenidos se mantuvieron congelados a -70 °C hasta su análisis.

6.1.3.-MUESTRAS DE GLÁNDULAS SUPRARRENALES PARA EXTRACCIÓN DE ARN

Las glándulas suprarrenales son por excelencia el órgano blanco productor de catecolaminas, y para su obtención se realizaron varios muestreos en bovinos recientemente sacrificados para uso comercial, en el rastro Tipo Inspección Federal (T.I.F.) que pertenece a la Integradora Ganadera del norte de Tamaulipas y se ubica a las afueras de la ciudad de Reynosa, Tamaulipas.

6.1.4.-LINEAS DE CULTIVO CELULAR PARA LAS TRANSFECCIONES

Las cuatro líneas celulares fueron seleccionadas en función de sus características reportadas en el American Type Culture Collection (ATCC®) y son las que se indican a continuación:

- ✓ **PC-12 (ATCC® Catalogo No. CRL-1721™):** proveniente de glándula adrenal (feocromocitoma) de *Rattus norvegicus* (rata), son células de morfología irregular (figura 3), pequeñas con crecimiento en suspensión agregadas en racimos que producen dopamina y noradrenalina. El medio completo de crecimiento requerido para esta línea celular consiste en medio DMEM 1X (Gibco, Cat. N° 11995-081), suplementado con 5% de suero fetal bovino (Gibco, Cat. N° 10437-028), 1% de mezcla de antibióticos (penicilina y estreptomicina. Invitrogen, Cat. N° 15140-163) y 10% de suero fetal de caballo (Gibco, Cat. N° 16050130), previamente inactivado a 56 °C por 30 minutos.



Figura 3. Células PC12.

- ✓ **HEK-293 (ATCC® Catalogo No. CRL- 1573™):** se aislaron de riñón fetal de *Homo sapiens* (humano), presentan morfología epitelial y adherentes (figura 4). Estas células no producen endógenamente catecolaminas, por lo cual, se emplean como control negativo. El medio completo de propagación incluyó medio DMEM 1X (Gibco, Cat. N° 11995-081), suplementado con 5% de suero fetal bovino (Gibco, Cat. N° 10437-028) y 1% de mezcla de antibióticos (penicilina y estreptomicina. Invitrogen, Cat. N° 15140-163).

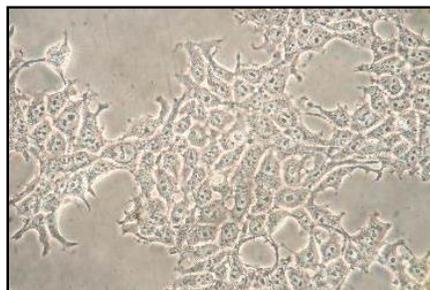


Figura 4. Células HEK-293.

- ✓ **SH-SY5Y (ATCC® Catalog No. CRL-2266™):** células de cerebro de morfología corta, fina y epitelial (figura 5), obtenida de neuroblastoma de *Homo sapiens* (humano) en 1970, estas células exhiben un nivel moderado de actividad de dopamina beta hidroxilasa (DBH). El medio completo de propagación incluyó medio DMEM 1X (Gibco, Cat. N° 11995-081), suplementado con 5% de suero fetal bovino (Gibco, Cat. N° 10437-028) y 1% de mezcla de antibióticos (penicilina y estreptomicina. Invitrogen, Cat. N° 15140-163).

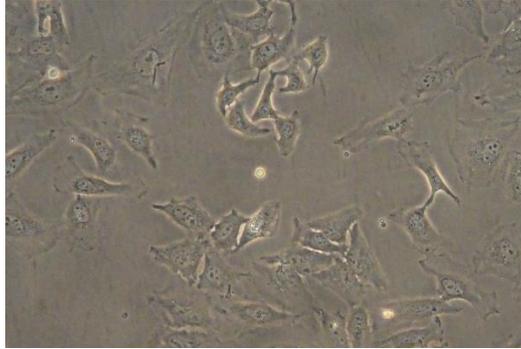


Figura 5. Células SH-SY5Y.

Para estas cuatro líneas celulares el crecimiento se realizó en una incubadora NUAIRE modelo NU-4750 a 37 °C con 95% de atmosfera de aire y 5% de CO₂. Se estableció un banco de células y la criopreservación se realizó con el medio completo específico, sin antibiótico y suplementado con dimetil sulfóxido (DMSO de Sigma, Cat. N° D2650) en cantidad óptima para cada línea, siendo 5 % para las células SH-SY5Y, mientras que para las células PC-12 y HEK-293 se empleó DMSO al 10%, se conservaron en congelación a -80 °C y en nitrógeno líquido a -176 °C.

6.2.-MÉTODOS EXPERIMENTALES

6.2.1-DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS

Se diseñaron varios juegos de oligos para diversos fines como se indican a continuación: Para la tipificación de los nsSNPs de DBH en los animales en estudio, se amplificaron los fragmentos del gen DBH correspondientes a los exones I, III y XII, bajo las condiciones previamente estandarizadas (Lourenco-Jaramillo, 2009) para cada exón empleando 60 ng ADN molde, las condiciones que varían entre los exones se resumen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Iniciadores para la amplificación de los exones I, II y XII del gen DBH y condiciones de PCR.

Exón	Nombre del Primer	Secuencia 5'-3'	Amplicón	Programa	MgCl
I	DBH1F	TGGCCGTCTTCCTGGTCATC	321	Touchdown 65	1.5 mM
	DBH1R	GGGAGGGCGAGTGCAGAGAA			
III	DBH3F	CCGGGCTTGGGGCTGTGAGT	296	Touchdown 65	1.5 mM
	DBH3R	GATGTGGTGCCGGGGAAGC			
XII	DBH12F	TTTGGTTTGGGAGAAGG	702	Touchdown 55	2.0 mM
	DBH12R	TGCACCCGTCACACTCAA			

Los programas de amplificación consisten en los siguientes ciclos:

Touchdown 65: incubar a 95°C por 5 min, (95 °C por 45 seg, 68°C por 45 seg, disminuir 2°C cada ciclo, 72°C por 45 seg) repetir por 5 veces, 95°C por 45 seg, 65°C por 45seg, 72°C por 45 seg, repetir por 30 ciclos e incubar a 72°C por 10 min.

Touchdown 55: incubar a 95°C por 5 min, (95 °C por 45 seg, 62°C por 45 seg, disminuir 2°C cada ciclo, 72°C por 45 seg) repetir por 5 veces, 95°C por 45 seg, 55°C por 45seg, 72°C por 45 seg, repetir por 30 ciclos e incubar a 72°C por 10 min.

-Para la obtención del cDNA del gen de DBH bovino por RT-PCR se diseñaron seis oligos (cuadro 2) que se optimizaron en diversas combinaciones y finalmente se seleccionó el juego constituido por los oligos F1cDBH y R1cDBH, con 1.5 mM de MgCl, para amplificar el cDNA de 1937pb, con el programa Touchdown 60: incubar a 95°C por 5 min, (95 °C por 45 seg, 65°C por 45 seg, disminuir 2°C cada ciclo, 72°C por 45 seg) repetir por 5 veces, 95°C por 45 seg, 60°C por 45seg, 72°C por 45 seg, repetir por 30 ciclos e incubar a 72°C por 10 min.

Cuadro 2. Iniciadores para la amplificación del cDNA del gen de DBH bovino por RT-PCR.

Nombre del Primer	Secuencia 5'-3'	Tm
F1cDBH	CCCAGCCATGCAGGTCCCCAGCC	73,5
F2cDBH	TCCATGTACGGCACCCGCGGTGG	70,1
R1cDBH	GGCTATTCCATGGGGGTCTT	62,4
R2cDBH	TATTCCATGGGGGTCTTCAC	60,4
R3cDBH	TCTGCAGGGACACATTTA	55,3
RincDBH	CCTGGAAGCGGACGGCCGAG	70,6

-Para agregar el inicio de consenso Kozak de eucariotas se diseñó el oligonucleótido específico para la mutagénesis sistemática que permite la incorporación de los nucleótidos circundantes al codón de inicio de la transcripción, ya que según los estudios (Kozak, 1981), (Kozak, 1986), (Lutcke *et al.*, 1987) se ha determinado que estos nucleótidos modulan la tasa de síntesis de las proteínas siendo en animales de 4 a 20 veces más con el inicio Kozak. El oligo empleado de 24 nucleótidos se indica a continuación indicándose en negritas minúsculas las bases agregadas y en negritas mayúsculas las bases modificadas en torno al codón de inicio que se indica subrayado: 5'-**gccGcCAccATGG**aggtccccagc-3'.

6.2.2.-EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO

De los animales seleccionados de las razas Brahman y Charolais se obtuvo el ADN de acuerdo al protocolo del kit GeneElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Cat. N° G1N350). Para este protocolo se emplearon 200 µL de sangre completa, que se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se agregó 180 µL de solución de lisis T y 20 µL de proteinasa K, se mezcló al vortex por 15 s y se incubó a 55 °C durante toda la noche. Se adicionó 200 µL de solución de lisis C, se mezcló en vortex 15 s y se incubó a 70 °C durante 10 minutos. Se agregó 20 µL de RNasa, se mezcló e incubó por 2 min a temperatura ambiente.

Se adicionó 500 µL de solución de preparación a la columna, se centrifugó a 12000 rpm por 1 min y se descartó la solución. Se agregó 200 µL de etanol 100% al lisado, se agitó en vortex por 20 s y se transfirió a la columna. Se centrifugó a 6500 rpm por 1 min, se transfirió la columna a un nuevo tubo y se agregó 500 µL de solución de lavado. Se centrifugó a 6500 rpm por 1 min, se trasladó la columna a un tubo nuevo y se adicionó 500 µL de solución de lavado.

Se centrifugó a 12000 rpm por 3 min, se transfirió la columna, se agregó 80 µL de solución de elusión y se centrifugó a 6500 rpm por 1 min. Se verificó y cuantificó el ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % empleando el marcador de peso molecular LAMBDA DNA (GibcoBBL® Cat. N° 25250-010) a una concentración de 50 ng/µL, una vez obtenidos los patrones electroforéticos, se calculó la concentración de cada muestra de ADN utilizando el Fotodocumentador Kodak con transiluminador de luz UV adaptado a cámara Kodak G Logic 112 y con el software Molecular Imaging.

6.2.3.-TIPIFICACIÓN DE LOS nsSNPS

Para la determinación de los genotipos de los ocho SNPs en cada bovino se aplicaron tres metodologías: PCR-RFLP, PCR-ACRS y secuenciación bidireccional para las regiones exónicas I, III y XII donde se ubican los nsSNP, previamente descritas (Lourenco-Jaramillo, 2009), (Lourenco-Jaramillo *et al.*, 2012) y resumidas en el cuadro 3.

Cuadro 3. Estrategias de detección de los genotipos para cada nsSNPs de DBH.

	Cambio Nucleotídico	Genotipos	Estrategia de detección	
EXÓN I	A/G (179 A >G)	AA	Secuenciación bidireccional	
		AG		
		GG		
	A/G (200 A >G)	AA	PCR-RFLP con <i>Acc</i> I	321 pb
		AG		321, 182 y 139 pb
		GG		182 y 139 pb
EXÓN III	T/G (4438 T >G)	TT	PCR-RFLP con <i>Hinf</i> I	197, 70 y 29 pb
		TG		226, 197, 70 y 29 pb
		GG		226 y 70 pb
	A/G (4460 A >G)	AA	PCR-RFLP con <i>Hha</i> I	193, 86 y 17 pb
		AG		193, 124, 86, 69 y 17 pb
		GG		124, 86, 69 y 17 pb
	A/C (4504 A >C)	AA	PCR-ACRS con <i>Pst</i> I	152 pb
		AC		152, 127 y 25 pb
		CC		127 y 25 pb
EXÓN XII	A/G (17269 A >G)	AA	PCR-RFLP con <i>Apa</i> I	702 pb
		AG		702, 488 y 212 pb
		GG		488 y 212 pb
	A/G (17299 A >G)	AA	Secuenciación bidireccional	
		AG		
		GG		
	G/A (17300 G >A)	GG	Secuenciación bidireccional	
		GA		
		AA		

6.2.4.-CUANTIFICACIÓN PLASMÁTICA DE NORADRENALINA

Para los análisis *in vivo* se tomaron muestras de sangre del ganado Brahman seleccionado, se hizo la cuantificación de noradrenalina empleando la prueba de ELISA con el kit Tri-CAT EIA, de ALPCO Diagnostics, Cat. N° 17-TCTHU-E01.

Las muestras plasmáticas con EDTA, almacenadas en refrigeración de 2-8°C se cuantificaron por duplicado, con el kit de ELISA competitivo que posee un antígeno unido a la

fase sólida de la microplaca, por el cual compiten los anticuerpos de los analitos (el estándar, los controles y las muestras).

Una vez que el sistema se equilibra, los remanentes de anticuerpos se eliminan por lavados y aquellos que se encuentran unidos a la fase sólida son detectados por un anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa usando TMB como sustrato y detectando la reacción a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 595 nm. La cuantificación de las muestras se realizó por comparación contra la curva de referencia de los estándares medidos por duplicado.

Inicialmente se reconstituyeron los reactivos necesarios (buffer de lavado y la solución de la enzima), para el buffer de lavado se diluyó los 20ml del buffer con 980ml de agua destilada para un volumen final de 1000ml del buffer preparado y almacenar de 2-8^oC.

La solución de la enzima se preparó al momento de ser utilizada en cada prueba, para ello, se reconstituyó el vial de la enzima con 1ml de agua destilada, se mezcló, se agregó 0.3ml de Coenzima y 0.7ml de buffer para tener el volumen final de 2ml (para cada pozo se requiere 25 μ l de la solución de la enzima).

Luego se procedió a preparar las muestras para la extracción y la acilación, en los pozos de la placa de extracción se colocaron 10 μ l de los 6 estándares y 2 controles, mientras que por las muestras 100 μ l, se agregó agua destilada en suficiente cantidad para tener en todos los pozos el mismo volumen final de 100 μ l. Se agregaron 25 μ l del buffer TE en todos los pozos, se cubrió la placa con la hoja adhesiva, se incubó por 60 min a 25^oC en el agitador aproximadamente a 200rpm.

Se eliminó el exceso por inversión de la placa sobre papel absorbente, se agregó 1ml del buffer de lavado en todos los pozos, se incubó por 5 min a 25^oC con agitación, se limpió la placa por inversión sobre papel absorbente, se repitió el lavado de los pozos una vez más, se agregó 50 μ l del buffer de acilación, se agregó 25 μ l del reactivo de acilación en todos los pozos, se incubó por 20 min a 25^oC en el agitador aproximadamente a 200rpm, se limpió la placa por inversión sobre papel absorbente, se pipetió 1ml del buffer de lavado en todos los pozos, se incubó por 5 min a 25^oC en el agitador, se limpió la placa por inversión sobre papel absorbente.

Se lavaron los pozos una vez más, se agregó 100µl de ácido hidrociorídico, se cubrió la placa con la hoja adhesiva, se incubó por 10 min a 25⁰C con agitación, se removi6 la hoja adhesiva y se tom6 del sobrenadante 90µl para la siguiente placa de microtitulaci6n para la conversi6n enzimática, se agregó 25µl de la soluci6n de enzima, se cubrió la placa con la hoja adhesiva, se incubó por 1min a 25⁰C en el agitador aproximadamente a 200rpm, se incubó por 2horas a 37⁰C.

Se agregaron 100µl del sobrenadante para la subsecuente placa enzimática, se agregó 50µl del antisuero de norepinefrina en todos los pozos, se cubrió la placa con la hoja adhesiva, se incubó por 1 min a 25⁰C en agitación, se incubó por 20 horas a 4⁰C, se removi6 la hoja adhesiva, se elimin6 el líquido excedente, se lavó cuatro veces cada pozo con 300µl de buffer de lavado, se elimin6 el excedente de líquido colocando la placa invertida sobre papel absorbente.

Se adicionaron 100µl del conjugado de la enzima en todos los pozos, se cubrió la placa con la hoja adhesiva, se incubó por 30min a 25⁰C en el agitador, se elimin6 el excedente de líquido, se lavó cuatro veces cada pozo con 300µl de buffer de lavado, se colocó la placa invertida sobre papel absorbente, se agregaron 100µl de sustrato, se incubó por 30min a 25⁰C en el agitador, se permiti6 la exposici6n directa a la luz solar, se agregó 100µl de la soluci6n stop en cada pozo, se realiz6 la lectura de la absorbancia de la soluci6n en los pozos antes de los 10min a 450nm con una longitud de onda de referencia a 595nm, usando el lector de placa de un solo canal Biotrak versi6n 1.3 de Mersham Pharmacia Biotec.

6.2.5.-EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL

A partir de muestras de glándulas suprarrenales de bovinos se realizó la extracción de ARN utilizando el estuche comercial de extracción total de ARN (Promega, Cat. N° Z3100) como se indica a continuación: para cada extracción se empleó 0.10 a 0.04g de tejido, se agregó 175 µl de buffer de lisis, se mezcló por inversión, se agregaron 350 µl de buffer de dilución de ARN, se mezcló por inversión 3-4 veces, se incubó en el termomixer a 70 °C por 3 min y centrifugó durante 10 min a 14.000 x g, para proceder a la purificación, transfiriendo a un eppendorf nuevo el sobrenadante de la solución del lisado centrifugada anteriormente (aproximadamente 500 µl).

Se agregó 200 µl de etanol al 95 % y se mezcló por pipeteo 3-4 veces, transfirió la mezcla a la columna ensamblada, centrifugó a 14.000 x g durante 1 min, se descartó el líquido eluido, agregó a la columna 600 µl de solución de lavado de ARN, se centrifugó a 14.000 x g durante 1 min, se descartó el líquido eluido y se preparó en un tubo estéril el mix de incubación de DNAasa (40 µl Buffer Yellow Core, 5 µl de MnCl₂ 0.09M y 5 µl enzima DNAasa I (mantener en hielo y mezclar el mix por pipeteo suave).

Luego se agregó 50 µl del mix de DNAasa directamente sobre toda la membrana, se incubó durante 15 min a 23 °C, agregó 200 µl de la solución de stop DNAasa, se centrifugó a 14.000 x g durante 1 min, se descartó el líquido eluido, se agregó 600 µl de la solución de lavado de ARN, centrifugó a 14.000 x g durante 1 min, descartó el líquido eluido, agregó 250 µl de la solución de lavado de ARN.

Se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min, se colocó la columna en el tubo colector final, se agregó a la membrana 100 µl de agua libre de nucleasas, se centrifugó a 14.000 x g durante 1 min y se conservó a -70 °C el ARN purificado en alícuotas y para obtener la máxima recolección se realizó una segunda elución. Se visualizó el ARN por electroforesis en agarosa al 1.2% con tiocianato de guanidina y se determinó el rendimiento y calidad del ARN purificado espectrofotométricamente en absorbancias de 230, 260 y 280, generalmente el ARN presenta ratios de $A_{260}/A_{280}= 1.7- 2.1$ y $A_{260}/A_{230}= 1.8- 2.2$.

6.2.6.-REACCIÓN DE RT-PCR PARA LA OBTENCIÓN DEL cDNA DE DBHb

Se empleó el kit de RT-PCR (Promega, Cat. N° A3500), con los oligos específicos diseñados para el cDNA y en condiciones optimizadas que se detallan a continuación: para la retrotranscripción se agregó de cada muestra el volumen equivalente a 1µg de ARN que se incubó a 70 °C por 10 minutos antes de proceder a la síntesis de la primera cadena por retrotranscripción, usando en la mezcla (2µl de Buffer de RT 10X, 4µl MgCl₂ 25mM, 2µl de mezcla de dNTPs 10mM, 0.5µl de ARNsin inhibidor recombinante de 40U/µl, 0.6µl de AMV transcriptasa reversa de 25U/µl, 1µl de random primers y agua en cantidad suficiente para completar 20µl de cada reacción).

La reacción se realizó en el termociclador MJ Research con el programa 1cadena (10min a 23°C, 60min a 42°C, 5min a 95°C, 5min a 2°C y enfriamiento mantenido a 4°C hasta su conservación a -20°C y uso posterior en la PCR específica colocando 5µl del cDNA y 20µl de la mezcla de reacción (5µL Buffer de PCR 10X + 1µL MgCl₂ + 1µL dNTPs 10mM, 0.5µL de cada oligo sentido y antisentido 20 µmol/ml , 0.5µL de Taq Polimerasa 5 U/mL + 11.5µL de agua), la reacción de PCR se ejecutó en el termociclador con el programa RTPCR (94°C x 2min, 30 ciclos de 94°C x 1min + 42°C x 2min + 72°C x 1min y un ciclo final de 72°C x 7min).

Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa al 2 % y se tomaron las fotografías correspondientes con el Fotodocumentador Kodak con transiluminador de luz UV adaptado a cámara Kodak G Logic 112 y con el software Molecular Imaging.

6.2.7.-CLONACIÓN MOLECULAR PARA LOS PRODUCTOS DE RT-PCR

Los amplicones obtenidos de las suprarrenales de individuos de los diversos genotipos y haplotipos fueron clonados primeramente usando el kit comercial StrataClone (Statagene, Cat. N° 240205).

Específicamente para el tamizaje de las clonas recombinantes se realizó la selección de las clonas, su resuspensión en 20 µL de agua miliQ estéril, de los cuales se emplearon 10 µL para la lisis por 15 minutos, luego se procedió a preparar el mix de PCR (5 µL Buffer de PCR 10X + 1.2 µL MgCl₂ + 1 µL dNTPs 10mM, 1.2 µL de cada oligo sentido y antisentido de 5 µmol/ml, 0.7 µL de Taq Polimerasa 5 U/mL + 4.7 µL de agua + 5 µL de cada clona lisada), la reacción de PCR

se ejecutó en el termociclador MJ Research con el programa TAM, los resultados se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5 % y se tomaron las fotografías correspondientes con el Fotodocumentador Kodak con transiluminador de luz UV adaptado a cámara Kodak G Logic 112 y con el software Molecular Imaging.

6.2.8.-SECUENCIACIONES BIDIRECCIONALES

Para cada clona tamizada que posee un amplicón de 2kb se procedió a realizar la secuenciación para la genotipificación, para ello, se realizó la purificación con Exo-SAP-it, se preparó la reacción de secuenciación utilizando el oligo forward del exón 3 de DBH, M13 forward y reverse, para cubrir todas las regiones de interés, luego se purificó con Xterminator® y se tomó 20 µL para cargar al secuenciador automático por capilaridad ABI PRISM 3100, las secuencias nucleotídicas fueron analizadas en el programa MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2007; Tamura *et al.*, 2011).

6.2.9.-EXTRACCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

Se realizó de acuerdo al protocolo de Sambrook (Sambrook J., 1989), donde utilizando 3 mL del cultivo bacteriano se obtiene el pellet celular, luego del proceso las pastillas de ADN plasmídico se secaron y se resuspendieron en 25 µL de agua miliQ estéril, se incubó a 37°C por 5 min a 500 rpm en el termomixer y los productos se visualizaron por electroforesis en agarosa al 1.0%.

Posteriormente el vector de expresión y los ADN plasmídicos, fueron digeridos con *Eco*RI durante 8 horas y ligados con Ligasa T4 ADN en proporción 1:5 toda la noche a 4°C para realizar la transformación en las células competentes TOP10F'.

6.2.10.-SUBCLONACIÓN MOLECULAR EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN DE MAMÍFERO

Cada muestra de cDNA seleccionada del proceso de tipificación fue empleada para la subclonación en el vector de expresión de mamífero pcDNA3 (Invitrogen, Cat. No. V795-20,

(Figura 6), el cual, posee un tamaño de 5.4kb y posee un promotor de citomegalovirus humano (CMV) que asegura el alto nivel de expresión en un amplio rango de células de mamífero.

El protocolo para la subclonación básicamente es similar al aplicado en la primera clonación molecular, pero se parte de la ligación anteriormente mencionada del vector de expresión y los ADN plasmídicos, que se transformaron en las células calcio competentes preparadas de TOP10F', posteriormente las clonas seleccionadas, fueron propagadas para la extracción del ADN plasmídico, se secuenciaron y una vez verificadas, se realizó la propagación en 50ml de medio LB para la obtención del ADN plasmídico a mediana escala (midipreps) para ser transfectadas en las diversas líneas celulares.

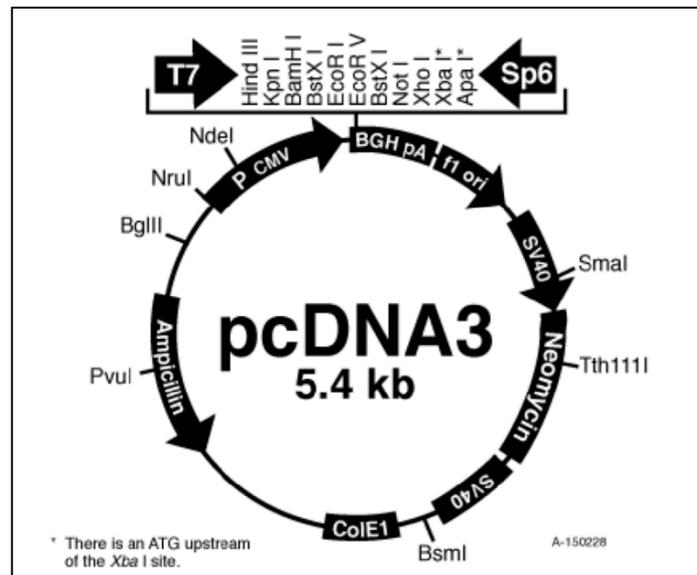


Figura 6. Estructura del vector de expresión pcDNA 3.

6.2.11.-MUTAGENESIS SITIO DIRIGIDA (MSD) PARA LA INCORPORACIÓN DEL INICIO KOZAK

Para la incorporación de la secuencia consenso Kozak de vertebrados, se utilizó el oligo creado específicamente para el gen de DBH, y se realizó la amplificación usando como material de partida la lisis de las clonas a mutar, la reacción de PCR se ejecutó en el termociclador MJ Research con el programa Touchdown 60, los amplicones obtenidos de 2 Kb, se clonaron, tipificaron, subclonaron y secuenciaron antes de propagar y realizar el midiprep con el estuche para purificación plus de ADN plasmídico (Qiagen, Cat. No. 12945), los ADN plasmídicos fueron cuantificados en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 de Thermo Scientific y se visualizó por electroforesis en agarosa al 0.8%.

6.2.12.-TRANSFECCIONES EN CULTIVO CELULAR

Las transfecciones se realizaron en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se emplearon las cuatro líneas celulares anteriormente descritas, transfectando 8µg de ADN plasmídico de cada clona de DBH y se co-transfectaron con 2.7µg de ADNp de Cherry como reportero, con 20µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen, Cat. No. 11668019) por reacción, estos se incubaron por 5 minutos, se agregó la lipofectamina sobre el medio DIMEN con ADN plasmídico, que se incubó por 25 minutos y en frascos T25 donde se han generado los crecimientos celulares en monocapa al 60% de confluencia.

Se retiró el medio y se agregó 3.5ml de medio nuevo y la mezcla de transfección de 1.5ml, se mezcló suavemente, se incubó a 37°C por 48 horas en una incubadora NUAIRE modelo NU-4750 a 37°C con 95% de atmosfera de aire y 5% de CO₂.

Se observó la fluorescencia a las 24 y 48 horas, en un microscopio Olympus CKX41 con cámara acoplada DP70 y el programa DP Controller 2002, se estimó la eficiencia de la transfección en cada procedimiento, a las 48 horas post-transfección se recolectaron las células para realizar la extracción de proteínas y su análisis posterior.

6.2.13.- EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

A las 48 horas post-transfección, se retiró el medio de las células, se lavó con 3 ml de PBS, se tripsinizaron con 1.5 ml por 3 minutos, se inactivó la tripsina con 1.5 ml de medio DIMEN completo, se transfirió a eppendorff de 1.5 ml que se centrifugaron a 13000 rpm por 3 minutos para obtener el pellet celular, se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de PBS frío, se centrifugaron a 13000 rpm por 3 minutos, se eliminó el sobrenadante.

Se pesaron los pellets y por cada 0.5g obtenido se agregó 1.0 ml de buffer de lisis de glicina pH=9.0, se realizó la homogenización de las células, se centrifugó a 13000 rpm por 20 minutos a 4 °C, se cuantificaron los extractos crudos en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 de Thermo Scientific, se prepararon las alícuotas de 0.4 mg y se congelaron a -80 °C para su uso posterior.

6.2.14.-CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE DBH POR WESTERN BLOT

Este protocolo se divide en tres secciones (PAGE, transferencia e inmunodetección) que se explican a continuación:

-Electroforesis en gel SDS-Poliacrilamida: se preparó el gel de corrida al 15% y el gel de carga al 5%. Las muestras se desnaturalizaron a 96^oC por 5 min en buffer de carga.

Se realizó la electroforesis con buffer de corrida 1X (pH=8.3) a 90V, 400mA por dos horas y media. Posteriormente de cada prueba, se tiñó un gel con Azul de Comassie (al 0.1%) colocando 5 volúmenes de la solución de tinción por toda la noche y la solución de Desteñido (metanol/acido acético glacial), se mantuvo en la plataforma de agitación por dos horas cambiando la solución 3 o 4 veces, hasta observarse correctamente y fotografiarse el gel.

-Transferencia: se preparó la cámara de transferencia vertical con el buffer Towbin (pH=8.3) en frío. Se cortaron las membranas de PVDF y el papel de filtro a las dimensiones del gel, se humedecieron las membranas en metanol y en el buffer de corrida.

Se preparó el sándwich (colocando el cassette, una fibra pad, tres hojas de papel de filtro, el gel y la membrana correctamente alineados sin burbujas, papel de filtro y fibra pad), se cerró el cassette y se colocó en el módulo de la cámara de electrotransferencia, se realizó la transferencia el cuarto frío por dos horas a 30V y 400mA.

-Inmunodetección: se desmontó la transferencia para separar la membrana del gel y proceder al bloqueo con BSA 1X en TBS por 2 horas. Se prepararon las diluciones de los anticuerpos primario (anticuerpo monoclonal primario de DBH y actina) 1:4000 en buffer TBS-1X-Tw20 frío, se incubaron las membranas con las diluciones de los anticuerpos primarios toda la noche (por 15 horas) en el cuarto frío en agitación constante.

Se lavaron las membranas tres veces en buffer TBS-1X-Tw20 por 20 min cada uno para remover los anticuerpos no unidos, se prepararon las diluciones de los anticuerpos secundarios (anti-IgG AP conjugado) a 1:2000 en buffer TBS-1X-Tw20 frío y se incubaron por dos horas con gentil agitación. Se lavaron las membranas tres veces en buffer TBS-1X-Tw20 por 20 min cada uno para remover el anticuerpo secundario no unido.

Se incubaron las membranas en la mezcla de solución reveladora para la fosfatasa alcalina hasta que las bandas de interés mostraron la intensidad deseada protegiendo la solución de la luz fuerte, las áreas reactivas se mostraron moradas después de 5 a 15 min, se detuvo la reacción cuando se obtuvo la intensidad deseada, lavando la membrana con agua desionizada.

6.2.15.-CUANTIFICACIÓN DE NORADRENALINA EN CULTIVO CELULAR

Mediante un ELISA cuantitativo con el kit Tri-CAT EIA, de ALPCO Diagnostics, Cat. N° 17-TCTHU-E01. Se determinó la producción de noradrenalina en cada línea celular (PC12 y SH-SY5Y) transfectadas con las dos construcciones (DBH sin mutaciones con inicio Kozak y la recombinante de siete nsSNPs con inicio Kozak), así como las células control sin transfección para la medición del nivel basal de producción de noradrenalina.

Para ello, todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se aplicó el factor de corrección pertinente en cada caso, después de realizar la curva de calibración y optimización de los volúmenes requeridos de medio de cultivo para la cuantificación de noradrenalina excretada al medio así como la catecolamina intracelular.

Se realizó la lectura de la absorbancia de la solución en los pozos antes de los 10min a 450nm con una longitud de onda de referencia a 595nm, usando el lector de placa de un solo canal Biotrak versión 1.3 de Mersham Pharmacia Biotec.

6.3.-MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Se realizaron diversos análisis estadísticos entre los ocho polimorfismos no sinónimos evaluados de DBH, el temperamento bovino, la actividad funcional del gen representada indirectamente por la actividad de la proteína y de noradrenalina.

6.3.1.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS GENOTIPOS

Mediante el programa Genepop (v 4.0.10) (Raymond, 1995), (Rousset, 2008) se estimaron las frecuencias genotípicas y alélicas de los ocho nsSNPs de DBH por raza bovina, estas fueron comparadas con las frecuencias esperadas, se realizó la prueba de ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) (Guo *et al.*, 1992) calculando el valor exacto de P, por el método de la cadena de Markov y el test de probabilidad por el método de Fisher; se estimó el desequilibrio de ligamiento genotípico para cada SNP con el método de Fisher, determinando X^2 , df y el valor de P.

En el programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 1995), (Excoffier *et al.*, 2005), (Excoffier *et al.*, 2010) versión 3.5.1.2, se realizó un análisis intrapoblacional calculando el número de *loci* polimórficos y se estimaron las frecuencias haplotípicas con el algoritmo EM (Expectation Maximization) estimador de máxima verosimilitud para los haplotipos en cada raza bovina evaluada. Para evaluar la influencia de los haplotipos en cada raza de diverso fondo genético, se realizó un análisis de correspondencia con el programa JMP versión 3.2.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) (Ye *et al.*, 2000).

También, se analizaron los haplotipos con el programa computacional PHASE versión 2.1.1, a partir de la información genotípica se reconstruyeron los haplotipos por población empleando en algoritmo Bayesiano (Stephens *et al.*, 2001), (Stephens *et al.*, 2005) y se construyó el árbol filogenético con el método de Neighbor-Joining (Saitou *et al.*, 1987), (Tamura *et al.*, 2004).

Para los análisis de asociación entre los locus y los rasgos productivos, se disponía de los registros fenotípicos de Peso al Nacimiento (Moore *et al.*) y Peso al Destete (Struyf *et al.*). Se realizó un análisis con el procedimiento de Modelos Lineales Generales (Generalized Linear Models, GLM) del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA), calculando las

medias de cuadrados mínimos de los genotipos para cada característica y aplicando el método de mínima diferencia significativa ($\alpha=0.01$) que tiene como objetivo describir el efecto de los genotipos de DBH (variables independientes) sobre los valores genéticos disponibles por razas (variables dependientes) y ajustado al modelo animal.

6.3.2.-EVALUACIÓN DEL TEMPERAMENTO BOVINO

La respuesta de comportamiento al manejo humano ha sido empleada en múltiples estudios previos (Burrow, 1988), (Tulloh, 1961), (Petherick *et al.*, 2009), (Grandin, 1993a), (Burrow, 1997a), (Hoppe *et al.*, 2010b) evaluándose mediante el comportamiento en la manga, comportamiento en la salida y la velocidad de salida, que se seleccionaron como indicadores del temperamento bovino para este análisis.

La consistencia en la interacción entre los genotipos evaluados de DBH y las evaluaciones del comportamiento se evaluaron con el procedimiento de Modelos Lineales Generales (Generalized Linear Models, GLM) del paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) y mediante un análisis lineal que incluyó el efecto fijo por número de partos, ya que solo se realizaron estas pruebas con vacas de una sola ganadería y los datos presentan una distribución normal en el modelo empleado.

Se realizó un análisis comparándose las medias de cuadrados mínimos mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) en el paquete estadístico SAS y la correlación de Pearson, siendo significativo con $P<0.05$ y se consideró como tendencia con $P<0.10$.

6.3.2.1.-COMPORTAMIENTO EN LA MANGA Y EN LA SALIDA

El temperamento se cuantificó mediante la observación de los animales por un evaluador calificado mediante la determinación de la prueba de Kappa, la evaluación se realizó a través de un cuestionario establecido por Grandin abarcando desde la docilidad hasta la agresión (Grandin, 1993b), cada individuo se observó cuatro veces en los videos, y se calificó en cada una de forma independiente para posteriormente calcularse la media de estas evaluaciones. El comportamiento en la manga se clasificó en 5 categorías donde los individuos clasificados con 1 ó 2 puntos son calmados, 3 puntos para animales de comportamiento intermedio, valores de 4 y 5 para aquellos temperamentales.

Mientras que la evaluación en la salida se realizó con 4 categorías donde se clasifican con un punto los calmados, 2 para los intermedios y animales temperamentales con 3 ó 4.

Estos cuestionarios previamente fueron estandarizados y validados para tal fin, por lo cual, se calculó el alfa de Cronbach para estimar la consistencia interna del cuestionario. Los valores de alfa de Cronbach mayores a 0.7 son considerados óptimos (Cronbach, 1951), (Bankstahl *et al.*, 2013).

Además, se realizó la prueba de Kappa para determinar la reproducibilidad y la consistencia entre las mediciones, valores de kappa de 0.41-0.60 como moderados y valores de Kappa de 0.61-0.80 son sustanciales, considerándose en general que valores de Kappa superiores a 0.75 son excelentes en estudios con alta reproducibilidad de las mediciones (Carletta, 1996), (Smeeton, 1985), (Landis *et al.*, 1977), (Kirkwood, 2003).

6.3.2.2.-VELOCIDAD DE SALIDA

La velocidad de salida se cuantificó según lo reportado en la bibliografía (Burrow, 1988), (Curley *et al.*, 2006), (Curley *et al.*, 2008) como el tiempo que tardan los animales en salir de la prensa y recorrer una distancia fija de 1.83 mts. Para el análisis los datos se transformaron en velocidad medida en metros sobre segundos (m/s) siendo la velocidad más baja la que corresponde a los individuos calmados y la mayor velocidad a los individuos que salen más rápido de la manga y que son nerviosos.

De las velocidades obtenidas se calculó la media poblacional y una desviación estándar, clasificando a los animales en tres grupos: el grupo 1# más calmados son aquellos que tienen velocidades por debajo de una desviación estándar de la media, el grupo 2# los animales intermedios y el grupo 3# los temperamentales que son una desviación estándar más rápidos que la media. Se realizó el análisis con el procedimiento de Modelos Lineales Generales (GLM) calculando las medias de cuadrados mínimos con el paquete estadístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA).

6.3.3.-ELISA CUANTITATIVO DE NORADRENALINA

Estos resultados se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA 92037, USA), con las curvas de calibración de los seis estándares por duplicado ($R^2=0.9995$). A partir de las absorbancias obtenidas se calcularon las concentraciones de los controles y las muestras de plasma bovino por extrapolación empleando una regresión no lineal.

Los resultados son expresados en pg/ml; se determinó la precisión intra e inter ensayo con coeficientes de variación de 7.54% y 9.56% respectivamente, la sensibilidad del método fue de 0.01ng/ml. Los resultados de las cuantificaciones de noradrenalina por grupos de haplotipos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (Makarova *et al.*) y prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, empleando el programa InStat versión 3.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA 92037, USA).

6.3.4.-DETERMINACIÓN DE LAS ASOCIACIONES GENOTIPO-FENOTIPO

Dada la disponibilidad de datos productivos (Peso al Nacimiento, Peso al Destete, Peso al Destete Ajustado a los 205 días) para los individuos de raza Brahman y para los animales de raza Charolais de Peso al Nacimiento, Peso al Destete, así como las DEP's (Diferencias Esperadas de la Progenie) estimadas para PN, PDA, PA, MT, L y T. Se realizó un análisis con el procedimiento de Modelos Lineales Generales (GLM) calculando las medias de cuadrados mínimos de los genotipos para cada característica y aplicando el método de mínima diferencia significativa ($\alpha=0.1$) del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA), ajustado al modelo animal:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: Y_{ij} = Valores genéticos.

μ = Media general de cuadrados mínimos.

G_i = Efecto fijo del i-esimo genotipo de cada SNP en el gen de DBH.

ε_{ijk} = Error aleatorio.

Se estableció por cada haplotipo la media y el error estándar de la concentración de noradrenalina, manejando como covariable el parto y el efecto fijo los SNPs; mediante una T-

Student se evaluaron las respuestas al manejo por cada SNP y por un análisis lineal que incluyó el efecto fijo por número de partos también se evaluó la respuesta al manejo por genotipo. Además, se realizó un análisis de correspondencia con el programa JMP versión 3.2.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) (Ye *et al.*, 2000) entre los SNPs y los temperamentos asignados por los resultados de las evaluaciones de comportamiento durante el manejo.

7.-RESULTADOS

7.1.-ENSAYOS IN VIVO

7.1.1.-DIVERSIDAD ALÉLICA Y HAPLOTÍPICA EN DBH EN POBLACIONES DE BOVINOS

En el cuadro 4, se presentan las frecuencias alélicas y genotípicas de los ocho nsSNPs de DBH, como puede observarse los genotipos sin mutaciones (AA) son los más frecuentes en la población de Charolais con frecuencias de 0.731 a 1.0; mientras que en la raza Brahman es inverso, con altas frecuencias genotípicas de los homocigotos mutados (BB) en la mayoría de los SNPs, con su valor máximo de 0.935 en los SNP 1, 2, 3 y 5 del gen de DBH, con excepción del SNP 6 (rs109805094), donde para las dos razas el genotipo más frecuente es AA, el cual se encuentra fijo en Charolais con el 100% de la frecuencia y en Brahman con 0.805 de la frecuencia AA y continua considerándose un SNP polimórfico ya que su frecuencia alélica es superior a 10% en Brahman.

Cuadro 4. Frecuencias genotípicas y alélicas de los 8 SNPs del gen DBH.

ID SNP	Razas	Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Alélicas	
		AA	AB	BB	A	B
SNP 1 rs109440428	Charolais	0.814	0.172	0.014	0.900	0.100
	Brahman	0.000	0.065	0.935	0.033	0.967
SNP 2 rs109353933	Charolais	0.814	0.172	0.014	0.900	0.100
	Brahman	0.000	0.065	0.935	0.033	0.967
SNP 3 rs110234325	Charolais	0.731	0.200	0.069	0.831	0.169
	Brahman	0.000	0.065	0.935	0.033	0.967
SNP 4 rs110606764	Charolais	0.828	0.152	0.020	0.903	0.097
	Brahman	0.065	0.013	0.922	0.071	0.929
SNP 5 rs109388371	Charolais	0.820	0.159	0.021	0.900	0.100
	Brahman	0.019	0.046	0.935	0.042	0.958
SNP 6 rs109805094	Charolais	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000
	Brahman	0.805	0.188	0.007	0.899	0.101
SNP 7 rs110864292	Charolais	0.855	0.145	0.000	0.928	0.072
	Brahman	0.110	0.078	0.812	0.149	0.851
SNP 8 rs110796564	Charolais	0.951	0.049	0.000	0.976	0.024
	Brahman	0.396	0.409	0.195	0.601	0.399

En el caso de la población Brahman, las frecuencias alélicas están notoriamente a favor del alelo mutado (B) con valores entre 0.851-0.967, mientras que se invierte hacia el alelo A en la raza Charolais con valores de 0.831 hasta 1.0, lo cual, se relaciona al fondo genético de ambas razas bovinas. No se observaron diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas en las diferentes ganaderías de las mismas razas bovinas.

En los ocho SNPs evaluados en DBH, se observa por razas la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) con deficiencia de heterocigotos e inclinación hacia un homocigoto en específico, según sea el fondo genético (cuadro 5), donde se indica por *locus* con los valores de P, el error estándar, X^2 y probabilidad con $df=4$.

Existe en Brahman una desviación significativa del equilibrio de H-W en el SNP 4 (rs110606764) (χ^2 =infinito; $df=8$; $p<0.0001$) y en el SNP 7 (rs110864292) (χ^2 =infinito; $df=8$; $p=0.00000$) donde la estimación del valor exacto de P se realizó para todos los *loci*. En el EHW por población se observa que en Charolais $X^2=23.7558$, calculado por el método de Fisher, $df=14$ y $P=0.0490$.

Mientras en Brahman se obtiene X^2 =infinito, $df=16$ (ya que el SNP 6 si fue polimórfico en esta población) y probabilidad altamente significativa. La prueba de (DL) muestra que con excepción del SNP6 todos los loci están ligados (χ^2 =infinito; $df=4$; $p=0.0001$). El SNP 6 que solo se encuentra en DL con el *locus* 8.

Cuadro 5. Equilibrio de Hardy-Weinberg por locus de DBH en cada raza bovina.

ID SNP	Razas	P-Val	S.E.	X ²	Probabilidad
SNP 1 rs109440428	Charolais	0.6298	0.0015	0.9248	0.9210
	Brahman	1.0000	0.0000		
SNP 2 rs109353933	Charolais	0.6351	0.0017	0.9079	0.9234
	Brahman	1.0000	0.0000		
SNP 3 rs110234325	Charolais	0.0009	0.0002	14.0486	0.0071
	Brahman	1.0000	0.0000		
SNP 4 rs110606764	Charolais	0.1268	0.0024	∞	**
	Brahman	0.0000	0.0000		
SNP 5 rs109388371	Charolais	0.1538	0.0028	17.7479	0.0014
	Brahman	0.0009	0.0002		
SNP 6 rs109805094	Charolais	-	-	-	-
	Brahman	1.0000	0.0000		
SNP 7 rs110864292	Charolais	1.0000	0.0000	∞	**
	Brahman	0.0000	0.0000		
SNP 8 rs110796564	Charolais	1.0000	0.0000	5.4256	0.2463
	Brahman	0.0663	0.0031		

DF=4 en todos los SNPs. ∞ Valor infinito. **Altamente significativo.

Se calcularon las frecuencias haplotípicas, obteniéndose 21 haplotipos en DBH que se presentan en el cuadro 6, donde la distribución haplotípica posee diferencias específicas entre las dos razas estudiadas, se observan los haplotipos exclusivos minoritarios para cada raza donde seis corresponden a Brahman y cuatro a Charolais. De esta información se deriva la figura 7, donde se hace más notoria la divergencia haplotípica en las dos razas bovinas de fondo genético contrastante mediante el análisis de correspondencia de los 21 haplotipos de DBH.

Existen muy altas frecuencias de ciertos haplotipos por razas, mientras que otros se observan en muy baja proporción, por lo cual, se presentan en el cuadro 7 y en la figura 8 los siete haplotipos más frecuentes, estos explican el 95% de las frecuencias haplotípicas tanto en Brahman como en Charolais, en la cual, el 82% de la población posee el haplotipo #4, que se caracteriza por la ausencia de los ocho polimorfismos en su estructura.

Mientras que en Brahman se presentan dos haplotipos mayoritarios #1 y #3, estos incluyen seis y siete SNPs respectivamente y generan el 73% de la frecuencia, por lo cual, se emplean en las cuantificaciones de noradrenalina. Estos haplotipos #1, 3 y 4, además del haplotipo #6 son compartidos en las dos razas pero en baja frecuencia.

Cuadro 6. Frecuencias de los haplotipos de DBH observados en dos razas bovinas.

ID	Haplotipo	Charolais	Brahman
1	G G G G C A G A	1.3793	27.9221
2	G G G G C G G A	0.0000	9.0909
3	G G G G C A G G	4.4828	45.1299
4	A A T A A A A G	82.0689	2.9221
5	G G G A C A G A	0.0000	1.2988
6	G G G G C A A G	1.7241	9.0909
7	G G G A C G A A	0.0000	0.6494
8	A A T A C A A G	0.6897	0.3247
9	G G G G C A A A	0.3448	0.6494
10	G G G A A A G A	0.0000	0.3247
11	G G G G A A G G	0.0000	0.3247
12	G G G A A A A G	0.3448	0.3247
13	G G G G A A A G	0.0000	0.3247
14	G G G A C A G G	0.6897	0.9740
15	G G G A C A A G	0.0000	0.3247
16	G G G G C G A G	0.0000	0.3247
17	A A G A A A A G	6.2069	0.0000
18	A A G G A A A G	0.3448	0.0000
19	A A G G C A A G	0.6897	0.0000
20	G G G G A A G A	0.6897	0.0000
21	G G T A A A A G	0.3448	0.0000

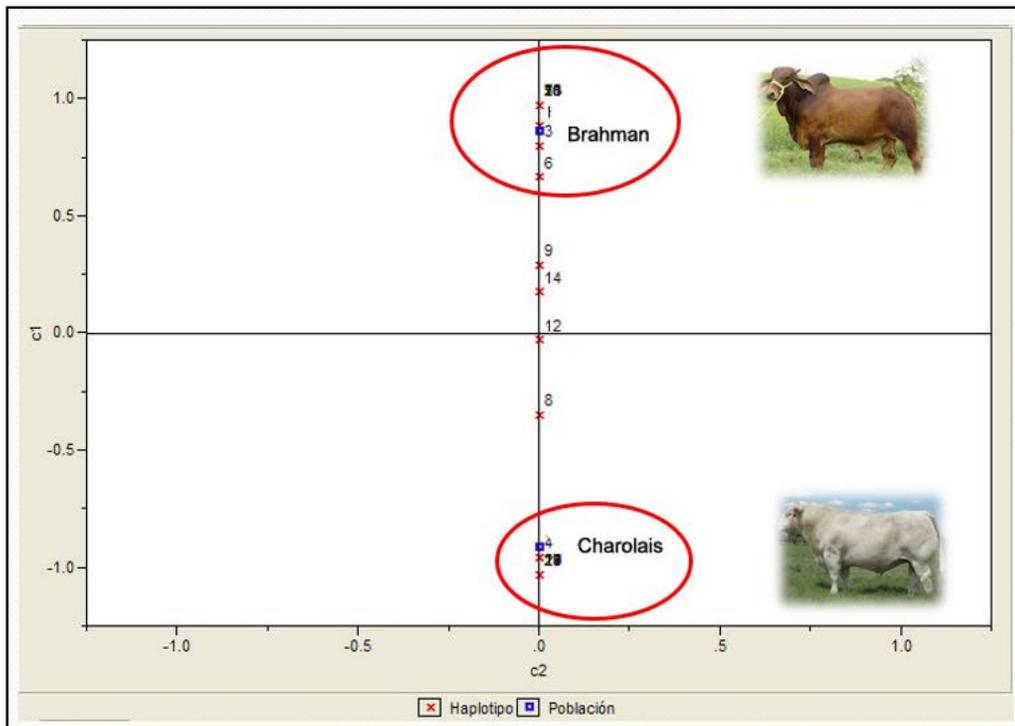


Figura 7. Análisis de correspondencia que muestra la segregación de los 21 haplotipos en las dos razas bovinas de diferente fondo genético.

Cuadro 7. Frecuencias de los haplotipos mayoritarios observados en DBH con los ocho SNPs en dos razas bovinas contrastantes por su fondo genético.

ID	Haplotipo	Frecuencia en Charolais	Frecuencia en Brahman
1	G G G G C A G A	1.3793	27.9221
2	G G G G C G G A	0.0000	9.0909
3	G G G G C A G G	4.4828	45.1299
4	A A T A A A A G	82.0689	2.9221
5	G G G A C A G A	0.0000	1.2988
6	G G G G C A A G	1.7241	9.0909
7	A A G A A A A G	6.2069	0.0000
TOTAL		95.8620%	95.4547%

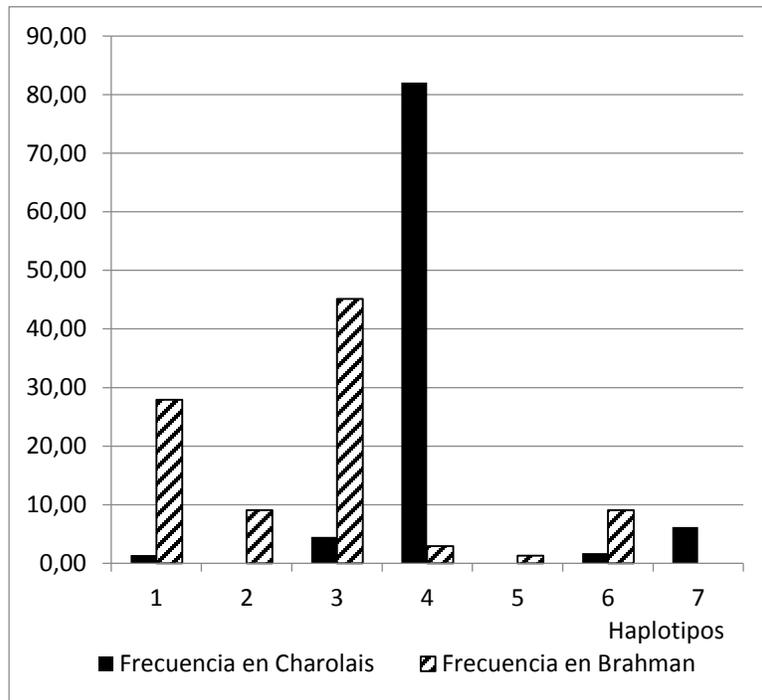


Figura 8. Frecuencias de los siete haplotipos mayoritarios en DBH para dos razas bovinas contrastantes por su fondo genético.

7.1.2-EVALUACIÓN DEL TEMPERAMENTO BOVINO

En este ensayo se evaluaron 67 bovinos puros de raza Brahman de exhibición, se realizaron varias mediciones que se explicaron anteriormente como son la velocidad de salida y las evaluaciones del comportamiento en la manga y en la salida de la prensa, para ello, el primer aspecto fue realizar la formación del panel de cinco observadores y resultó la selección de un único observador como la mejor estrategia, para observar y evaluar cuantitativamente el comportamiento en cuatro repeticiones, para medir la consistencia interna del cuestionario se calculó el alfa de Cronbach, obteniéndose en la manga 0.9280 y en la salida 0.9601, teniéndose que estos valores de alfa de Cronbach son muy óptimos.

También, se calculó el valor de Kappa para determinar la consistencia entre las mediciones, obteniéndose para las evaluaciones en la manga y en la salida 0.5897 y 0.8037 respectivamente, siendo estos valores de kappa moderados y altos, es decir, que existe alta concordancia entre los resultados obtenidos en las cuatro repeticiones para cada animal evaluado.

Específicamente en los resultados de velocidad de salida, en la población en general (67 bovinos Brahman de un mismo hato ganadero) se obtuvo una media de 1.184 ± 0.3942 m/s (figura 9), se clasificó el temperamento en tres grupos siendo aquellos bovinos calmados los que tienen una velocidad de salida por debajo del límite inferior 0.7898 m/s, son animales temperamentales los que poseen velocidades de salida mayores al límite superior de 1.5782 m/s y los individuos de temperamento intermedio presentan velocidades entre los dos límites 0.7898-1.5782 m/s, entre estos 3 grupos existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

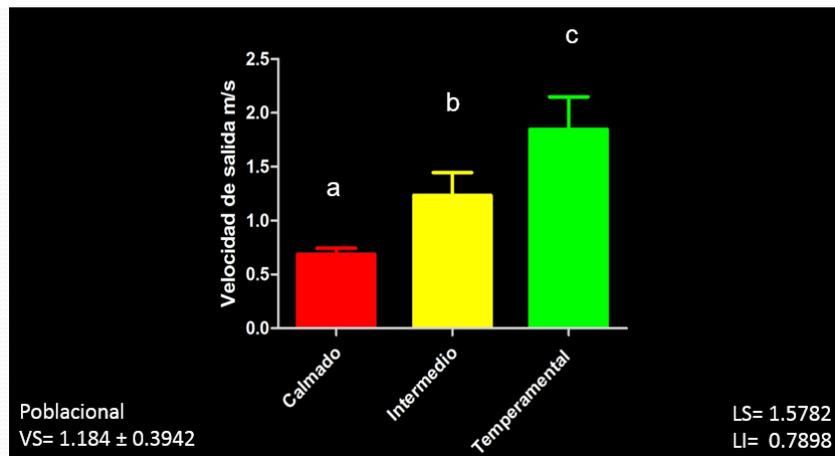


Figura 9. Clasificación de la población general de Brahman por el temperamento en la velocidad de salida.
Se estimó que los grupos son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

También, se observó una diferencia significativa en los individuos según el grupo etario, por lo cual, se clasificaron en 2 años y 4 años, donde se obtuvo que para los 42 animales de 2 años de edad, la media de la velocidad de salida fue 1.2426m/s (DE±0.3402 y EE=0.05313), se estableció el límite superior de 1.5828m/s y el límite inferior de 0.9024m/s.

Para los 25 individuos de 4 años se obtuvo una media de 0.9958m/s (DE±0.3036 y EE=0.0647), el límite superior fue 1.2994m/s y el límite inferior de 0.6922m/s, en el cuadro 8 se indican estos datos con el porcentaje específico de la población que se ubica en cada grupo, estos datos siguen una distribución normal y la mayoría de los dos grupos etarios pertenecen al grupo de temperamento intermedio.

Cuadro 8. Clasificación de la población Brahman por temperamento en la velocidad de salida.

Temperamento	Velocidad de salida (m/s)	Porcentaje de la población	
Animales de 2 años (n=42):			
		(29 hembras)	(13 machos)
Calmado	< 0.9024	9.52	0
Intermedio	0.9025 - 1.5827	28.58	15.87
Temperamental	> 1.5828	6.34	4.76
Animales de 4 años (n=25):			
		(todas hembras)	
Calmado	< 0.6922	7.94	
Intermedio	0.6923 - 1.2993	22.23	
Temperamental	> 1.2994	4.76	

Posteriormente clasificando a todos los animales por los tres parámetros de evaluación del temperamento, se observan diferencias en el número de individuos que se ubican en cada categoría, como se indican en el cuadro 9, donde se observa que clasificados por la velocidad de salida la mayoría de la población es de temperamento intermedio y toda la población presenta una distribución normal, mientras que en la evaluación de comportamiento en la manga el grupo más numeroso es calmado con el 76% y en la evaluación del comportamiento en la salida los tres grupos presentan valores más semejantes estando repartidos equitativamente.

Cuadro 9. Resumen de los porcentaje de individuos por temperamento en las tres técnicas de evaluación.

Técnica de evaluación / Categoría	Calmados	Intermedios	Temperamentales
Velocidad de salida	17.46%	65.08%	17.46%
Comportamiento en la manga	76.19%	17.46%	6.35%
Comportamiento en la salida	34.92%	44.44%	20.64%

7.1.3.-MEDICIONES DE NORADRENALINA EN PLASMA BOVINO

Para este ensayo el primer paso fue construir los conjuntos por haplotipos, debido a la poca variabilidad que se encontró tanto en Charolais como Brahman, no fue posible formar grupos haplotípicos con ausencia de SNPs y con todos los SNPs dentro de la misma raza, la mayor variación se observó en Brahman y por ello, solo en esta raza se decidió realizar las mediciones de noradrenalina, y se conformaron 3 grupos con un total de 29 animales, que varían solo en el octavo SNP de DBH (cuadro 10).

Cuadro 10. Selección por haplotipos en la población tipificada de Brahman.

Haplotipo	Estructura	Número de individuos disponibles
1/1	G G G G C A G G	13
1/3	G G G G C A G g/a	9
3/3	G G G G C A G A	7

Los resultados de las concentraciones de noradrenalina (pg/ml) se presentan en el cuadro 11, se determinó la precisión intra e inter ensayo con coeficientes de variación de 7.54% y 9.56% respectivamente, la sensibilidad del método fue de 0.01ng/ml.

Cuadro 11. Medias de cuadrados mínimos de las concentraciones de noradrenalina por haplotipos.

Haplotipo	1/1 (GG)	1/3 (GA)	3/3 (AA)
Concentración pg/ml	514.13	485.84	371.20
Error estandar	99.76	104.63	95.31
Pr> t 	0.0001	0.0004	0.0016

Las concentraciones plasmáticas de noradrenalina se analizaron en dos días consecutivos que se tomaron las muestras a la misma hora como réplicas del ensayo, para todos los haplotipos fueron inferiores a 550 pg/ml, los animales que portan el haplotipo 1/1 poseen 514.13 pg/ml de noradrenalina, los portadores del haplotipo 1/3 presentan una media de 485.84 pg/ml, mientras que los homocigotos mutados AA haplotipo 3/3 poseen 371.20 pg/ml, entre las concentraciones de noradrenalina en los haplotipos comparados estos resultados no son estadísticamente significativos ($P > 0.05$), la diferencia entre los dos genotipos homocigotos presento una $P = 0.1803$.

7.1.4.-ESTIMACIONES DE LAS ASOCIACIONES ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS EVALUADAS

Posteriormente, se estimaron las posibles asociaciones entre los ocho nsSNPs de DBH, las concentraciones de noradrenalina, las tres evaluaciones del comportamiento y los datos productivos disponibles (peso al nacimiento, peso al destete y peso al destete ajustado a los 205 días), observándose que no existe correlación estadísticamente significativa ($P > 0.05$) en las poblaciones de Charolais y Brahman entre los genotipos, los rasgos productivos y la concentración de noradrenalina en plasma.

En cuanto, a los análisis lineales en las evaluaciones de temperamento, se obtuvo para los genotipos del SNP 6 versus las evaluaciones del comportamiento en la manga un efecto significativo ($P = 0.0326$), así como, se observaron dos tendencias entre el SNP 7 versus el temperamento medido en la manga y para los genotipos del SNP 8 versus el temperamento medido en la salida ($P = 0.1$), todos los resultados se detallan a continuación en el cuadro 12.

Cuadro 12. Medias de cuadrados mínimos y error estándar por genotipos en las 3 técnicas de evaluación del comportamiento bovino.

SNPs	Genotipo	Velocidad de salida (m/s)	Comportamiento en la Manga (Escala de 1-5)	Comportamiento en la Salida (Escala de 1-4)
1 a 4	AA	0.9473 ± 0.1297	2.3121 ± 0.3347	1.5040 ± 0.2964
	GG	1.0862 ± 0.0486	2.0279 ± 0.1254	1.7608 ± 0.1110
Valor de P		0.3216	0.4305	0.4212
5	AC	0.9729 ± 0.1480	2.4018 ± 0.3788	1.6488 ± 0.3384
	CC	1.0792 ± 0.0481	2.0270 ± 0.1231	1.7377 ± 0.1100
Valor de P		0.4983	0.3515	0.8039
6	AA	1.0660 ± 0.0566	1.8849^a ± 0.1386	1.6354 ± 0.1268
	AG	1.0749 ± 0.0789	2.4082^b ± 0.1932	1.9115 ± 0.1767
Valor de P		0.9276	0.0326	0.2102
7	AA	1.0026 ± 0.1707	2.6231 ^a ± 0.4240	1.7192 ± 0.3917
	AG	1.1646 ± 0.1213	2.4367 ^a ± 0.3012	1.6725 ± 0.2782
	GG	1.0576 ± 0.0521	1.9416 ^a ± 0.1294	1.7406 ± 0.1195
Valor de P		0.6656	0.1360	0.9747
8	AA	1.0674 ± 0.0823	1.9579 ± 0.2094	1.7751 ^a ± 0.1796
	AG	1.0991 ± 0.0740	2.2309 ± 0.1882	1.9303 ^a ± 0.1615
	GG	1.0305 ± 0.0857	1.9513 ± 0.2181	1.4098 ^a ± 0.1870
Valor de P		0.8328	0.5242	0.1151

Se observó un efecto significativo ($p=0.0326$) entre el temperamento medido en la manga y los genotipos del SNP 6, encontrándose que son más calmados los individuos de genotipo AA por las medias de cuadrados mínimos por genotipo (figura 10).

Mientras que en el análisis de contingencia de los genotipos del SNP 6 para el temperamento en la manga se observa como es la distribución de los animales de cada temperamento dentro de cada genotipo, teniéndose que los animales de genotipo AA son mayoritariamente calmados y muy pocos temperamentales versus el genotipo AG donde son menos los individuos calmados, con un grupo intermedio numeroso y más temperamentales, lo cual, podría presumiblemente estar presentando un efecto aditivo pero para su confirmación se requiere caracterizar individuos del genotipo GG, los cuales no se detectaron en la población evaluada y el genotipo AA corresponde al 82% de la población de Charolais y el 80% de Brahman, esto podría deberse a una selección empírica e indirecta de este genotipo por parte de los ganaderos (figura 11).

A continuación en la figura 12 se presenta el análisis de correspondencia para los genotipos AA y AG del SNP 6, con la clasificación del temperamento por la evaluación del comportamiento en la manga, donde se observa que los individuos con genotipo AA son más calmados, mientras que para el genotipo AG se reducen los animales calmados y se presentan más temperamentales.

Existe concordancia con los resultados de la tipificación, donde se observa una fuerte presencia del genotipo AA en el SNP6, esto podría explicarse por la selección empírica del ganado, hacia aquellos de comportamiento más manejable y calmado.

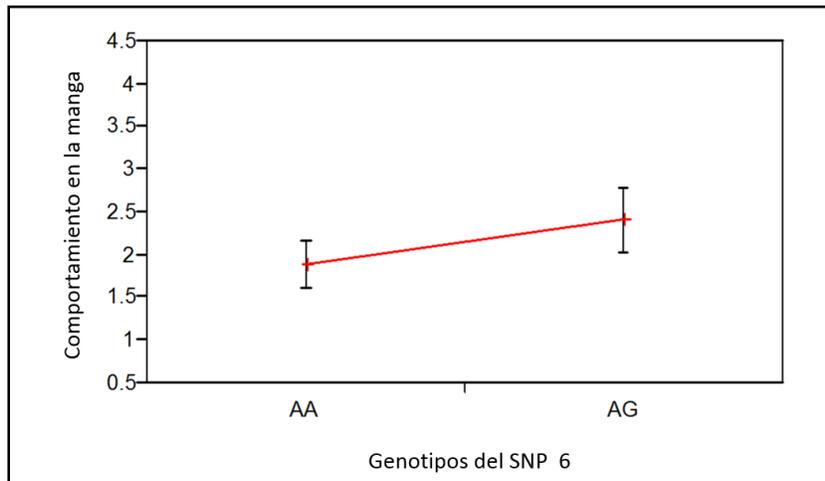


Figura 10. Medias de cuadrados mínimos del comportamiento en la manga por genotipos del SNP 6.

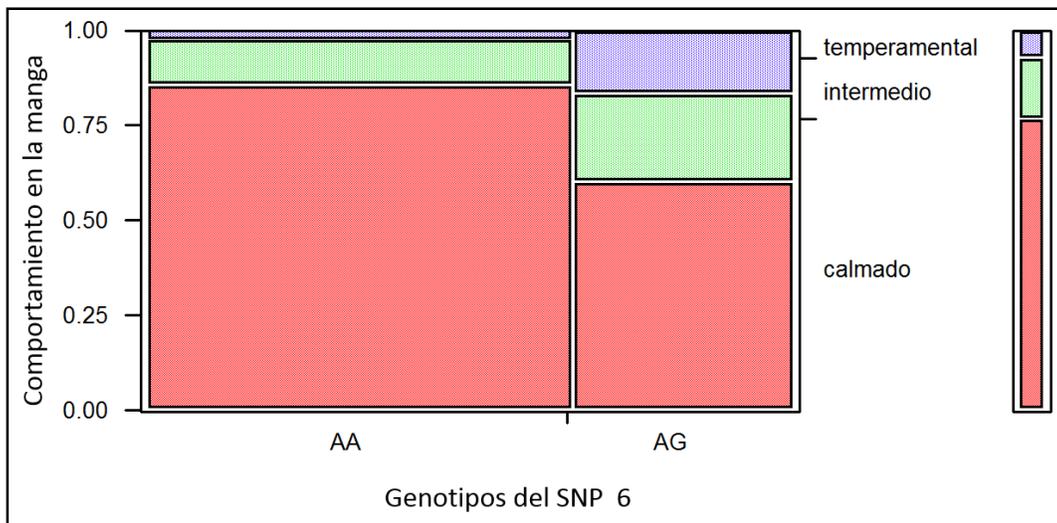


Figura 11. Análisis de contingencia de los genotipos del SNP 6 para el temperamento en la manga.

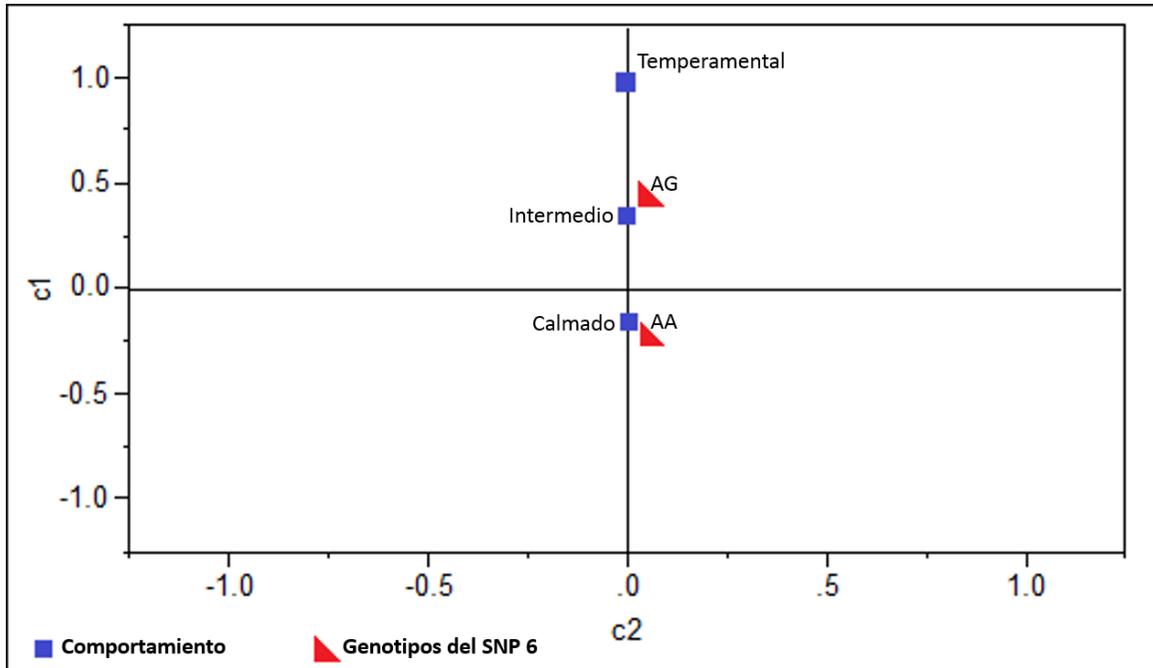


Figura 12. Análisis de correspondencia en el manejo en manga para el SNP 6.

Con respecto a la tendencia ($P=0.136$) observada entre los genotipos del SNP 7 de DBH y las evaluaciones del comportamiento realizadas en la manga, en el análisis de contingencia (figura 13) se visualiza la variación del comportamiento por genotipos siendo más calmados los homocigotos del alelo G.



Figura 13. Análisis de contingencia de comportamiento por genotipos del SNP 7.

En la figura 14 se presenta el gráfico de las medias de cuadrados mínimos por diferencias calculadas por Tukey para el comportamiento evaluado en la manga para los genotipos del SNP 7, donde se observa que los individuos homocigotos A poseen valores más altos en la evaluación del comportamiento, es decir, que son los animales más temperamentales, mientras que los portadores del genotipo GG son los más calmados.

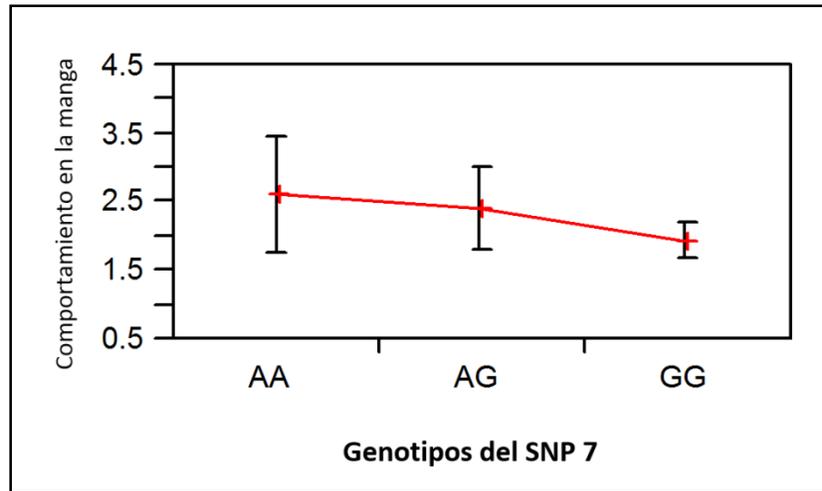


Figura 14. Medias de cuadrados mínimos para el SNP 7 en el comportamiento en la manga.

A continuación en el cuadro 13 de forma incipiente se pueden observar algunos comportamientos de los datos que requerirán ser analizados en otras poblaciones con mayor número de individuos, incluyendo poblaciones de fondo genético mixto que permitan obtener los haplotipos más extremos con variación en la presencia de todos los ocho SNPs.

Para el SNP 8, se observan ciertas tendencias, ya que los individuos del genotipo GG poseen los pesos más altos al nacimiento y PDA, en comparación a los animales de los otros genotipos, en la clasificación por velocidad de salida los animales más rápidos son los temperamentales y tienen menos pesos (PN, PD y PDA) al compararse con los calmados.

En el comportamiento en la manga para el PD los animales temperamentales pesan menos, 145.33 Kg versus los animales calmados que pesan 153.33Kg, de igual forma en el comportamiento en la salida se observa que el PD es mayor en los animales calmados en comparación a los animales intermedios y más aún respecto a los temperamentales, en este caso la

diferencia entre los pesos al destete de los animales calmados versus los temperamentales es de 21.36 kg y estadísticamente con una tendencia positiva por el 0.1 de valor de probabilidad.

Cuadro 13. Medias de cuadrados mínimos y error estándar por rasgo productivo para los genotipos del nsSNP 8 y el temperamento evaluado en tres pruebas (n=67).

Genotipo del SNP 8	PN	PD	PDA
GG	31.83 ± 0.76	143.92 ± 9.11	126.66 ± 8.34
GA	31.68 ± 0.61	158.21 ± 7.33	126.56 ± 6.72
AA	31.07 ± 0.71	152.14 ± 8.47	126.45 ± 7.76
Valor de P	0.7496	0.3732	0.9987
Comportamiento por velocidad de salida			
Calmado	32.36 ± 0.76	153.79 ± 9.03	127.44 ± 8.28
Intermedio	31.81 ± 0.49	153.02 ± 5.85	126.92 ± 5.35
Temperamental	31.66 ± 0.96	140.61 ± 11.47	123.47 ± 10.51
Valor de P	0.4241	0.590	0.9499
Comportamiento en la manga			
Calmado	31.45 ± 0.44	153.33 ± 5.24	125.76 ± 4.74
Intermedio	31.56 ± 0.87	148.59 ± 10.29	126.85 ± 9.32
Temperamental	32.33 ± 1.46	145.33 ± 17.30	134.24 ± 15.66
Valor de P	0.8420	0.8780	0.8743
Comportamiento en la salida			
Calmado	31.76 ± 0.61	155.97 ± 7.02	128.49 ± 6.52
Intermedio	30.88 ± 0.60	155.50 ± 6.94	128.36 ± 6.59
Temperamental	32.31 ± 0.82	134.61 ± 9.49	119.29 ± 8.91
Valor de P	0.3076	0.1492	0.6554

7.2.-ENSAYOS IN VITRO

7.2.1.-CONSTRUCCIÓN DE LAS RECOMBINANTES

Para construir las mutantes de DBH, se realizaron varios muestreos de suprarrenales, a las cuales, se les extrajo el ADN para las tipificaciones de los ocho SNPs, y así determinar las muestras candidatas para las extracciones de ARN y las RT-PCR, que se realizaron de acuerdo a la técnica y concentraciones especificadas en la sección de materiales y métodos, para obtener el producto del cDNA de DBH de 1937pb que se indica en la figura 15 con el marcador de 1Kb.

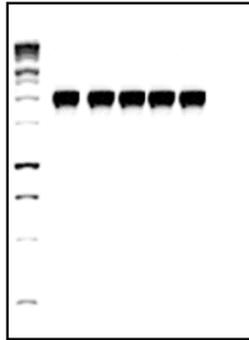


Figura 15. Productos del cDNA de DBH bovino obtenido por RT-PCR.

Los fragmentos de 1937pb se clonaron en el vector pSC-A, fueron secuenciados para verificar su identidad; posteriormente se subclonaron en el plásmido pcDNA 3.0, las clonas recombinantes se tamizaron de igual manera por secuenciación, estas se utilizaron como templado para insertar el inicio consenso Kozak para vertebrados y se verificó por secuenciación el inicio modificado y la presencia o ausencia de cada uno de los ocho SNPs de DBH (anexo 2).

7.2.2 VERIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS RECOMBINANTES

En la figura 16 se muestran los extractos crudos protéicos obtenidos a partir de los testigos positivos (suprarrenales de ratón) así como de las líneas celulares con y sin transfección con dos de las construcciones ensayadas, a saber pcDNA/DBH sin los nsSNPs y pcDNA/con siete de los nsSNPs, ambas construcciones les fue adicionada la secuencia Kozak tal como se describe en materiales y métodos.

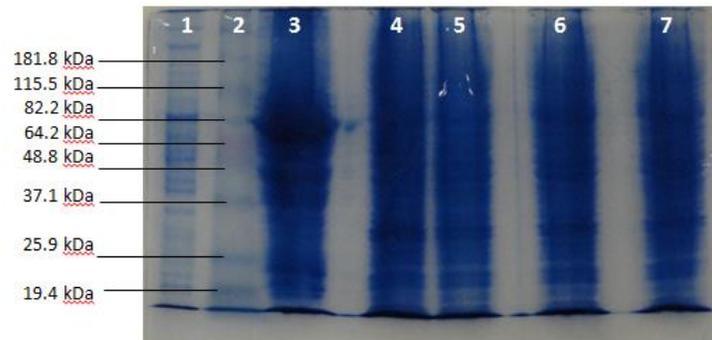


Figura 16. Gel de proteínas teñidos con Azul de Coomassie.

(De izquierda a derecha: Control positivo 0.015mg de suprarrenales de ratón; Marcador Bench Marck prestained protein ladder; control positivo 0.384mg de células PC12; Células HEK sin tratamiento 0.384mg; Células HEK transfectadas con pcDNA 0.384mg; Células HEK transfectadas con DBH wild type-Kozak 0.384mg; Células HEK transfectadas con DBH 7SNPs-kozak 0.384mg).

Las transfecciones de DBH mostraron alta eficiencia de transfección (95%), la cuantificación y visualización de los extractos protéicos crudos fue óptima, estos fueron probados inicialmente realizando otro ensayo de Western Blot para actina como control y resultando satisfactorios. Sin embargo, en los diferentes Western Blot específicos para DBH, realizados con diversas concentraciones de proteínas en las tres líneas celulares, no se visualizan bandas específicas que correspondan a DBH como se observa en los controles de DBH, proteínas extraídas de suprarrenales de ratones y de células PC12 sin transfectar que se presentan en la figura 17, solo se obtienen bandas específicas en el Western Blot de las células PC12 de las células transfectadas pero esto corresponde a la expresión basal, que es intrínseca de esta línea celular, productora de la proteína DBH nativa de rata.

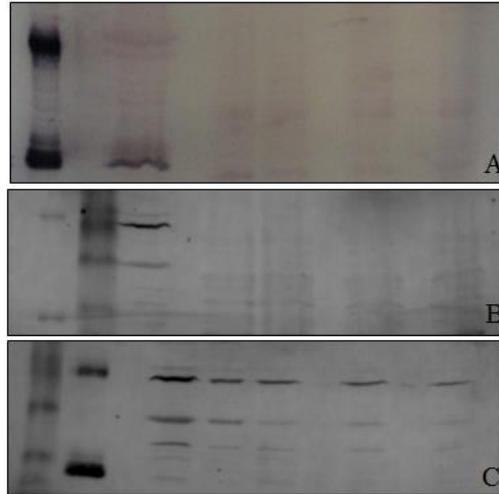


Figura 17. Western Blot de células transfectadas
(Panel A: células HEK 293; Panel B: células SHSY5Y; Panel C: células PC12).

Adicionalmente, para corroborar estos resultados, se realizó la medición de noradrenalina excretada al medio extracelular mediante ELISA cuantitativo, en este caso, se optimizó el kit para las mediciones del medio de cultivo, se realizaron las cuantificaciones de cada muestra por triplicado y los resultados no demuestran la presencia de la catecolamina en el medio de cultivo de las células transfectadas.

8.-DISCUSIÓN

8.1.-ENSAYOS IN VIVO

Los ocho polimorfismos evaluados en el gen DBH poseen frecuencias inter-razas bovinas con diferencias significativas y fuerte predominio de un alelo específico, presentando desviación del EHW, con desequilibrio de ligamiento y frecuencias haplotípicas diferentes según sea el fondo genético taurino o cebuino, siendo en estos resultados concordantes con los reportados previamente (Lourenco-Jaramillo *et al.*, 2012), lo cual, puede relacionarse con la divergencia genética a partir del ganado primitivo, a los procesos de evolución, selección natural y artificial, la domesticación y la adaptación específica para cada raza bovina, como se ha descrito en los análisis masivos de SNPs en el genoma bovino en 47 razas (Gautier *et al.*, 2010).

Asimismo, estos resultados se relacionan con el efecto que produce en el genoma la selección positiva para determinado fin productivo, ya que los estudios masivos de polimorfismos bovinos encuentran divergencia genética por fin productivo (Villa-Angulo *et al.*, 2009).

Se ha estimado que cerca del 10% de los polimorfismos en el genoma taurino son antiguos y el ganado doméstico posee un alto nivel de polimorfismos, que se segregan en conjunto (MacEachern *et al.*, 2009) generando los haplotipos específicos que se observan, en este caso en el gen de DBH, con una divergencia significativa entre las razas estudiadas según su origen, concordante con los resultados del Consorcio HapMap Bovino (Gibbs *et al.*, 2009) y con el análisis que indica un nivel de divergencia en la estructura de los haplotipos entre las razas Charolais y Brahman de 52%, por lo cual, en el dendograma haplotípico se ubican en grupos diferentes entre las 19 razas taurinas y cebuinas.

Esta organización específica de los haplotipos por razas bovinas se debe a los eventos de recombinación, mutación y la contribución genética diferencial de los ancestros, que a través del tiempo se han perfeccionado y que presentan puntos de interacciones protéicas que generan fenotipos complejos, como el comportamiento bovino.

En este estudio los ocho SNPs valorados en el gen de DBH no presentan un efecto estadísticamente significativo asociado a los diversos parámetros analizados, sin embargo, estos polimorfismos podrían conformar diversas isoformas de DBH bovino y presentar un discreto cambio en la funcionalidad, por lo cual, se realizarán más estudios al respecto.

Es pertinente realizar un análisis combinado entre los SNPs reportados en varios genes como TH, DBH, receptores dopaminérgicos como DRD4, Monoamino Oxidasa A, Catecol-O-metiltransferasa y transportadores monoaminos específicos para dopamina, noradrenalina y serotonina; para obtener un mayor acercamiento a las asociaciones en los rasgos complejos como el comportamiento, ya que el efecto individual de cada SNP por gen puede ser pequeño y en conjunto más visible su efecto fenotípico conductual.

Además, estos polimorfismos en el gen DBH son potencialmente importantes ya que generan la pérdida de tres residuos de serina en el dominio catalítico de la enzima. Estos residuos son susceptibles a ser fosforilados, ya que en estudios del gen Tirosina Hidroxilasa (TH) se han relacionado a la fosforilación enzimática por las múltiples proteínas kinasas que incrementan la actividad de TH a nivel neuronal, ya que la fosforilación ocurre a la par de la hidroxilación de la enzima de TH, puede ser diferencial y modificar la funcionalidad, eventualmente los SNPs de DBH puede producir modificaciones en la actividad enzimática de DBH como se ha demostrado en estudios de la proteína de Tirosina Hidroxilasa (Lew *et al.*, 1999).

También, es necesario ampliar el estudio a otras razas como Charbray que por ser cruza de Brahman y Charolais, se espera que tengan frecuencias haplotípicas que permitan conformar grupos numerosos con alta y baja presencia de la mayoría de SNPs en una misma raza ya que el efecto de un solo SNP es muy pequeño, como se realizó en el diseño experimental para evaluar la noradrenalina plasmática en los grupos formados de Brahman.

Hasta ahora, bajo nuestras condiciones experimentales, los ocho SNPs valorados en DBH no presentan asociación estadísticamente significativa con las mediciones de noradrenalina en plasma extraído de ganado Brahman en condiciones de bienestar animal, solo se obtuvo una tendencia en el efecto de los homocigotos del octavo SNP.

En este punto es importante destacar que no fue viable conformar grupos con ausencia y presencia de todos los polimorfismos como se esperaba para formar los grupos contrastantes, la diferencia entre los grupos radica solo en el octavo SNP. Además, por ser ganado de registro y élite, es un ganado muy acostumbrado al manejo humano con fines sanitarios y para las exhibiciones comerciales, y no podía generarse estrés de otro tipo como la utilización de sonidos con altos decibeles, retirarles el alimento o el agua, lo cual, tal vez podría aumentar las diferencias cuantificadas pero en respuesta al agente estresor.

En las mediciones de noradrenalina por el método inmunoenzimático se calculó la precisión intra e inter ensayo obteniéndose coeficientes de variación de 7.54% y 9.56% respectivamente, mientras que otros autores indican que con el mismo kit de ELISA de ALPCO pero determinando concentraciones plasmáticas de adrenalina obtienen 17.7 y 10.4% de variación inter e intra ensayo (Burdick *et al.*, 2009), es decir, que nuestras mediciones son más exactas y reproducibles.

En el presente estudio las concentraciones plasmáticas de noradrenalina se determinaron por duplicado y en 2 días consecutivos a la misma hora como réplicas del ensayo, se obtuvo para el haplotipo 1/1 una media de 514.13 pg/mL de noradrenalina, siendo en este grupo donde se obtuvieron los títulos más elevados para todas las mediciones, mientras que se presentaron valores intermedios de 485.84 pg/mL para el haplotipo 1/3 y los valores más bajos de 371.20 pg/mL para los homocigotos mutados AA representados por el haplotipo 3/3.

Estos resultados no fueron significativos posiblemente debido a que la diferencia entre los grupos radica solo en el octavo SNP, a las condiciones del muestreo, al reducido número de muestras y por ser ganado de élite empleado en exhibiciones y exposiciones, no se podía manipular ni generar estrés, los animales se mantuvieron en bienestar sin aplicación de ningún agente

estresante, como carencia de alimento o agua, estrés por transporte o cambios en el medio ambiente, entre otros.

Comparando estos resultados con los datos disponibles en la escasa bibliografía del tema, encontramos que los reportes en muchos casos no indican la raza evaluada, las condiciones de estudio, la edad de los animales utilizados, el método de cuantificación, entre otros puntos de interés que afectan significativamente las mediciones de las catecolaminas.

Estas se pueden detectar por quimioluminiscencia, fluorescencia, espectrofotometría de masas, detección electroquímica, combinadas con técnicas inmunoenzimáticas o HPLC, las cuales, poseen límites de detección diferentes. El más popular es el HPLC (Tsunoda, 2006), el cual, posee excelente correlación con los resultados obtenidos para noradrenalina mediante el ELISA, según datos del fabricante, ALPCO (HPLC = 1.27 ELISA - 0.04; $r=0.96$ y $n=30$). También, es muy importante la metodología del muestreo ya que se ha comprobado en ratones que se pueden obtener resultados muy diversos dependiendo de las condiciones de estudio (Grouzmann *et al.*, 2003).

Algunos estudios relevantes indican lo siguiente, por ejemplo, en Holstein y sus cruza con negro Japonés (Uetake *et al.*, 2011), se reportan niveles de noradrenalina con alta variabilidad pre-tratamiento de 79.7 ± 70.3 pg/mL, a los 50 Km de transporte de 96.9 ± 76.0 pg/mL, a los 100km obtuvieron valores de 96.9 ± 90.8 pg/mL y después del transporte a 150 km 107.4 ± 114.8 pg/mL.

Estas diferencias pueden relacionarse al temperamento ya que en un estudio realizado en toros Brahman, animales clasificados como calmados presentan concentraciones plasmáticas de adrenalina cercanas a cero, mientras que toros de temperamento intermedio presentaron valores inferiores a 50 pg/mL y los toros temperamentales concentraciones mayores de 60 pg/mL, con niveles máximos de 350 pg/mL al aplicar estrés inmunológico (Burdick *et al.*, 2011a).

En otro estudio donde se miden las catecolaminas bajo estrés (Mellor *et al.*, 2002) no hay diferencias entre los tres grupos evaluados, ya que en toros normales obtuvieron 347 ± 24 pg/mL, toros castrados 334 ± 21 pg/mL y en toros castrados con anestesia 344 ± 26 pg/mL. En ganado

muestreado por la vena coccígea y analizado por cromatografía líquida con detección electroquímica (Hardee *et al.*, 1982), en 10 vacas Holstein se obtuvieron 452pg/mL (159-866 pg/mL) y en cinco toros de raza pura 598 pg/mL (192-1769 pg/mL) siendo estos datos muy dispersos.

Otro estudio, también en ganado Holstein indica por HPLC-EC (Katti *et al.*, 1991), valores de noradrenalina de 119.7 ± 10.9 pg/mL y a las 40 horas con una temperatura rectal de 40.8 °C los individuos poseen 111.50 ± 11.9 pg/mL y una energía metabólica de 3025.10 ± 226.0 kJ/h que es estadísticamente significativa con respecto al valor en el tiempo cero de 4179.0 ± 255.10 kJ/h, lo cual, indica una reducción en el gasto energético por el estrés térmico, estos resultados de concentración plasmática de noradrenalina con estrés térmico, tampoco presentan un efecto estadísticamente significativo y son resultados menores a los obtenidos por nosotros.

Una evaluación de estrés térmico en Holstein (Alvarez *et al.*, 1973) determinó que la exposición al calor (40-43°C) en tiempos cortos causa en promedio un incremento del 42% de la noradrenalina en una hora, y el máximo aumento (84%) se registró a las 4.5 horas con 1900 pg/mL y una exposición a 35 °C por tres días genera un 35% más de noradrenalina, mientras que la exposición prolongada por 24 días, produce 70% de aumento, es decir, que durante la aclimatación al calor, se incrementa la actividad adrenal, aumentando considerablemente la noradrenalina plasmática. En nuestro caso, los animales evaluados tienen estrés crónico térmico y están adaptados a temperaturas elevadas de 45-55 °C en Villahermosa, Tabasco, por lo cual, los valores normales de catecolaminas son más altos que los correspondientes a otros bovinos de un clima menos caluroso.

Un análisis en cruza Hereford–Angus (Lefcourt *et al.*, 1995) midiendo el estrés por destete y las catecolaminas por HPLC, obtuvo como línea basal para las madres 200 pg/mL, para las crías 260 pg/mL y el mayor incremento por el estrés del destete fue de 82 pg/mL; mientras que en Simmental (Blum, 1988) los valores reportados son de 235 pg/mL y cuando los animales corren a 60m/min se produce un incremento a 675 pg/mL.

En el presente análisis los animales fueron llevados desde el corral hasta la manga por lo cual, puede explicarse el incremento desde la primera toma de muestra. Por otra parte, en ganado Angus de un año de edad el valor inicial de noradrenalina es de 160 pg/mL y luego es 275 pg/mL un minuto después de la simulación de venopunción como estrés (Rulofson *et al.*, 1988); en nuestro caso se tomó la primera muestra y una hora después se comenzó nuevamente la venopunción, posiblemente, se requería tomar las muestras en tiempos más cortos, por ejemplo cada 10 minutos o menos, para obtener las variaciones antes de que se metabolizará la noradrenalina y poder construir curvas de concentración de noradrenalina en diferentes tiempos consecutivos.

Bajo el estrés del ejercicio por 30 minutos simulando altitud de 3500m (Blum *et al.*, 1979), se obtuvieron valores de noradrenalina de 1600 pg/mL, representando el triple del valor basal que reportan en este estudio de 520 pg/mL, datos más aproximados a los obtenidos en nuestro caso.

El presente análisis es novedoso ya que en nuestro conocimiento, no existen reportes de cuantificación de noradrenalina en ganado Brahman, solo existen algunos reportes en razas taurinas como Holstein, y las cuantificaciones disponibles presentan variabilidad según la raza analizada, el sexo, la edad, las condiciones del estudio y el método de cuantificación.

En este caso las frecuencias haplotípicas no permiten conformar grupos numerosos con alta y baja presencia de la mayoría de los ocho polimorfismos en una misma raza (como los haplotipos 2 y 4); por lo cual, se propone como alternativa la tipificación de los ocho SNPs y la cuantificación de noradrenalina en otras poblaciones como Charbray.

Por otra parte, en cuanto a los resultados de las evaluaciones del temperamento animal mediante tres herramientas diferentes (velocidad de salida, comportamiento en la manga y en la salida), tenemos que se obtuvo una excelente consistencia interna en el cuestionario y entre las evaluaciones que se realizaron como repeticiones de las mediciones para cada animal objeto de este estudio. Observamos en los últimos años un incremento en las investigaciones de etología animal, ya que el temperamento animal refleja el bienestar del mismo y presenta implicaciones directas sobre su salud y su rendimiento productivo y reproductivo.

Por ejemplo, algunos estudios demuestran que la novedad es un fuerte agente estresor (Stephens *et al.*, 1975), (Dantzer *et al.*, 1983a) ya que en vacas Jersey se eleva la frecuencia cardíaca y los niveles plasmáticos de corticosteroides, la inmovilización de los animales también afecta varios parámetros fisiológicos como la concentración de corticosteroides de 7.7 ng/mL to 28.8 ng/mL. Es decir, que diversas prácticas comunes en el manejo animal pueden generar varias respuestas emocionales (Grandin, 1980c; Grandin, 1980a) que dependerán de la magnitud y tiempo del estímulo estresante y el grado de novedad (Grandin, 1993b), por lo cual, las condiciones de manejo animal influyen fuertemente en el comportamiento de los bovinos y en su actividad endocrina (Dantzer *et al.*, 1983b). Además, el estrés durante el transporte de los bovinos y la forma en que se manejan es muy importante para evitar el desarrollo del miedo que es un fuerte estresor que puede afectar la sanidad (Grandin, 1997).

Los factores genéticos interactúan con el temperamento en formas complejas, influenciado por las experiencias previas de manejo (Le Neindre *et al.*, 1995) y la domesticación. Se ha observado que las especies silvestres son más reactivas a los estímulos que aquellas domesticadas y los fenotipos domésticos tienen una reducida la respuesta a los cambios del medio ambiente (Price, 1984) ya que básicamente el hombre ha seleccionado empíricamente a los fenotipos con una actitud más calmada y dóciles (Parsons, 1988), por ser más fáciles de manejar y adaptar a los procesos productivos como la ordeña.

Asimismo, el temperamento es un rasgo estable y persistente a lo largo del tiempo, los animales muy nerviosos o agresivos también representan un riesgo para sus manejadores, como se evaluó en cruzas de Gelbvich×Simmental×Charolais por 30 días en la manga (Grandin, 1993a).

Un estudio del temperamento en razas europeas como Hereford, Charolais, Angus, Limousin y Simmental (Hoppe *et al.*, 2010a), donde evaluaron el comportamiento en la manga y la salida, obtuvieron una significativa diferencia ($p < 0.01$) entre el temperamento de los machos y

las hembras, en nuestro caso teníamos disponibles pocos individuos de cada sexo, por lo cual, no es visible si existen diferencias significativas entre ellos.

En el mismo estudio, observaron diferencias significativas en las dos evaluaciones del temperamento entre las diferentes razas bovinas y en cuanto a la media obtenidas del comportamiento en la manga que varió de 1.98 puntos para machos Hereford hasta 2.92 para machos Limousin, los cuales, son valores superiores a los obtenidos en nuestro estudio. Para las evaluaciones de comportamiento en la salida reportaron valores de 1.40 para machos Hereford y hasta valores máximos de 1.89 para Simmental, siendo este último dato similar al obtenido en Brahman, sin embargo para esta raza en específico no se encontraron reportes previos de evaluaciones del temperamento en la salida de la manga.

Otro reporte indica la media de la velocidad de salida de 2.52m/s y específicamente por razas 2.61 m/s para Charolais, 2.50 m/s para Angus y de 2.45 m/s para razas híbridas, teniendo una alta correlación con la frecuencia de alimentación y una correlación negativa con la calidad de la carne, es decir, que los animales más temperamentales tienen velocidades de salida más rápidas y se alimentan más pero el producto no es de la mayor calidad en peso, marmoleo, etc; por lo tanto, la clasificación bovina por temperamento y comportamiento alimenticio puede ser una herramienta que ayude a la selección de los animales con el mejor desempeño productivo con la menor inversión, ya que al ser más calmados su gasto energético es menor (Nkrumah *et al.*, 2007a).

En otros tres estudios que son los únicos que emplean ganado Brahman, se buscó relacionar el temperamento bovino con diversos rasgos productivos, de eficiencia y de calidad; al igual que en nuestro caso ellos miden la velocidad de salida y el comportamiento en la manga en ganado Brahman (Cafe *et al.*, 2011). Los valores que reportan son mayores a los nuestros, ya que indican velocidades de salida de 1.54 a 2.09 m/s mientras que en este estudio se obtuvo 1.2426 m/s para las individuos de 2 años y 0.9958 m/s para los de cuatro años, esta diferencia radica en la edad de los animales que se analizaron, ya que trabajaron con vaquilla de 6 a 8 meses de edad, por lo cual, al ser más jóvenes son más rápidos y ansiosos.

Con respecto a la evaluación de comportamiento en la manga reportan medias de 1.58-2.12 para cada animal, en la escala del 1 al 5; nosotros obtuvimos un valor promedio de 2.0899. Esta diferencia se puede deber al juicio de los observadores en cada experimento, en general en este análisis las bovinos obtuvieron notas más altas que en el estudio comparativo (Cafe *et al.*, 2011).

Aunado a esto, en el segundo estudio en Brahman, evaluaron la velocidad de salida y el cortisol, obteniendo que la media de la velocidad de salida al día cero es 2.82 m/s y este valor disminuye a los 60 días a 2.25 m/s y a los 120 días de 2.11 m/s, disminuyendo de igual forma la concentración plasmática de cortisol, es decir, que el entrenamiento diario, disminuye el estrés, baja la velocidad de salida por la adaptación al manejo (Curley *et al.*, 2006).

En el tercer análisis con 31 animales neonatos Brahman (Burdick *et al.*, 2009), determinaron la velocidad de salida, para los animales calmados de 0.98 ± 0.12 m/s, los intermedios 2.32 ± 0.07 m/s y los temperamentales 3.64 ± 0.14 m/s. Al compararlos, observamos que estos valores son mayores que los obtenidos por nosotros ya que nuestro valor máximo fue de 1.58 m/s, es decir, que el ganado Brahman que evaluamos es mucho más tranquilo, posiblemente debido a que es ganado élite, utilizado en exhibiciones comerciales y acostumbrados a la interacción con humanos.

Por otra parte, no existen hasta ahora reportes de análisis genéticos de DBH con evaluaciones del comportamiento bovino y sus datos productivos; este es el primer reporte al respecto, y los estudios deben ampliarse para obtener resultados más significativos.

Se obtuvo un efecto significativo ($P=0.0326$) entre los genotipos del SNP seis y la evaluación del temperamento en la manga, esta misma evaluación mostró una tendencia ($P=0.1$) para los genotipos del SNP 7. Donde es importante resaltar que los individuos con genotipo AA tienen evaluaciones más altas en la manga (2.62 puntos), siendo más temperamentales que los portadores del genotipo GG con evaluaciones de 1.94 puntos y correspondiendo este genotipo principalmente a los individuos de raza Brahman que en este caso serían más tranquilos por estar habituados al manejo humano y ser en este caso animales élite. Conjuntamente, para el SNP 7 se

obtuvieron representados los tres genotipos en los animales evaluados y se observa un efecto aditivo por el alelo G favorable para la docilidad o comportamiento en la manga más manejable.

Así mismo, en la relación con los datos productivos se obtuvo una tendencia ($P=0.1$) para el peso al destete y el comportamiento en la salida, donde los animales más calmados tienen para el peso al destete una media de 155.97 kg, mientras que los animales de intermedios tienen 155.50 Kg y los temperamentales son los más delgados con 134.61 kg al destete. Se observó un incremento gradual del peso en respuesta al nerviosismo y una disminución en el crecimiento medido en el peso al destete, lo cual, afecta el rendimiento productivo y podría estar impactando en otros parámetros de la salud animal con el funcionamiento del sistema inmune, ya que según estudios existe una relación directa entre el estrés, el temperamento y el desempeño del sistema inmune por la inhibición de la proliferación de linfocitos (Burdick *et al.*, 2009; Burdick *et al.*, 2011b).

8.2.-ENSAYOS IN VITRO

Las transfecciones del cDNA de DBH realizadas en tres líneas de cultivo de células de mamífero, mostraron alta eficiencia de transfección, de estas los extractos protéicos obtenidos fueron adecuados en calidad y concentración, se realizaron Western Blot de control con el anticuerpo de actina siendo óptima la detección, pero en los Western Blot de DBH con diferentes concentraciones de proteínas, no se representan bandas específicas que correspondan a la proteína de DBH reconocida por el anticuerpo primario, como se observa en los controles de proteínas extraídas de suprarrenales de ratones y de células PC12 sin transfectar; lo cual podría deberse a una nula o baja producción de la proteína exógena de DBH en las células, para la confirmación se realizó la prueba de ELISA, ya que siendo cuantitativo y más sensible, este ensayo permitía una mejor detección de las variaciones sutiles en la producción de noradrenalina como medida indirecta de cambios en la funcionalidad enzimática por la presencia o ausencia de los siete nsSNPs del gel DBH.

Al respecto de estos resultados, en el ELISA no se detectó una variación en la cantidad de catecolamina generada en el sistema *in vitro* entre las diferentes construcciones ensayadas y los controles, por lo cual, se determina la ausencia de expresión de la DBH transfectada, debido a diversos factores como la inestabilidad de la enzima tetramérica generada y por discrepancias en la síntesis protéica *in vitro* versus la nativa, ya que aún existen fuertes controversias en la información disponible en el NCBI, donde en menos de cuatro años se han dado codificaciones sustanciales a la proteína incorporándose más aminoácidos, cambiando el codón de inicio, modificándose el tamaño del péptido señal y los exones, para estos estudios se empleó la información más actualizada y la secuencia del cDNA transfectado fue verificada varias veces por secuenciación, correspondiendo totalmente a la secuencia reportada en el NCBI.

Sin embargo, en estos momentos no conocemos con certeza la causa de la ausencia de expresión de la DBH, puede haber errores en la transcripción o en la traducción, insuficiencia de algún cofactor o enhancer, modificaciones del splicing, error en el codón de inicio y alteraciones en el marco de lectura, por lo cual, a posteriori se realizarán más estudios.

9.-CONCLUSIONES

En relación a los análisis *in vivo*, se validan los ocho SNPs no sinónimos (SNPs) evaluados en el gen DBH, estos son polimórficos con significativas diferencias de sus frecuencias genotípicas y alélicas con fuerte predominio de un alelo según el fondo genético cebuino o taurino.

En cuanto a las frecuencias haplotípicas existen diferencias significativas según sea el fondo genético y fin productivo de la raza bovina, por ello, la diversidad genética observada en DBH provee la base para más amplias y futuras investigaciones del temperamento, ya que a largo plazo estos SNPs podrían considerarse marcadores genéticos para diferentes fenotipos del comportamiento bovino que repercuten en los rasgos de importancia económica y que en el futuro podrían incluirse en las estrategias de selección asistidas por marcadores moleculares.

En los ocho polimorfismos evaluados en el gen de DBH no se observó efectos mayores en los rasgos productivos, posiblemente al efecto menor que estos ejercen en las características y se prevé su futuro análisis en conjunto a otros SNPs de otros genes.

Por otra parte, en los estudios *in vitro* se realizó la construcción de las recombinantes de DBH y estas se transfectaron a tres líneas celulares, sin detectarse la producción de la enzima de DBH ni su producto, debido a diversos factores como la inestabilidad de la proteína, y es importante destacar que el gen de DBH es complejo por su alto contenido de GC y por los cambios que se han dado en la determinación de su codón de inicio, péptido señal y tamaño de los exones, lo cual, dificulta su análisis; sin embargo seguramente otros investigadores continuarán estudiándolo por ser un gen biológicamente importante.

10.- PERSPECTIVAS

El presente estudio sienta las bases para futuros análisis genéticos del temperamento bovino, a su vez que plantea en perspectiva la realización de análisis con poblaciones más amplias de fondos genéticos mixtos y la evaluación *in vitro* de las construcciones recombinantes acoplado al cDNA transfectado la proteína verde fluorescente y repeticiones de adeninas posteriores al codón de paro, así como evaluar la utilización del segundo codón de inicio.

11.-BIBLIOGRAFÍA

- Abel, J. a. C., A. 1897. On the blood pressure raising constituent of the suprarenal capsule. Bull Johns Hopkins Hosp. 8: 151-157.
- Adeyemo, O. and Heath, E. 1982. Social behaviour and adrenal cortical activity in heifers. Applied Animal Ethology. 8(1-2): 99-108.
- Adriani, W., Boyer, F., Gioiosa, L., Macri, S., Dreyer, J. L., *et al.* 2009. Increased impulsive behavior and risk proneness following lentivirus-mediated dopamine transporter over-expression in rats' nucleus accumbens. Neuroscience. 159(1): 47-58.
- Aguera, E. I., Munoz, A., Castejon, F. M. and Essen-Gustavsson, B. 2001. Skeletal muscle fibre characteristics in young and old bulls and metabolic response after a bullfight. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 48(5): 313-319.
- Alvarez, M. B. and Johnson, H. D. 1973. Environmental heat exposure on cattle plasma catecholamine and glucocorticoids. J Dairy Sci. 56(2): 189-194.
- Amaral, D. G. and Sinnamon, H. M. 1977. The locus coeruleus: neurobiology of a central noradrenergic nucleus. Prog Neurobiol. 9(3): 147-196.
- Arata, S., Ogata, N., Shimozuru, M., Takeuchi, Y. and Mori, Y. 2008. Sequences and polymorphisms of the canine monoamine transporter genes SLC6A2, SLC6A3, and SLC6A4 among five dog breeds. J Vet Med Sci. 70(9): 971-975.
- Arnsten, A. F. 2000a. Genetics of childhood disorders: XVIII. ADHD, Part. 2: Norepinephrine has a critical modulatory influence on prefrontal cortical function. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 39(9): 1201-1203.
- Arnsten, A. F. 2000b. Through the looking glass: differential noradrenergic modulation of prefrontal cortical function. Neural Plast. 7(1-2): 133-146.
- Arnsten, A. F., Murphy, B. and Merchant, K. 2000. The selective dopamine D4 receptor antagonist, PNU-101387G, prevents stress-induced cognitive deficits in monkeys. Neuropsychopharmacology. 23(4): 405-410.
- Arrufat, F. J., Diaz, R., Queralt, R., Navarro, V., Marcos, T., *et al.* 2000. Analysis of the polymorphic (GT)(n) repeat at the dopamine beta-hydroxylase gene in Spanish patients affected by schizophrenia. Am J Med Genet. 96(1): 88-92.
- Bailey, J. N., Breidenthal, S. E., Jorgensen, M. J., McCracken, J. T. and Fairbanks, L. A. 2007. The association of DRD4 and novelty seeking is found in a nonhuman primate model. Psychiatr Genet. 17(1): 23-27.

- Bankstahl, U. S. and Gortelmeyer, R. 2013. Measuring subjective complaints of attention and performance failures - development and psychometric validation in tinnitus of the self-assessment scale APSA. *Health Qual Life Outcomes*. 11(1): 86.
- Beatty, D. T., Barnes, A., Taylor, E., Pethick, D., McCarthy, M., *et al.* 2006. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity. *J Anim Sci*. 84(4): 972-985.
- Benhajali, H., Boivin, X., Sapa, J., Pellegrini, P., Boulesteix, P., *et al.* 2010. Assessment of different on-farm measures of beef cattle temperament for use in genetic evaluation. *J Anim Sci*. 88(11): 3529-3537.
- Bhaduri, N. and Mukhopadhyay, K. 2008. Correlation of plasma dopamine beta-hydroxylase activity with polymorphisms in DBH gene: a study on Eastern Indian population. *Cell Mol Neurobiol*. 28(3): 343-350.
- Biggio, G., Porceddu, M. L., Fratta, W. and Gessa, G. L. 1977. Changes in dopamine metabolism associated with fasting and satiation. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 16: 377-380.
- Blackburn, J. R., Phillips, A. G., Jakubovic, A. and Fibiger, H. C. 1986. Increased dopamine metabolism in the nucleus accumbens and striatum following consumption of a nutritive meal but not a palatable non-nutritive saccharin solution. *Pharmacol Biochem Behav*. 25(5): 1095-1100.
- Blum, J. W., Bianca, W., Naf, F., Kunz, P., Fischer, J. A., *et al.* 1979. Plasma catecholamine and parathyroid hormone responses in cattle during treadmill exercise at simulated high altitude. *Horm Metab Res*. 11(3): 246-251.
- Blum, J. W. a. E., H. 1988. Epinephrine and norepinephrine related to cardiovascular and metabolic changes in calves during physical exercise. *Horm. Metab. Res.* . 20: 738-742.
- Boissy, A. 1995. Fear and fearfulness in animals. *Q Rev Biol*. 70(2): 165-191.
- 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(3-4): 259-273.
- Boissy, A. and Bouissou, M. F. 1995. Assessment of individual differences in behavioural reactions of heifers exposed to various fear-eliciting situations. *Applied Animal Behaviour Science*. 46(1-2): 17-31.
- Boissy, A. and Le Neindre, P. 1997. Behavioral, Cardiac and Cortisol Responses to Brief Peer Separation and Reunion in Cattle. *Physiol Behav*. 61(5): 693-699.
- Breese, G. R., Smith, R. D., Cooper, B. R. and Grant, L. D. 1973. Alterations in consummatory behavior following intracisternal injection of 6-hydroxydopamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 1(3): 319-328.

- Brodick, E. S., Goforth, S. A., Keene, A. H., Fossella, J. A. and Silver, L. M. 2002. Identification of quantitative trait Loci that affect aggressive behavior in mice. *J Neurosci.* 22(3): 1165-1170.
- Burdick, N. C., Banta, J. P., Neuendorff, D. A., White, J. C., Vann, R. C., *et al.* 2009. Interrelationships among growth, endocrine, immune, and temperament variables in neonatal Brahman calves. *J Anim Sci.* 87(10): 3202-3210.
- Burdick, N. C., Carroll, J. A., Hulbert, L. E., Dailey, J. W., Ballou, M. A., *et al.* 2011a. Temperament influences endotoxin-induced changes in rectal temperature, sickness behavior, and plasma epinephrine concentrations in bulls. *Innate Immun.* 17(4): 355-364.
- Burdick, N. C., Randel, R. D., Carroll, J. A. and Welsh, T. H. 2011b. Interactions between Temperament, Stress, and Immune Function in Cattle. *International Journal of Zoology.* 2011.
- Burrow, H. M. 1997a. Measurements of temperament and their relationship with performance traits of beef cattle. *Anim Breed Abstr.* 65: 477-495.
- Burrow, H. M. D., R. D. 1997b. Relationships between temperament and growth in a feedlot and commercial carcass traits of *Bos indicus* crossbreds. *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 37(4): 407-411.
- Burrow, H. M. S., G. W.; Corbet, N. J. . 1988. A new technique for measuring temperament in cattle. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 17: 154-157.
- Cafe, L. M., Robinson, D. L., Ferguson, D. M., McIntyre, B. L., Geesink, G. H., *et al.* 2011. Cattle temperament: persistence of assessments and associations with productivity, efficiency, carcass and meat quality traits. *J Anim Sci.* 89(5): 1452-1465.
- Carletta, J. 1996. Assessing agreement on classification tasks: The kappa statistic. *Computational Linguistics.* 22 (2): 249-254.
- Carlsson, A. 1959. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev.* 11(2, Part 2): 490-493.
- Cronbach, L. 1951. Coefficient alpha and the internal structure of tests. *Psychometrika.* 16(3): 297-334.
- Cubeddu, L. X., Davila, J., Zschaek, D., Barbella, Y. R., Ordaz, P., *et al.* 1981. Cerebrospinal fluid and plasma dopamine-beta-hydroxylase activity in human hypertension. *Hypertension.* 3(4): 448-455.
- Cubells, J. F. V. K., D. P.; Kelley, M. E.; Anderson, G. M.; O'Connor, D. T.; Price, L. H.; Malison, R.; Rao, P. A.; Kobayashi, K.; Nagatsu, T.; Gelernter, J. 1998. Dopamine beta-

- hydroxylase: two polymorphisms in linkage disequilibrium at the structural gene DBH associate with biochemical phenotypic variation. *Hum Genet.* 102(5): 533-540.
- Curley, K. O., Jr., Neuendorff, D. A., Lewis, A. W., Cleere, J. J., Welsh, T. H., Jr., *et al.* 2008. Functional characteristics of the bovine hypothalamic-pituitary-adrenal axis vary with temperament. *Horm Behav.* 53(1): 20-27.
- Curley, K. O., Jr., Paschal, J. C., Welsh, T. H., Jr. and Randel, R. D. 2006. Technical note: Exit velocity as a measure of cattle temperament is repeatable and associated with serum concentration of cortisol in Brahman bulls. *J Anim Sci.* 84(11): 3100-3103.
- Chen, K., Holschneider, D. P., Wu, W., Rebrin, I. and Shih, J. C. 2004. A spontaneous point mutation produces monoamine oxidase A/B knock-out mice with greatly elevated monoamines and anxiety-like behavior. *J Biol Chem.* 279(38): 39645-39652.
- Dantzer, R. and Mormede, P. 1983a. Stress in farm animals: a need for reevaluation. *J Anim Sci.* 57(1): 6-18.
- Dantzer, R., Mormede, P., Bluthé, R. M. and Soissons, J. 1983b. The effect of different housing conditions on behavioural and adrenocortical reactions in veal calves. *Reprod Nutr Dev.* 23(3): 501-508.
- Deerenberg, C. and Overkamp, G. J. 1999. Hard work impinges on fitness: an experimental study with zebra finches. *Anim Behav.* 58(1): 173-179.
- Edwards, A. C., Rollmann, S. M., Morgan, T. J. and Mackay, T. F. 2006. Quantitative genomics of aggressive behavior in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 2(9): e154.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online.* 1: 47-50.
- Excoffier, L. and Lischer, H. E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 10(3): 564-567.
- Excoffier, L. and Slatkin, M. 1995. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol.* 12(5): 921-927.
- Fernandez, F., Colson, N., Quinlan, S., MacMillan, J., Lea, R. A., *et al.* 2009. Association between migraine and a functional polymorphism at the dopamine beta-hydroxylase locus. *Neurogenetics.* 10(3): 199-208.
- Garland, E. M., Hahn, M. K., Ketch, T. P., Keller, N. R., Kim, C. H., *et al.* 2002. Genetic basis of clinical catecholamine disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 971: 506-514.
- Gautier, M., Laloe, D. and Moazami-Goudarzi, K. 2010. Insights into the genetic history of French cattle from dense SNP data on 47 worldwide breeds. *PLoS One.* 5(9).

- Geiger, B. M., Haburcak, M., Avena, N. M., Moyer, M. C., Hoebel, B. G., *et al.* 2009. Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity. *Neuroscience*. 159(4): 1193-1199.
- Gibbs, R. A., Taylor, J. F., Van Tassell, C. P., Barendse, W., Eversole, K. A., *et al.* 2009. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science*. 324(5926): 528-532.
- Glenske, K., Prinzenberg, E.-M., Brandt, H., Gauly, M. and Erhardt, G. 2011. A chromosome-wide QTL study on BTA29 affecting temperament traits in German Angus beef cattle and mapping of DRD4. *Animal*. 5(02): 195-197.
- Grace, A. A., Gerfen, C. R. and Aston-Jones, G. 1998a. Catecholamines in the central nervous system. Overview. *Adv Pharmacol*. 42: 655-670.
- Grace, A. A., Moore, H. and O'Donnell, P. 1998b. The modulation of corticoaccumbens transmission by limbic afferents and dopamine: a model for the pathophysiology of schizophrenia. *Adv Pharmacol*. 42: 721-724.
- Grandin, T. 1980a. Good cattle-restraining good equipment is essential. *Vet Med Small Anim Clin*. 75(8): 1291-1296.
- Grandin, T. 1980b. Livestock behaviour as related to handling facilities design. *International Journal for the study of Animal problems* 1: 33-52.
- Grandin, T. 1980c. Observations of cattle behavior applied to the design of cattle-handling facilities. *Applied Animal Ethology*. 6(1): 19-31.
- Grandin, T. 1993a. Behavioral agitation during handling of cattle is persistent over time. *Applied Animal Behaviour Science*. 36(1): 1-9.
- Grandin, T. 1993b. Teaching principles of behavior and equipment design for handling livestock. *J Anim Sci*. 71(4): 1065-1070.
- Grandin, T. 1997. Assessment of stress during handling and transport. *J Anim Sci*. 75(1): 249-257.
- Grignard, L. B., X.; Boissy, A.; Le Neindre, P. 2001. Do beef cattle react consistently to different handling situations? *Applied Animal Behaviour Science*. 71(4): 263-276.
- Grouzmann, E., Cavadas, C., Grand, D., Moratel, M., Aubert, J. F., *et al.* 2003. Blood sampling methodology is crucial for precise measurement of plasma catecholamines concentrations in mice. *Pflugers Arch*. 447(2): 254-258.
- Guo, S. W. and Thompson, E. A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 48(2): 361-372.

- Gutiérrez-Gil, B. B., N.; Burton, D.; Haskell, M.; Williams, J. L.; Wiener, P. 2008. Identification of Quantitative Trait Loci Affecting Cattle Temperament. *Journal of Heredity*. 99(6): 629-638.
- Hall, N. L., Buchanan, D. S., Anderson, V. L., Ilse, B. R., Carlin, K. R., *et al.* 2011. Working chute behavior of feedlot cattle can be an indication of cattle temperament and beef carcass composition and quality. *Meat Sci*. 89(1): 52-57.
- Hardee, G. E., Wang Lai, J., Semrad, S. D. and Trim, C. M. 1982. Catecholamines in equine and bovine plasmas. *J Vet Pharmacol Ther*. 5(4): 279-284.
- Hearnshaw, H. and Morris, C. 1984. Genetic and environmental effects on a temperament score in beef cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*. 35(5): 723-733.
- Heffner, T. G., Hartman, J. A. and Seiden, L. S. 1980. Feeding increases dopamine metabolism in the rat brain. *Science*. 208(4448): 1168-1170.
- Hejjas, K., Vas, J., Kubinyi, E., Sasvari-Szekely, M., Miklosi, A., *et al.* 2007a. Novel repeat polymorphisms of the dopaminergic neurotransmitter genes among dogs and wolves. *Mamm Genome*. 18(12): 871-879.
- Hejjas, K., Vas, J., Topal, J., Szantai, E., Ronai, Z., *et al.* 2007b. Association of polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and the activity-impulsivity endophenotype in dogs. *Anim Genet*. 38(6): 629-633.
- Hemsworth, P. H. and Barnett, J. L. 1990. Behavioural responses affecting gilt and sow reproduction. *J Reprod Fertil Suppl*. 40: 343-354.
- Hiendleder, S., Thomsen, H., Reinsch, N., Bennewitz, J., Leyhe-Horn, B., *et al.* 2003. Mapping of QTL for Body Conformation and Behavior in Cattle. *J Hered*. 94(6): 496-506.
- Hoebel, B. G. 1985. Brain neurotransmitters in food and drug reward. *Am J Clin Nutr*. 42(5 Suppl): 1133-1150.
- Hoppe, S., Brandt, H. R., König, S., Erhardt, G. and Gauly, M. 2010a. Temperament traits of beef calves measured under field conditions and their relationships to performance. *J Anim Sci*. 88(6): 1982-1989.
- Hoppe, S., Brandt, H. R., König, S., Erhardt, G. and Gauly, M. 2010b. Temperament traits of beef calves measured under field conditions and their relationships to performance. *J Anim Sci*. 88(6): 1982-1989.
- Huang, L.-T., Gromiha, M. M. and Ho, S.-Y. 2007. iPTREE-STAB: interpretable decision tree based method for predicting protein stability changes upon mutations. *Bioinformatics*. 23(10): 1292-1293.

- Hulbert, L. E., Carroll, J. A., Burdick, N. C., Randel, R. D., Brown, M. S., *et al.* 2011. Innate immune responses of temperamental and calm cattle after transportation. *Vet Immunol Immunopathol.* 143(1-2): 66-74.
- Hurnik, J. F. W., A.B.; and Siegel, P.B. 1995. *Dictionary of farm animal behavior*, 2nd ed. Ames: Iowa State University Press.
- Ito, H., Nara, H., Inoue-Murayama, M., Shimada, M. K., Koshimura, A., *et al.* 2004. Allele frequency distribution of the canine dopamine receptor D4 gene exon III and I in 23 breeds. *J Vet Med Sci.* 66(7): 815-820.
- Kadel, M. J., Johnston, D. J., Burrow, H. M., Graser, H. and Ferguson, D. M. 2006. Genetics of flight time and other measures of temperament and their value as selection criteria for improving meat quality traits in tropically adapted breeds of beef cattle. *Australian Journal of Agricultural Research.* 57(9): 1029-1035.
- Katti, P. S., Katti, A. M. and Johnson, H. D. 1991. Determination of heat-exposure effects on the concentration of catecholamines in bovine plasma and milk. *J Chromatogr.* 566(1): 29-38.
- Khan, M. A. D., W. M.; Meyers, K. M. 1970. The effect of low environmental temperature on plasma corticosteroid and glucose concentrations in the newborn calf *Journal of Endocrinology.* 48(3): 355-363.
- Kimber, T. E., Thompson, P. D. and Kiley, M. A. 2008. Resolution of dopamine dysregulation syndrome following cessation of dopamine agonist therapy in Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience.* 15(2): 205-208.
- Kirkwood, B. R. S., J. A. 2003. *Medical statistics*, Malden: Blackwell Science Ltd.
- Kirshner, N. 1962. Uptake of catecholamines by a particulate fraction of the adrenal medulla. *J Biol Chem.* 237: 2311-2317.
- Korsten, P., Mueller, J. C., Hermannstadter, C., Bouwman, K. M., Dingemans, N. J., *et al.* 2010. Association between DRD4 gene polymorphism and personality variation in great tits: a test across four wild populations. *Mol Ecol.* 19(4): 832-843.
- Kozak, M. 1981. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 9(20): 5233-5252.
- Kozak, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell.* 44(2): 283-292.
- Landis, J. R. and Koch, G. G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33(1): 159-174.
- Laruelle, M., Abi-Dargham, A., van Dyck, C. H., Gil, R., D'Souza, C. D., *et al.* 1996. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(17): 9235-9240.

- Le Neindre, P., Trillat, G., Sapa, J., Ménissier, F., Bonnet, J. N., *et al.* 1995. Individual differences in docility in Limousin cattle. *J Anim Sci.* 73(8): 2249-2253.
- Lea, R. A., Dohy, A., Jordan, K., Quinlan, S., Brimage, P. J., *et al.* 2000. Evidence for allelic association of the dopamine beta-hydroxylase gene (DBH) with susceptibility to typical migraine. *Neurogenetics.* 3(1): 35-40.
- Lefcourt, A. M. and Elsasser, T. H. 1995. Adrenal responses of Angus x Hereford cattle to the stress of weaning. *J Anim Sci.* 73(9): 2669-2676.
- Lew, J. Y., Garcia-Espana, A., Lee, K. Y., Carr, K. D., Goldstein, M., *et al.* 1999. Increased Site-Specific Phosphorylation of Tyrosine Hydroxylase Accompanies Stimulation of Enzymatic Activity Induced by Cessation of Dopamine Neuronal Activity. *Mol Pharmacol.* 55(2): 202-209.
- Lewis, E. J., Allison, S., Fader, D., Claflin, V. and Baizer, L. 1990. Bovine dopamine beta-hydroxylase cDNA. Complete coding sequence and expression in mammalian cells with vaccinia virus vector. *J Biol Chem.* 265(2): 1021-1028.
- Lourenco-Jaramillo, D. L. 2009. Sondeo de polimorfismos en genes candidatos para bravura en bovinos. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional (IPN).
- Lourenco-Jaramillo, D. L., Sifuentes-Rincon, A. M., Parra-Bracamonte, G. M., de la Rosa-Reyna, X. F., Segura-Cabrera, A., *et al.* 2012. Genetic diversity of tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine beta-hydroxylase (DBH) genes in cattle breeds. *Genet Mol Biol.* 35(2): 435-440.
- Luksys, G., Gerstner, W. and Sandi, C. 2009. Stress, genotype and norepinephrine in the prediction of mouse behavior using reinforcement learning. *Nat Neurosci.* 12(9): 1180-1186.
- Lutcke, H. A., Chow, K. C., Mickel, F. S., Moss, K. A., Kern, H. F., *et al.* 1987. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.* 6(1): 43-48.
- MacEachern, S., Hayes, B., McEwan, J. and Goddard, M. 2009. An examination of positive selection and changing effective population size in Angus and Holstein cattle populations (*Bos taurus*) using a high density SNP genotyping platform and the contribution of ancient polymorphism to genomic diversity in Domestic cattle. *BMC Genomics.* 10: 181.
- Maejima, M., Inoue-Murayama, M., Tonosaki, K., Matsuura, N., Kato, S., *et al.* 2007. Traits and genotypes may predict the successful training of drug detection dogs. *Applied Animal Behaviour Science.* 107(3): 287-298.
- Makarova, N. P., Zislin, B. D., Simonova, Z. S. and Suganova, N. M. 1975. [Comparative evaluation of the efficacy of conservative and surgical treatment of severe forms of bronchial asthma]. *Sov Med.* (1): 48-52.

- Marino, M. D., Bourdelat-Parks, B. N., Cameron Liles, L. and Weinshenker, D. 2005. Genetic reduction of noradrenergic function alters social memory and reduces aggression in mice. *Behav Brain Res.* 161(2): 197-203.
- McHugh, E. M., McGee, R., Jr. and Fleming, P. J. 1985. Sulfation and constitutive secretion of dopamine beta-hydroxylase from rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Biol Chem.* 260(7): 4409-4417.
- Mellor, D. J., Stafford, K. J., Todd, S. E., Lowe, T. E., Gregory, N. G., *et al.* 2002. A comparison of catecholamine and cortisol responses of young lambs and calves to painful husbandry procedures. *Aust Vet J.* 80(4): 228-233.
- Momozawa, Y., Takeuchi, Y., Kusunose, R., Kikusui, T. and Mori, Y. 2005. Association between equine temperament and polymorphisms in dopamine D4 receptor gene. *Mamm Genome.* 16(7): 538-544.
- Moore, D. H., Vaidya, A. B., Long, C. A., Manning, J. S., Heppner, G. H., *et al.* 1979a. Bioactivities and the effect of dilution on various milk-borne murine mammary tumor viruses. *Int J Cancer.* 24(6): 792-799.
- Moore, J. C. and Tiffany, J. M. 1979b. Human ocular mucus. Origins and preliminary characterisation. *Exp Eye Res.* 29(3): 291-301.
- Moore, R. Y. and Bloom, F. E. 1979c. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu Rev Neurosci.* 2: 113-168.
- Mormède, P. 2005. Molecular genetics of behaviour: research strategies and perspectives for animal production. *Livestock Production Science.* 93(1): 15-21.
- Muller, D. J., Chiesa, A., Mandelli, L., De Luca, V., De Ronchi, D., *et al.* 2010. Correlation of a set of gene variants, life events and personality features on adult ADHD severity. *J Psychiatr Res.* 44(9): 598-604.
- Nkrumah, J. D., Crews, D. H., Basarab, J. A., Price, M. A., Okine, E. K., *et al.* 2007a. Genetic and phenotypic relationships of feeding behavior and temperament with performance, feed efficiency, ultrasound, and carcass merit of beef cattle. *J Anim Sci.* 85(10): 2382-2390.
- Nkrumah, J. D., Crews, D. H., Jr., Basarab, J. A., Price, M. A., Okine, E. K., *et al.* 2007b. Genetic and phenotypic relationships of feeding behavior and temperament with performance, feed efficiency, ultrasound, and carcass merit of beef cattle. *J Anim Sci.* 85(10): 2382-2390.
- Obata, T. and Yamanaka, Y. 1994. Changes in monoamine oxidase activity in rat liver during stress. *Jpn J Pharmacol.* 66(1): 149-150.

- Oxenstierna, G., Edman, G., Iselius, L., Orelund, L., Ross, S. B., *et al.* 1986. Concentrations of monoamine metabolites in the cerebrospinal fluid of twins and unrelated individuals--a genetic study. *J Psychiatr Res.* 20(1): 19-29.
- Pal, P., Mihanovic, M., Molnar, S., Xi, H., Sun, G., *et al.* 2009. Association of tagging single nucleotide polymorphisms on 8 candidate genes in dopaminergic pathway with schizophrenia in Croatian population. *Croat Med J.* 50(4): 361-369.
- Parsons, P. A. 1988. Behavior, stress, and variability. *Behav Genet.* 18(3): 293-308.
- Petherick, J. C., Doogan, V. J., Holroyd, R. G., Olsson, P. and Venus, B. K. 2009. Quality of handling and holding yard environment, and beef cattle temperament: 1. Relationships with flight speed and fear of humans. *Applied Animal Behaviour Science.* 120(1): 18-27.
- Petherick, J. C., Holroyd, R. G., Doogan, V. J. and Venus, B. K. 2002. Productivity, carcass and meat quality of lot-fed *Bos indicus* cross steers grouped according to temperament. *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 42(4): 389-398.
- Phocas, F. B., X.; Sapa, J.; Trillat, G.; Boissy, A.; Le Neindre, P. 2006. Genetic correlations between temperament and breeding traits in Limousin heifers. *Animal Science.* 82(06): 805-811.
- Price, E. O. 1984. Behavioral Aspects of Animal Domestication. *The Quarterly Review of Biology.* 59(1): 1-32.
- Punta, M., Coghill, P. C., Eberhardt, R. Y., Mistry, J., Tate, J., *et al.* 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 40(D1): D290-D301.
- Puntervoll, P., Linding, R., Gemund, C., Chabanis-Davidson, S., Mattingsdal, M., *et al.* 2003. ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res.* 31(13): 3625-3630.
- Raymond, M. R., F. . 1995. GENEPOP Version 1.2: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity.* 1995 248-249.
- Reynolds, G. P. 1983. Increased concentrations and lateral asymmetry of amygdala dopamine in schizophrenia. *Nature.* 305(5934): 527-529.
- Robertson, D., Goldberg, M. R., Onrot, J., Hollister, A. S., Wiley, R., *et al.* 1986. Isolated failure of autonomic noradrenergic neurotransmission. Evidence for impaired beta-hydroxylation of dopamine. *N Engl J Med.* 314(23): 1494-1497.
- Ross, S. B., Wetterberg, L. and Myrhed, M. 1973. Genetic control of plasma dopamine-beta-hydroxylase. *Life Sci.* 12(12): 529-532.
- Rousset, F. 2008. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour.* 8(1): 103-106.

- Rulofson, F. C., Brown, D. E. and Bjur, R. A. 1988. Effect of blood sampling and shipment to slaughter on plasma catecholamine concentrations in bulls. *J Anim Sci.* 66(5): 1223-1229.
- Rushen, J., Boissy, A., Terlouw, E. M. C. and ´, A. M. B. d. P. 2010. Opioid Peptides and Behavioral and Physiological Responses of Dairy Cows to Social Isolation in Unfamiliar Surroundings1.
- Sabban, E. L., Goldstein, M. and Greene, L. A. 1983a. Regulation of the multiple forms of dopamine beta-hydroxylase by nerve growth factor, dexamethasone, and dibutyryl cyclic AMP in the PC12 pheochromocytoma cell line. *J Biol Chem.* 258(12): 7819-7823.
- Sabban, E. L., Greene, L. A. and Goldstein, M. 1983b. Mechanism of biosynthesis of soluble and membrane-bound forms of dopamine beta-hydroxylase in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem.* 258(12): 7812-7818.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4(4): 406-425.
- Sambrook J., F. E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY.
- Saxena, A. and Fleming, P. J. 1983. Isolation and reconstitution of the membrane-bound form of dopamine beta-hydroxylase. *J Biol Chem.* 258(7): 4147-4152.
- Schmutz, S. and Schmutz, J. 1998. Heritability estimates of behaviors associated with hunting in dogs. *Journal of Heredity.* 89(3): 233-237.
- Schmutz, S. M., Stookey, J. M., Winkelman-Sim, D. C., Waltz, C. S., Plante, Y., *et al.* 2001. A QTL study of cattle behavioral traits in embryo transfer families. *J Hered.* 92(3): 290-292.
- Schrooten, C., Bovenhuis, H., Coppieters, W. and Van Arendonk, J. A. M. 2000. Whole genome scan to detect quantitative trait loci for conformation and functional traits in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 83(4): 795-806.
- Schutz, K., Kerje, S., Carlborg, O., Jacobsson, L., Andersson, L., *et al.* 2002. QTL analysis of a red junglefowl x White Leghorn intercross reveals trade-off in resource allocation between behavior and production traits. *Behav Genet.* 32(6): 423-433.
- Senard, J. M. and Rouet, P. 2006. Dopamine beta-hydroxylase deficiency. *Orphanet J Rare Dis.* 1: 7.
- Sewalem, A., Miglior, F. and Kistemaker, G. J. 2011. Genetic parameters of milking temperament and milking speed in Canadian Holsteins. *J Dairy Sci.* 94(1): 512-516.

- Sherman, E. L., Nkrumah, J. D., Li, C., Bartusiak, R., Murdoch, B., *et al.* 2009. Fine mapping quantitative trait loci for feed intake and feed efficiency in beef cattle. *J Anim Sci.* 87(1): 37-45.
- Smeeton, N. C. 1985. Early History of the Kappa Statistic. *Biometrics.* 41: 795.
- Spelman, R. J., Huisman, A. E., Singireddy, S. R., Coppieters, W., Arranz, J., *et al.* 1999. Quantitative trait loci analysis on 17 nonproduction traits in the New Zealand dairy population. *J Dairy Sci.* 82(11): 2514-2516.
- Stephens, D. B. and Toner, J. N. 1975. Husbandry influences on some physiological parameters of emotional responses in calves. *Applied Animal Ethology.* 1(3): 233-243.
- Stephens, M. and Scheet, P. 2005. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet.* 76(3): 449-462.
- Stephens, M., Smith, N. J. and Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 68(4): 978-989.
- Sugiyama, A., Inoue-Murayama, M., Miwa, M., Ohashi, R., Kayang, B. B., *et al.* 2004. Polymorphism of dopamine receptor D4 exon I corresponding region in chicken. *Zoolog Sci.* 21(9): 941-946.
- Sutherland, M. A., Rogers, A. R. and Verkerk, G. A. 2012. The effect of temperament and responsiveness towards humans on the behavior, physiology and milk production of multiparous dairy cows in a familiar and novel milking environment. *Physiol Behav.* 107(3): 329-337.
- Szczycka, M. S., Rainey, M. A., Kim, D. S., Alaynick, W. A., Marck, B. T., *et al.* 1999. Feeding behavior in dopamine-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(21): 12138-12143.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24(8): 1596-1599.
- Tamura, K., Nei, M. and Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(30): 11030-11035.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., *et al.* 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28(10): 2731-2739.
- Tang, Y. L., Epstein, M. P., Anderson, G. M., Zabetian, C. P. and Cubells, J. F. 2007. Genotypic and haplotypic associations of the DBH gene with plasma dopamine beta-hydroxylase activity in African Americans. *Eur J Hum Genet.* 15(8): 878-883.

- Thomas, S. A. and Palmiter, R. D. 1997. Impaired maternal behavior in mice lacking norepinephrine and epinephrine. *Cell*. 91(5): 583-592.
- Thomas, S. A. and Palmiter, R. D. 1998. Examining adrenergic roles in development, physiology, and behavior through targeted disruption of the mouse dopamine beta-hydroxylase gene. *Adv Pharmacol*. 42: 57-60.
- Tier, B. H., JM; McSweeney, JM. 2001. Potential for improving the docility of Limousin cattle in Australia. *Proc. Adv. Anim. Breed.Gen.* 14: 345-348.
- Timmers, H. J., Deinum, J., Wevers, R. A. and Lenders, J. W. 2004. Congenital dopamine-beta-hydroxylase deficiency in humans. *Ann N Y Acad Sci*. 1018: 520-523.
- Tochigi, M., Otowa, T., Hibino, H., Kato, C., Otani, T., *et al.* 2006. Combined analysis of association between personality traits and three functional polymorphisms in the tyrosine hydroxylase, monoamine oxidase A, and catechol-O-methyltransferase genes. *Neurosci Res*. 54(3): 180-185.
- Todt, U., Netzer, C., Toliat, M., Heinze, A., Goebel, I., *et al.* 2009. New genetic evidence for involvement of the dopamine system in migraine with aura. *Hum Genet*. 125(3): 265-279.
- Topál, J. M., A; Gácsi, M; Dóka, A; Pongrácz, P; *et al.* . 2009. The dog as a model for understanding human social behavior. *Adv Stud Behav* 39: 71-116.
- Tsunoda, M. 2006. Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites. *Anal Bioanal Chem*. 386(3): 506-514.
- Tulloh, N. M. 1961. Behaviour of cattle in yards. II. A study of temperament. *Animal Behaviour*. 9(1-2): 25-30.
- Turri, M. G., Datta, S. R., DeFries, J., Henderson, N. D. and Flint, J. 2001. QTL analysis identifies multiple behavioral dimensions in ethological tests of anxiety in laboratory mice. *Curr Biol*. 11(10): 725-734.
- Uetake, K., Tanaka, T. and Sato, S. 2011. Effects of haul distance and stocking density on young suckling calves transported in Japan. *Anim Sci J*. 82(4): 587-590.
- Ungerstedt, U. 1971. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl*. 367: 95-122.
- Viggiano, D., Ruocco, L. A. and Sadile, A. G. 2003. Dopamine phenotype and behaviour in animal models: in relation to attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 27(7): 623-637.
- Villa-Angulo, R., Matukumalli, L. K., Gill, C. A., Choi, J., Van Tassell, C. P., *et al.* 2009. High-resolution haplotype block structure in the cattle genome. *BMC Genet*. 10: 19.

- Viskupic, E., Kvetnansky, R., Sabban, E. L., Fukuhara, K., Weise, V. K., *et al.* 1994. Increase in rat adrenal phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA level caused by immobilization stress depends on intact pituitary-adrenocortical axis. *J Neurochem.* 63(3): 808-814.
- Von Euler, U. S. 1946. A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (sympathin) and its relations to adrenaline and nor-adrenaline. *Acta Physiologica Scandinavica.* 12: 73–96.
- Voon, V. F., S. H. 2007. Medication-related impulse control and repetitive behaviors in parkinson disease. *Arch Neurol.* 64(8): 1089-1096.
- Wallace, E. F., Krantz, M. J. and Lovenberg, W. 1973. Dopamine-beta-hydroxylase: a tetrameric glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70(8): 2253-2255.
- Wegenhoft, M. A. 2005. Locating quantitative trait loci associated with disposition in cattle. Senior Honor Thesis, Texas A&M University.
- Weinshilboum, R. M., Raymond, F. A., Elveback, L. R. and Weidman, W. H. 1973. Serum dopamine-beta-hydroxylase activity: sibling-sibling correlation. *Science.* 181(4103): 943-945.
- Weinshilboum, R. M., Schorott, H. G., Raymond, F. A., Weidman, W. H. and Elveback, L. R. 1975. Inheritance of very low serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Am J Hum Genet.* 27(5): 573-585.
- Weintraub, D. S., A. D.; Potenza, M. N. and *et al.* 2006. Association of dopamine agonist use with impulse control disorders in parkinson disease. *Arch Neurol.* 63(7): 969-973.
- Winkler, H. 1976. The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience.* 1(2): 65-80.
- Ye, C., Liu, J., Ren, F. and Okafo, N. 2000. Design of experiment and data analysis by JMP (SAS institute) in analytical method validation. *J Pharm Biomed Anal.* 23(2-3): 581-589.
- Zabetian, C. P., Anderson, G. M., Buxbaum, S. G., Elston, R. C., Ichinose, H., *et al.* 2001. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine beta-hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am J Hum Genet.* 68(2): 515-522.
- Zabetian, C. P., Buxbaum, S. G., Elston, R. C., Kohnke, M. D., Anderson, G. M., *et al.* 2003. The structure of linkage disequilibrium at the DBH locus strongly influences the magnitude of association between diallelic markers and plasma dopamine beta-hydroxylase activity. *Am J Hum Genet.* 72(6): 1389-1400.
- Zigmond, M. J., Heffner, T. G. and Stricker, E. M. 1980. The effect of altered dopaminergic activity on food intake in the rat: evidence for an optimal level of dopaminergic activity for behavior. *Prog Neuropsychopharmacol.* 4(4-5): 351-362.

Zis, A. P. and Fibiger, H. C. 1975a. Functional evidence for postsynaptic supersensitivity of central noradrenergic receptors after denervation. *Nature*. 256(5519): 659-660.

Zis, A. P. and Fibiger, H. C. 1975b. Neuroleptic-induced deficits in food and water regulation: similarities to the lateral hypothalamic syndrome. *Psychopharmacologia*. 43(1): 63-68.

12.-GLOSARIO

ADN: Ácido desoxirribonucleico, polinucleótido con una secuencia específica de unidades de desoxirribonucleótidos unidos covalentemente mediante enlaces 3',5'-fosfodiéster, actúa como portador de la información genética.

Catecolaminas: son derivados aminados del catecol, que actúan como hormonas en los organismos desempeñando variadas funciones biológicas importantes.

Codón: en un ácido nucleico es la secuencia de tres nucleótidos que codifican para un aminoácido específico según el uso del código genético.

Corticosteroides: son hormonas segregadas por la corteza adrenal y son del tipo esteroidal.

Enzima: es una proteína que cataliza una reacción química específica.

Exón: segmento de un gen eucariótico que permanece después de la maduración postranscripcional y se transcribe en proteína.

Fenotipo: características observables de un organismo.

Gen: segmento de un cromosoma que codifica una sola cadena polipeptídica funcional o molécula de RNA.

Gen candidato: aquel gen que presenta un efecto funcional conocido y puede influir en características de interés.

Genoma: toda la información genética en forma codificada contenida en una célula o virus.

Genotipo: constitución genética de un organismo a diferencia de sus características físicas.

Intrón: en un gen es la secuencia de nucleótidos que se transcribe pero no se traduce.

Leche (L): es la diferencia esperada en el peso por la habilidad genética de las hijas del semental para producir leche se expresa en kilogramos de peso al destete de los hijos de las hembras del semental.

Locus: localización cromosomal de un marcador genético o de ADN.

Manejo asistido: conducir la selección de los animales según las características deseables para las próximas generaciones, frecuentemente se realiza el manejo asistido empleando marcadores moleculares dentro de los programas de mejoramiento genético.

Materno Total (MT): es la diferencia esperada en el peso, se estima sumando la mitad del valor de la DEP Peso al Destete al total del valor de la DEP Leche.

Mutación: es un cambio o alteración en la estructura del DNA, de forma permanente y heredable.

Neurotransmisor: es un compuesto indispensable para la transmisión del impulso nervioso y la comunicación neuronal, es secretado en la terminal de la neurona presináptica y transportado a su receptor específico en la neurona posináptica.

Nucleótido: nucleósido fosforilado en uno de los grupos hidroxilo de su pentosa.

Oligo: secuencia corta de oligonucleótidos que se une por complementariedad a una hebra de ADN para generar el punto de inicio de la síntesis de la hebra complementaria.

QTL: área de un cromosoma donde reside un gen para un rasgo particular, locus genético asociado con una característica de importancia, en su mayoría son rasgos multifactoriales y son influenciados por poligenes.

PCR: es la amplificación de una secuencia específica de ADN.

Peso al Nacimiento (PN): es la diferencia esperada en el peso promedio del becerro tomado durante las primeras 24 horas después de haber nacido.

Peso al Destete (PD): es el peso promedio al destete de la progenie.

Peso al Destete ajustado a los 205 días (PDA): es la diferencia esperada en el peso promedio al destete de la progenie, resultante de multiplicar la ganancia diaria predestete por 205 días y sumarle el peso al nacimiento ajustando el valor según la edad de la madre y el sexo del animal.

Peso al Año a los 365 días (PA): es la diferencia esperada en el peso promedio al año de la progenie, producto de multiplicar la ganancia diaria post destete por 160 días y sumarle el peso ajustado al destete.

RFLP: son cambios en las secuencias que se emplean en la amplificación por PCR, y que afectan el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción, originando diferencias en los tamaños de los fragmentos de DNA producidos por digestión con la enzima de restricción específica.

SNP: mutación puntual que ocurre en algunos individuos de una población, generalmente por transición, transversión o delección de una única base.

Talla (T): es la diferencia esperada en talla calculada como la altura a la cadera ajustada a los 365 días.

13.-ANEXOS

Anexo 1: Artículo “Genetic diversity of tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine β -hydroxylase (DBH) genes in cattle breeds”.



Genetics and Molecular Biology, 35, 2, 435-440 (2012)
Copyright © 2012, Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil
www.sbg.org.br

Short Communication

Genetic diversity of tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine β -hydroxylase (DBH) genes in cattle breeds

Diana Lelidett Lourenco-Jaramillo¹, Ana María Sifuentes-Rincón¹, Gaspar Manuel Parra-Bracamonte¹, Xochitl Fabiola de la Rosa-Reyna¹, Aldo Segura-Cabrera² and Williams Arellano-Vera¹

¹Laboratorio de Biotecnología Animal, Centro de Biotecnología Genómica, Tamaulipas, México.

²Laboratorio de Biomedicina, Centro de Biotecnología Genómica, Tamaulipas, México.

Abstract

DNA from four cattle breeds was used to re-sequence all of the exons and 56% of the introns of the bovine tyrosine hydroxylase (TH) gene and 97% and 13% of the bovine dopamine β -hydroxylase (DBH) coding and non-coding sequences, respectively. Two novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) and a microsatellite motif were found in the TH sequences. The DBH sequences contained 62 nucleotide changes, including eight non-synonymous SNPs (nsSNPs) that are of particular interest because they may alter protein function and therefore affect the phenotype. These DBH nsSNPs resulted in amino acid substitutions that were predicted to destabilize the protein structure. Six SNPs (one from TH and five from DBH non-synonymous SNPs) were genotyped in 140 animals; all of them were polymorphic and had a minor allele frequency of > 9%. There were significant differences in the intra- and inter-population haplotype distributions. The haplotype differences between Brahman cattle and the three *B. t. taurus* breeds (Charolais, Holstein and Lidia) were interesting from a behavioural point of view because of the differences in temperament between these breeds.

Key words: behavior, *B. t. indicus*, *B. t. taurus*, catecholamine, temperament.

Received: June 10, 2011; Accepted: February 15, 2012.

Basic cattle behavioural traits include social behaviour such as aggression and temperament (Buchenaucr, 1999). These traits may have a direct economic impact and can be included in selection strategies (Mormède, 2005; Nkrumah *et al.*, 2007; Core *et al.*, 2009). Studies that have investigated an association between behaviour and production traits have found that nervous or aggressive animals have a decreased milk flow and yield (Rushen, cited by Hiedler *et al.*, 2003). Temperament, which is defined as the animal's response to handling by humans (Burrow and Dillon, 1997), has been studied in different breeds, and has been shown to affect growth, health, performance and carcass merit (Fox *et al.*, 2004; Nkrumah *et al.*, 2004, 2007; Core *et al.*, 2009).

There are important temperament differences between *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* breeds and their crosses. Grandin (1980) found that the flight distances of Brahman cattle were longer than those of British breed cattle. Hearnshaw and Morris (1984) reported significant differences in the temperament of *B. t. taurus*- and *B. t.*

indicus-derived breeds and among calves sired by *B. t. indicus* bulls; in contrast, there were no significant differences amongst calves sired by Hereford bulls.

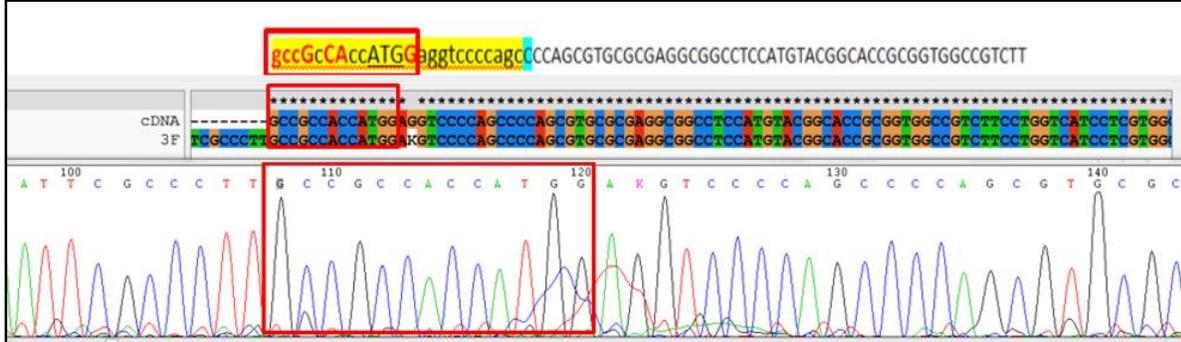
Genes that encode different regulatory enzymes, transporters and receptors of the serotonin and dopamine signalling pathways may have a marked influence on genetic variation and phenotypic effects. Tyrosine hydroxylase (TH) is the rate-limiting enzyme for dopamine biosynthesis (Marsden, 2006). Genetic polymorphisms in the TH gene have been associated with different neurological and psychiatric conditions in humans (Giegling *et al.*, 2009). Another target gene is dopamine β -hydroxylase (DBH), which is one of the most important enzymes for noradrenaline (NA) production. In humans, the genetic variation in this gene has been associated with maternal behaviour, feeding behaviour, impulsive behaviour, motivation, behaviour reinforcement and stimuli that produce stress (Hoebel 1985; Thomas and Palmer 1997; Szczypka *et al.*, 1999; Adriani *et al.*, 2008; Geiger *et al.*, 2009; Luksys *et al.*, 2009).

The TH and DBH genes have also been studied in non-human mammals. Takeuchi *et al.* (2005) screened for polymorphisms in brain samples from ten unrelated Beagles and found two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in DBH and four in TH. These SNPs were subse-

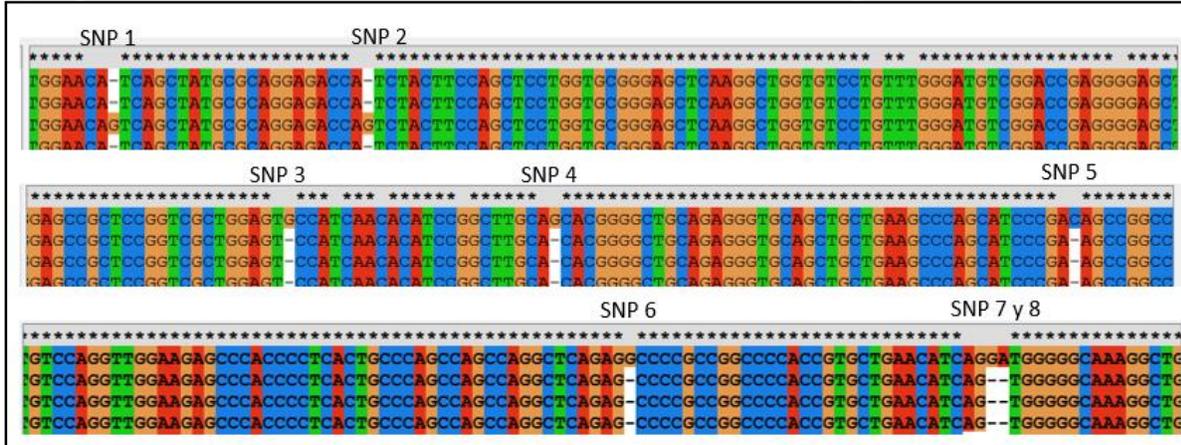
Send correspondence to Ana María Sifuentes-Rincón. Laboratorio de Biotecnología Animal, Centro de Biotecnología Genómica, Blvd. del Maestro, Esq. con Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710, Cd. Reynosa, Tamaulipas, México. E-mail: asifuentes@ipn.mx.

Anexo 2: Imágenes de los electroferogramas de las secuenciaciones de las clonas.

Inicio consenso Kozak para vertebrados insertado en las clonas recombinantes:



Ejemplos de secuencias de las clonas obtenidas sin mutaciones para los 8SNPs:



Ejemplo de la secuencia de la clona recombinante portadora de los SNPs:

