



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Polimorfismos genéticos asociados al temperamento en ovinos merino australiano

Estefanía ROMANIUK COLMAN

Magíster en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Animales

Mayo 2023

**Polimorfismos genéticos asociados al
temperamento en ovinos merino
australiano**

Estefanía ROMANIUK COLMAN

Magíster en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Animales

Mayo 2023

Tesis aprobada por el tribunal integrado por DMTV, PhD Aline Sant' Anna, DMTV, PhD Eileen Armstrong y DMTV, PhD Julio Olivera el 18 de mayo de 2023. Autora: Ing. Agr. Estefanía Romaniuk. Directora: DMTV, PhD Elize van Lier. Cotutores: DMTV, PhD Juan Pablo Damián e Ing. Agr., PhD Gabriel Ciappesoni.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi esposo por brindarme todo su apoyo y comprensión. Gracias por darme ánimo y valentía cuando más lo necesité.

A mi tutora DMTV, PhD Elize van Lier y cotutores DMTV, PhD Juan Pablo Damián e Ing. Agr., PhD Gabriel Ciappesoni, quienes me han desafiado con la temática de investigación, y por contribuir no sólo en mis estudios de posgrado, sino también en mi crecimiento personal.

De manera especial agradecer a la QBP, MSc Brenda Vera, quien me ha brindado su apoyo incondicional para una buena comprensión científica y desarrollo de la investigación. Con ella no sólo compartimos momentos académicos día a día, sino también gratos momentos de camaradería, lo que nos llevó a una hermosa amistad mexicana. También al Lic. Bioq., MSc Pablo Peraza, por su constante colaboración.

A mis compañeros de trabajo Tec. Agr. Darío Fros y Sergio Casco, por su colaboración en el trabajo de campo.

Como parte del financiamiento para el proyecto, agradecer a:

- Consejo Académico de Posgrado, por otorgarme la beca de apoyo a docentes para estudios de posgrado de la Udelar, maestría 2020 (POS_NAC_2019_1_157979).
- Comisión Sectorial de Investigación Científica, a través de la cual se aprobó el proyecto CSIC_I+D_2018_287.
- Proyecto SMARTER financiado por el programa de la Unión Europea Horizon 2020 (acuerdo n.º 772787).
- Proyectos INIA: CL 40 (resistencia a parásitos) y CL 38 (RUMIAR).

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN	V
SUMMARY	VI
1) <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 TEMPERAMENTO, HEREDABILIDAD Y BIENESTAR ANIMAL	2
1.2 ESTRÉS Y TEMPERAMENTO ANIMAL	5
1.3 TEMPERAMENTO Y PRODUCCIÓN ANIMAL	8
1.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y TEMPERAMENTO .	11
1.4.1 <u>Polimorfismos vinculados a neurotransmisores</u> ..	12
1.4.2 <u>Polimorfismos vinculados al eje HHA</u>	14
1.5 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN UTILIZANDO LA METODOLOGÍA ssGWAS	16
1.6 HIPÓTESIS	17
1.7 OBJETIVOS.....	17
2) <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	19
2.1 FENOTIPOS, GENOTIPOS y PEDIGRÍ.....	19
2.2 ESTADÍSTICA	21
2.2.1 <u>Modelo univariado para temperamento</u>	21
2.2.2 <u>Estimación de componentes de la varianza</u>	22
2.3 <i>SINGLE STEP GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY (SSGWAS)</i>	22
2.4 CONTROLES DE CALIDAD: FILTRADO DE MUESTRAS SNP	23
2.5 SELECCIÓN DE SNP Y REGIONES GENÓMICAS.....	24
2.6 ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO.....	25
3) <u>RESULTADOS</u>	27
3.1 ESTIMACIÓN DE COMPONENTES DE LA VARIANZA..	28

3.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GENÓMICO.....	28
3.3 ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO.....	33
4) <u>DISCUSIÓN</u>	37
4.1 CROMOSOMA 21 Y GENES CANDIDATOS	39
4.2 CROMOSOMA 10 Y GENES CANDIDATOS	41
4.3 CROMOSOMA 6 Y GENES CANDIDATOS	42
4.4 ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL.....	43
5) <u>CONCLUSIONES</u>	47
6) <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	48
7) <u>ANEXOS</u>	68
ANEXO 1: CANDIDATE GENES AND PATHWAYS ASSOCIATED WITH TEMPERAMENT TRAIT IN SHEEP	68
ABSTRACT	69
1) INTRODUCTION.....	70
2) MATERIALS AND METHODS.....	72
2.1 Phenotype Data.....	72
2.2 Genotype Data.....	72
2.3 Pedigree Data	73
2.4 Statistical Analysis	73
2.2.1 Estimation of Genetic Parameters.....	74
2.5 Single Step Genome Wide Association Studies (ssGWAS).....	74
2.6 SNP Selection and Genomic Regions.....	75
2.7 Genetic Enrichment.....	76
2.7.1 Mapping SNP to Genes.....	76
2.7.1 Assignment of Genes to Functional Categories ...	77
3) RESULTS	78
3.1 Estimation of Genetic Parameters.....	78
3.2 Single Step Genome Wide Association Studies (ssGWAS).....	78
3.3 Enrichment Analysis.....	82

4) DISCUSSION	86
5) CONCLUSIONS.....	94
6) REFERENCES	95

RESUMEN

El temperamento puede definirse como la variabilidad emocional entre animales de la misma especie en respuesta a un mismo estímulo. La reactividad emocional es una variable que se usa para observar el temperamento animal; acorde a esto, se pueden describir animales calmos, nerviosos o intermedios. La presencia de variantes genéticas en la secuencia de ADN en la vía de neurotransmisores y del eje de respuesta al estrés (eje hipotálamo-hipófisis-adrenal), puede afectar la respuesta comportamental y fisiológica de los ovinos. La hipótesis de este estudio es que existen polimorfismos genéticos de un solo nucleótido (SNP) vinculados al rasgo de temperamento en ovinos de la raza Merino Australiano. El objetivo principal fue identificar los SNP asociados al fenotipo de temperamento; el objetivo secundario identificar genes candidatos. La base de datos para desarrollar el ssGWAS consistió en utilizar cuatro generaciones de ovinos que incluyeron 4317 animales con fenotipo, 1697 genotipados y 10799 en genealogía. Luego del control de calidad, se retuvo un total de 38268 SNP efectivos. La heredabilidad estimada fue de $0,19 \pm 0,038$. El ssGWAS permitió identificar tres regiones genómicas que explicaron el mayor porcentaje de la varianza genética. Se identificaron 25 SNP asociados a nueve genes candidatos en los cromosomas 6, 10 y 21. Se destacan los genes **PYMG** (**rs402505013**, % var = 1,46) vinculado al metabolismo energético del glucógeno; gen **CAPN1** (**rs413708295**, % var = 1,16; **rs421553713**, % var = 1,09; **rs161627624**, % var = 0,85; **rs404318469**, % var = 0,58) asociado a la terneza de la carne; gen **GRID2** (**rs422603241**, % var = 0,76; **rs399480023**, % var = 0,52) receptor de glutamato, relacionado a procesos biológicos de la transmisión sináptica y gen **SYT7** (**rs421709693**, % var = 0,54), asociado al metabolismo del calcio. Los SNP detectados podrían ser usados como marcadores moleculares para futuros estudios asociados al temperamento o a rasgos de comportamiento asociados al estrés.

Palabras clave: SNP, ssGWAS, *ovis aries*, **PYMG**, **CAPN1**, **GRID2**, **SYT7**

SUMMARY

Genetic polymorphisms associated with temperament in Australian Merino sheep

Temperament can be defined as the emotional variability among animals of the same species in response to the same stimulus. Emotional reactivity is a variable used to observe animal temperament; according to this, calm, nervous or intermediate animals can be described. The behavioral and physiological response of sheep can be associated with the presence of genetic variants in the DNA sequence in the neurotransmitter pathways and the stress response axis (hypothalamus-pituitary-adrenal axis). The hypothesis of this study was that there are Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) associated with the temperament trait in Australian Merino sheep. The main objective of this study was to identify the SNP associated with the temperament phenotype; the secondary objective was to identify candidate genes and pathways associated with the temperament. The database used for the ssGWAS consisted of 4,317 phenotyped animals, 1,697 animals genotyped and 10,799 animals in the pedigree (level three). The estimated heritability was 0.19 ± 0.03 (\pm SEM). After quality control 38,268 effective SNP were used. The ssGWAS identified three genomic regions that explained the greatest percentage of the genetic variance, resulting in 25 SNP associated with nine candidate genes on chromosomes 6, 10 and 21. The candidate genes were *PYMG* gene (**rs402505013**, % var = 1.46) linked to glycogen energy metabolism; *CAPN1* gene (**rs413708295**, % var = 1.16; **rs421553713**, % var = 1.09; **rs161627624**, % var = 0.85; **rs404318469**, % var = 0.58) associated with meat tenderness; *GRID2* gene (**rs422603241**, % var = 0.76; **rs399480023**, % var = 0.52) glutamate receptor, related to biological processes of synaptic transmission and *SYT7* gene (**rs421709693**, % var = 0.54), associated with calcium metabolism. The detected SNP could be used as molecular markers for future studies associated with temperament trait or behavioral associated to stress.

Keywords: SNP, ssGWAS, *ovis aries*, *PYMG*, *CAPN1*, *GRID2*, *SYT7*

1) INTRODUCCIÓN

El temperamento es una herramienta para entender el comportamiento animal y puede definirse como la variabilidad emocional entre animales de una misma especie en respuesta a un mismo estímulo (Blache y Bickell, 2010). La reactividad emocional refiere a cómo los animales perciben y reaccionan frente a estímulos del entorno, a modo de responder a la novedad, la incertidumbre, el desafío o el cambio (Clarke y Boinski, 1995). La reactividad es una variable que se usa para observar el temperamento animal, y las diferentes respuestas fisiológicas y comportamentales observadas han sido utilizadas como indicadores para clasificar a los animales según su temperamento (Veissier et al., 2009). El temperamento hace referencia a estilos o tendencias de comportamiento constantes de los individuos y puede representarse en opuestos como tímido o audaz, sociable o agresivo, inquieto o tranquilo (Southerland et al., 2012); depende de la raza y, por tanto, de la genética y selección (Boissy et al., 2005, Zambra et al., 2015). Es un rasgo inherente del animal, que estriba en la experiencia temprana de la vida y del genotipo (Bickell et al., 2009a). De acuerdo con las respuestas que manifiesten los animales, se pueden describir como calmos, nerviosos o intermedios. En los extremos, los animales calmos son aquellos con un bajo nivel de actividad conductual (menos reactivos, menos excitables), mientras que los nerviosos manifiestan mayor actividad conductual (más reactivos, más excitables).

La respuesta comportamental y fisiológica de ovinos frente a las mismas condiciones puede diferir y estar influenciada por variantes genéticas en la secuencia de ADN (polimorfismos), asociadas a regiones genómicas en la vía de neurotransmisores y del eje de respuesta al estrés (eje hipotálamo-hipófisis-adrenal) (Sapolsky et al., 2000). Los animales que mejor se adaptan a su entorno tienen el potencial para manifestar una mejor eficiencia de producción (Ponzoni, 1997). Dicha adaptación puede lograrse, en parte, a través de la selección artificial por caracteres conductuales,

donde el temperamento juega un papel importante (Cassini y Hermitte, 1994, Blache y Ferguson 2005b, Bickell et al., 2010).

Desde 1990, la Universidad de Australia Occidental (University of Western Australia, UWA) ha seleccionado ovejas merino por sus reacciones a la presencia humana en el test de arena y al aislamiento social, estableciendo líneas de ovejas calmas y nerviosas (Qiu et al., 2017). Dichos animales tienen polimorfismos genéticos asociados al sistema dopaminérgico, serotoninérgico y al eje de respuesta de estrés según su temperamento (Qiu et al., 2017, Ding et al., 2020). Es creciente el interés de la comunidad científica en las metodologías de asociación estadística entre marcadores genéticos distribuidos en todo el genoma y características fenotípicas. Desde la década del 2000, con la incorporación de la genómica en los programas de selección, existe una herramienta muy potente denominada en inglés *Single Step Genomic Wide Association Studies* (ssGWAS), la cual identifica polimorfismos de un solo nucleótido [*Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*] con argumentos estadísticos sólidos para el fenotipo de interés (Aguilar et al., 2010). Por lo tanto, en este trabajo se propone utilizar esta metodología con un set de datos genealógicos, fenotípicos y moleculares para explorar el rasgo del temperamento en ovinos de la raza merino australiano en Uruguay.

1.1. TEMPERAMENTO, HEREDABILIDAD Y BIENESTAR ANIMAL

Los ovinos son animales altamente gregarios: al separar un animal de su rebaño, este experimenta miedo asociado con emociones negativas y sufre una intensa respuesta al estrés (Price y Thos, 1980). Tanto el fenotipo como la heredabilidad genética de los rasgos de temperamento (King et al., 2006, Brown et al., 2016) han sido caracterizados a través de pruebas de comportamiento que evalúan la reactividad del individuo en respuesta al estrés (Dodd et al., 2012). La expresión o la reactividad ante una situación de aislamiento social se traduce en el aumento en la frecuencia de las eliminaciones (defecaciones y micciones), intentos de escape, aumento de

vocalizaciones y locomoción, que son indicativos de estrés y miedo (Moberg et al., 1980, Romeyer y Bouissou, 1992, Forkman et al., 2007, Damián 2011, 2021). En una situación de aislamiento, el individuo activa los ejes de respuesta al estrés modificando el comportamiento (Damián, 2011). En los ovinos, la frecuencia de las vocalizaciones ha sido validada como indicativo para evaluar el fenotipo comportamental a la respuesta al estrés durante una prueba de aislamiento social (Romeyer y Bouissou, 1992, Vandenheede et al., 1998, Forkman et al., 2007, Damián et al., 2021). La actividad locomotora y las vocalizaciones son altamente repetibles ($r = 0,40-0,76$; Blache y Ferguson, 2005), moderadamente heredables ($h = 0,45$; Blache y Ferguson, 2005a) y mínimamente afectadas por factores no genéticos (Bickell et al., 2009b).

Las tres pruebas más utilizadas para determinar fenotípicamente el temperamento son la prueba de arena, la prueba de tiempo de huida y el test del cajón de aislamiento (TCA). Con el objetivo de validar estos métodos de medición, se realizaron diferentes pruebas que demostraron que el TCA presenta mayor repetibilidad que el test de huida y la prueba de arena (0,76; 0,008 y 0,67, respectivamente) (Blache y Ferguson, 2005a, Murphy et al., 1994). La heredabilidad del temperamento estimado con el TCA para las razas evaluadas (merino australiano, poll merino, poll dorset, white suffolk, border leicester) es mayor en comparación con el estimado con el tiempo de huida (0,30 vs. 0,23, respectivamente) (Blache y Ferguson, 2005a y 2005b). La prueba del TCA para medir fenotípicamente el temperamento fue originada por Putu en 1989 y posteriormente modificada por Murphy et al. en 1994.

El TCA se realiza una vez en la vida del animal y caracteriza la reactividad del cordero al aislamiento visual en sus primeros meses posdestete, entre los 3 a 6 meses de edad. El método consiste en ingresar el cordero suavemente y de forma individual al cajón de aislamiento, el cual mide 1,50 m L x 1,50 m H x 0,75 m A, es ciego con paredes de madera compensada, piso de rejilla y con techo de sombrite (Blache y Fergusson,

2005a y 2005b). El animal permanece aislado de sus congéneres durante 30 segundos. Con un sensor de vibraciones (agitómetro) que está adjunto a un lado del cajón se mide electrónicamente las vibraciones del cajón (puntaje de agitación: EA). El agitómetro se debe calibrar previamente para el nivel bajo, medio y alto de EA a través de una unidad electrónica diseñada para simular la acción del cordero mientras está dentro del cajón. El valor numérico registrado por el agitómetro es el resultado de las reacciones del animal (movimientos y vocalizaciones) e indica que cuanto más se agita el cajón, más nervioso (reactivo) el ovino, lo que resulta en valores numéricos mayores (variable discreta, número entero). Resultados nacionales de investigación donde se utilizó el TCA como herramienta de medición determinaron que el temperamento promedio para la raza corriedale fue de 24,7 ($\pm 0,23$), con un rango de EA de 0 a 143, y para merino australiano de 36,8 ($\pm 0,45$), con un rango de 0 a 190 (Zambra et al., 2015).

La UWA ha utilizado la prueba de arena y el TCA para seleccionar ovejas de diferente temperamento, estableciendo líneas de individuos calmos y nerviosos. En Australia, la heredabilidad del temperamento ovino medido con el TCA varía entre 0,14 y 0,41 dependiendo de la raza: leicester 0,14; merino australiano 0,38; poll dorset 0,41; poll merino 0,41; white suffolk 0,29 (Blache y Ferguson, 2005a). En Uruguay, con la misma técnica, la heredabilidad fue de 0,18 a 0,31 para la raza corriedale y merino australiano, respectivamente (Zambra et al., 2015). Sin embargo, el temperamento es un rasgo que no está económicamente valorado a pesar de tener influencia en características de interés productivo (Sart et al., 2004, Murphy, 1999), como son la tasa ovulatoria (Bickell et al., 2010, Van Lier et al., 2017), la calidad de la canal (Wulf et al., 2002), la ganancia de peso diaria (Voisinet et al., 1997), la calidad del calostro y de la leche (Sart et al., 2004; Hawken et al., 2012), de favorecer el bienestar animal y de brindar seguridad al operario (Haskell et al., 2014).

El concepto de bienestar animal implica aspectos físicos y mentales positivos en relación con el cumplimiento de las necesidades fisiológicas y

comportamentales y de las expectativas del animal. Es un estado individual que depende de la percepción del ambiente por parte del animal (ANSES, 2018). En el escenario productivo se ha constituido en un importante elemento de presión hacia el sector ganadero (Del Campo, 2011), además del interés por parte del público y/o de los consumidores, por lo que se estudia y analiza con profundidad este concepto. Uruguay como país agroexportador y productor de carne no es ajeno a las exigencias del mercado; si bien está posicionado favorablemente en varios aspectos de producción, hay amenazas que deben ser evaluadas (Del Campo, 2011). Existe la necesidad de generar información científica sólida que permita certificar la calidad de producción y que esta tenga un enfoque integral, donde se consideren indicadores productivos, reproductivos, fisiológicos, bioquímicos, así como sanitarios y comportamentales. El temperamento, y su efecto sobre los diferentes indicadores mencionados podría comprenderse en programas de mejoramiento genético (Burrow, 1997, Del Campo, 2011, Haskell et al., 2014).

1.2. ESTRÉS Y TEMPERAMENTO ANIMAL

El estrés es un estado de desequilibrio de la homeostasis (Sapolsky, 2004), entendiéndose por homeostasis los mecanismos fisiológicos coordinados que mantienen en equilibrio el medio interno del organismo asegurando la supervivencia (Cannon, 1929). Dicho desbalance puede ser inducido por diferentes estímulos o eventos (Sapolsky, 2004, Damián et al., 2015), los cuales se denominan estresores (Moberg, 2000). Muchas prácticas de manejo que se realizan en la producción provocan estrés en los animales: el transporte (Baldock y Sibly, 1990), el destete (Orgeur et al., 1999), la castración (Del Campo et al., 2018), el aislamiento (Forkman et al., 2007), la esquila (Ungerfeld y Freitas de Melo, 2021, Barbieri, et al., 2016), entre otros. El estrés es un buen indicador del bienestar animal, ya que puede cuantificar el grado de respuesta del organismo frente a determinados estímulos, a través de indicadores endócrinos (glucocorticoides,

catecolaminas, vasopresina), bioquímicos (creatin-kinasa, concentración plasmática de proteínas, albúmina, eritrocitos) y fisiológicos (frecuencia cardíaca y respiratoria) y comportamentales (vocalizaciones, cambios de conducta del pastoreo, secuencia de movimientos) (Del Campo et al., 2011, Damián et al., 2013; 2021).

Cuando un animal percibe y reconoce la amenaza a la homeostasis, se activan respuestas biológicas para restablecer la función normal de homeostasis y el bienestar (Moberg, 2000). Estas respuestas incluyen mecanismos nerviosos, endócrinos y comportamentales. En primer lugar y de forma rápida, se activa el eje simpático-adreno-medular (SAM) del sistema nervioso autónomo, lo que estimula a la médula de las glándulas adrenales para la liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) a la sangre (Moberg, 2000, Sapolsky et al., 2000). Esto se traduce en aumentos de la frecuencia cardíaca y respiratoria, así como de la glucosa y ácidos grasos libres en sangre (Moberg et al., 1980, Moberg, 2000). Dichos cambios fisiológicos en el organismo ayudan a aumentar la disponibilidad de energía y oxígeno de forma inmediata (Sapolsky et al., 2000, Damián et al., 2015), y son la base de lo que se conoce como respuesta de «lucha o huida», primera respuesta autónoma del individuo para hacer frente al estresor o para escapar de este (Cannon, 1914).

La segunda vía, que actúa de forma más lenta en el tiempo (minutos a horas), es la respuesta endócrina al estrés, con la correspondiente activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y liberación de hormonas esteroideas por la corteza de la glándula adrenal, principalmente cortisol (Selye, 1939, Sapolsky et al., 2000). Las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo secretan al sistema porta-hipofisiario la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP), que actúan sinérgicamente estimulando a la adenohipófisis para liberar la hormona adrenocorticotropa (ACTH). Una vez vertida a la sangre, la ACTH estimula las células de la corteza de la glándula adrenal para que secreten cortisol (Sapolsky et al., 2000, Matteri et al., 2009). El cortisol como hormona

hiperglucemiante y catabólica estimula la gluconeogénesis y el catabolismo de proteínas y lípidos de reserva (Damián et al., 2015). Por lo tanto, el incremento de las catecolaminas, así como del cortisol, promueven una cascada de reacciones para elevar el nivel de energía disponible en el organismo, lo que facilita la respuesta frente al estresor (Sapolsky et al., 2000; Damián et al., 2015).

Por otra parte, se manifiestan cambios en el comportamiento y la reactividad que le permiten al animal afrontar la situación de amenaza, como por ejemplo incrementando la frecuencia de vocalizaciones, agresividad, estereotipias, adopción de posturas anómalas, cambios en la conducta de pastoreo, ingesta o tiempo de rumia (Baldock y Sibly, 1990, Manteca, 1998). Particularmente en el ovino, frente al aislamiento social, se observan incrementos en las vocalizaciones (Damián et al., 2013; 2021) y locomoción (Moberg et al., 1980, Romeyer y Bouissou, 1992, Forkman et al., 2007). La forma en que el organismo reacciona frente a una situación o estímulos de su entorno está dada por la reactividad emocional que dependerá, en parte, de la experiencia previa de este (Clarke y Boinski, 1995). Los animales más reactivos al manejo y a los seres humanos experimentan más estrés, se dificulta mantener un estado de homeostasis normal y reducen su bienestar (Veissier y Boissy, 2007, Bickell et al., 2009a), lo contrario a lo que sucede con animales con menor reactividad (Blache y Ferguson, 2005a).

La respuesta fisiológica y comportamental al estrés muestra una gran variabilidad individual (Manteca, 1998). Esta variabilidad en animales de diferente temperamento puede estar influenciada por polimorfismo de genes que se expresan en el cerebro o a lo largo de los ejes SAM y HHA (Qiu et al., 2016, 2017). Ovejas que fueron seleccionadas según su temperamento como calmas respondieron con menor secreción de cortisol y menor actividad de locomoción durante el aislamiento social que aquellas seleccionadas como nerviosas (Hawken et al., 2013). La concentración plasmática del cortisol en ovejas nerviosas no sólo fue de mayor magnitud, sino que también fue de mayor duración en el tiempo (Hawken et al., 2013).

Esta diferencia en la secreción de cortisol entre las dos líneas divergentes de temperamento refleja que la retroalimentación del eje HHA está influenciada por diferencias genéticas en la manera en que afrontan el estrés. Hay reportes que indican polimorfismos del gen codificante para la enzima mitocondrial citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa (CYP17) (Miller y Auchus, 2011) involucrada en la síntesis de cortisol.

1.3. TEMPERAMENTO Y PRODUCCIÓN ANIMAL

Es posible considerar que el temperamento forma parte de la fisiología reproductiva del individuo (Von Borell et al., 2007) y que el estrés puede afectar las funciones biológicas normales (Dobson et al., 2003). La mayor reactividad emocional ante un estresor (eje HHA) afecta negativamente varios niveles del funcionamiento del eje endócrino-reproductivo: hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) (Dobson y Smith, 2000, Von Borell et al., 2007, Damián et al., 2015, Narayan y Parisella, 2017). Por ejemplo, las hormonas liberadas en la respuesta de estrés afectan la secreción de GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) y, consecuentemente, de LH y FSH (hormona luteinizante, hormona folículo-estimulante) (Minton, 1994, Van Lier et al., 1999, Macfarlane et al., 2000). También se nota un detrimento en la producción de estrógenos y progesterona, que confieren una retroalimentación positiva y negativa al hipotálamo para la regulación normal del eje HHG. El estrés estaría limitando la eficiencia de los puntos endócrinos reguladores de la reproducción (ejes HHA-HHG).

En ovejas, el incremento en cortisol reduce la frecuencia de los pulsos de LH a través de inhibir la secreción pulsátil de GnRH; por lo tanto, se priva a los folículos ováricos de un adecuado soporte de gonadotropinas y producción de estradiol por parte de los folículos (Dobson y Smith, 2000, Breen et al., 2005). A su vez, la menor secreción de estradiol disminuye la expresión del comportamiento sexual (libido) (Ehnert y Moberg, 1991) afectando el éxito reproductivo. En una majada con dos líneas de selección por temperamento se observó que la tasa mellicera detectada por ecografía

a los 50 días posretiro de carneros fue más alta en ovejas calmas que en nerviosas (1,39 vs. 1,29 embriones) (Bickell et al., 2010). La tasa ovulatoria en respuesta a la sincronización de celo fue mayor en ovejas seleccionadas por temperamento calmo en comparación con ovejas seleccionadas por temperamento nervioso (1,83 vs. 1,57) (Van Lier et al., 2017); sin embargo, esta diferencia no pareció ser debido a la secreción de cortisol. Ovinos seleccionados por un temperamento calmo presentan un mejor desempeño reproductivo que aquellos seleccionados por temperamento nervioso. Esto estaría relacionado con una mejor adaptación al manejo y a su entorno, lo que potencia los efectos individuales sobre la productividad de los animales (Bickell et al., 2010; Dodd et al., 2012).

La relación entre el temperamento, el bienestar animal y la calidad del producto es estrecha (Del Campo, 2011, Del Campo et al., 2011). Animales más reactivos son más susceptibles al estrés por simples rutinas de manejo (cambio de potrero, procedimientos sanitarios) o por situaciones más novedosas (embarque, transporte, espera en corrales) (Del Campo et al., 2011). Desde el punto de vista de la carne, la mayor descarga de adrenalina y noradrenalina en individuos más reactivos provocaría un mayor consumo del glucógeno muscular, lo que impediría el correcto descenso del pH posfaena (Wulf et al., 2002). El valor final del pH muscular luego del sacrificio del animal se debe a la acumulación de ácido láctico como consecuencia de procesos metabólicos anaerobios del glucógeno (Wulf et al., 2002). Aquellos animales que sufren un mayor estrés prefaena no logran descender a un pH final del músculo óptimo para la acción de las enzimas proteolíticas (5,4-5,8) (Wulf et al., 2002, Lonergan et al., 2010). Animales con temperamento más excitable tendrían un menor descenso del pH y, consecuentemente, mayores valores de pH final (Zhang et al., 2010). Por esta razón es relevante la magnitud de las reservas del glucógeno muscular, ya que un mayor poder glucolítico se asocia a un descenso más rápido del pH, que garantiza la actividad enzimática y favorece las principales características organolépticas de la carne: terneza y color (Soria y Corva,

2004, Torino, 2013). Son varios los complejos enzimáticos involucrados en la ternera, pero las enzimas proteolíticas más importantes son las calpaínas (m-calpaína I, m-calpaína II, m-calpaína III) y su inhibidor natural, la calpastatina (Oddy et al., 2001). La evidencia científica establece correlaciones significativas entre la ternera y la expresión del gen de p94 o Calpaína III en músculo esquelético (Sorimachi et al., 1994), en bovinos ($r = 0,522$) y ovinos ($r = 0,706$) (Ilian et al., 1998, Ilian et al., 2001). El gen de Calpaína (*CAPN1*) fue descrito como un fuerte gen candidato relacionado con la ternera de la carne en bovinos (Page et al., 2002).

En bovinos, el temperamento influye en la tasa de crecimiento y, por ende, en la ganancia de peso diaria (Voisinet et al., 1997, Del Campo et al., 2011). En un *feedlot* de ganado bovino se observó que los animales más dóciles o tranquilos durante el manejo diario fueron los que tuvieron mayores ganancias promedio durante el período de engorde (1,38 vs. 0,97 kg/a/d) (Voisinet et al., 1997). Otro estudio reveló que, independientemente del tipo de alimentación (forraje, forraje + suplemento, suplemento), aquellos animales menos reactivos, aun dentro de una misma raza, tuvieron mayores ganancias de peso para los biotipos evaluados (0,73 vs. 0,53 kg/a/d) (Del Campo et al., 2011). En este mismo experimento, la relación entre el temperamento y la calidad de la carne estuvo asociada a que los animales más tranquilos produjeron carne más tierna, ya que tuvieron menores valores de fuerza de corte con el equipo Warner Bratzeler. Esto y otros parámetros fisiológicos evaluados (Del Campo et al., 2011) ponen en evidencia que el temperamento es importante en toda la cadena productiva.

Desde el punto de vista de la producción de leche, la Universidad de Western Australia, con una majada seleccionada, demostró que madres de la línea calma producen leche de mejor calidad con base en la concentración de proteínas, sin diferencias en el contenido de grasa y en el volumen producido con madres de la línea nerviosa (Sart et al., 2004). En ovejas calmas, el volumen de calostro fue mayor, menos viscoso (favoreciendo la succión del cordero) y con mayor concentración de inmunoglobulinas

(Hawken et al., 2012). Por otro lado, en un estudio sobre temperamento en poblaciones no seleccionadas, ovejas lecheras experimentales no demostraron diferencias en la producción y su temperamento no influyó en la calidad (grasa y proteína). Sin embargo, la producción de leche en función del tiempo fue estadísticamente significativa: las calmas secretaron leche de forma más temprana en las primeras horas posparto que las ovejas clasificadas como nerviosas (Murray et al., 2009).

En el período posparto, las madres seleccionadas por temperamento calmo presentaron un mejor comportamiento materno expresado en un mayor tiempo de lamido, numerosas vocalizaciones (de tono bajo) y menor tiempo de separación de sus crías, lo que condujo a un mejor vínculo madre-cría (Bickell et al., 2011, Murphy et al., 1994, Murphy, 1999). Corderos nacidos de ovejas calmas tuvieron una tasa de supervivencia 10 % mayor con respecto a corderos nacidos de madres nerviosas (Murphy, 1999).

1.4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y TEMPERAMENTO

Un polimorfismo es una variante genética en la secuencia de ADN. Hay dos tipos principales: los que generan cambio de un solo nucleótido por sustitución de bases, denominados en inglés *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP); o los que implican cambios en el tamaño de la secuencia de ADN, denominados polimorfismos de inserciones o deleciones o bien repetición o combinación de bases. Los SNP son el tipo de polimorfismo más común y frecuente en una población (más del 1 %), y hacen referencia a que en una secuencia de ADN se cambie una sola base por otra (por ejemplo, GGTACC/GGTGCC) (Brookes, 1999). Dentro de una misma población con relativo equilibrio genotípico, se pueden encontrar pequeños cambios sutiles en la secuencia de ADN que afectan únicamente a un nucleótido. Los SNP en regiones codificantes de genes (exones o regiones reguladoras) son más propensos a causar diferencias funcionales. Sin embargo, aunque la mayoría de los SNP no afecten la función de los genes, son igualmente valiosos como marcadores del genoma en la

detección de otros SNP que sí afecten la función génica (Collins et al., 1998).

1.4.1. Polimorfismos vinculados a neurotransmisores

En el sistema nervioso central (SNC), los sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos y noradrenérgicos están implicados en respuestas emocionales como ansiedad, estrés, depresión y agresividad y en los vínculos sociales (Manteca, 1998, Mohammad-Zadeh et al., 2008). Dentro de los neurotransmisores, la dopamina y la serotonina (5-hidroxitriptamina: 5-HT) son los más estudiados, pues están involucrados en la respuesta al estrés en una variedad de especies, mediante la activación de sus diferentes receptores (Reif y Lesch, 2003, Noblett y Coccaro, 2005). También juegan un rol crítico en la regulación de los comportamientos normales y anormales de los animales, incluyendo la depresión, la esquizofrenia, la hiperactividad y el déficit de atención (Esposito et al., 2008).

En humanos y en ovinos existen varios SNP de la 5-HT vinculados con rasgos de personalidad como el miedo, la impulsividad y la agresión (Bortolato et al., 2013, Qiu et al., 2017). Los polimorfismos en la vía serotoninérgica se pueden resumir en tres categorías: polimorfismos de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), de los transportadores (SERT) y de los receptores de 5-HT (Qiu et al., 2017). La síntesis de 5-HT se realiza en dos pasos y su precursor es el triptófano (TRP). El primer paso es convertir el TRP a 5-hidroxitriptofano por la enzima TPH; y el segundo es el pasaje de 5-hidroxitriptofano a 5-HT por la enzima hidroxitriptófano descarboxilasa (Mohammad-zadeh et al., 2008). Las variaciones en el gen que codifica TPH afectan la concentración de serotonina en el cerebro, así como los rasgos de comportamiento (Mann, 1999, Côté *et al.*, 2003). En humanos, un SNP en la posición 218 (-218 A/C) del gen TPH y varios SNP en la región promotora han sido asociados a comportamientos violentos, agresivos, impulsividad y alcoholismo (New et al., 1998, Nielsen et al., 1998). En cuanto a los SERT de 5-HT, los SNP (SLC6A4, rs140701, rs3813034) y el receptor 5-HT

(HTR2A, rs6313 y rs7322347) se relacionaron con la ansiedad, la desregulación emocional y el comportamiento agresivo en humanos (Meyer et al., 2006, Sen et al., 2010). Los diferentes efectos de 5-HT dependen del tipo de receptores sobre los que actúen (Mohammad-Zadeh et al., 2008); hay 14 subtipos (5-HT1 - 5-HT14) y los 5-HT1, y 2 son los que han sido asociados a las características de comportamiento (Qiu et al., 2017): locomoción, agresión, ansiedad, alimentación, entre otros (Mohammad-zadeh et al., 2008).

En ovinos, las situaciones de estrés social (aislamiento o destete artificial) provocan un incremento en las vocalizaciones (Boissy et al., 2005, Damián et al., 2013, 2021), las cuales están dirigidas a llamar e interactuar con los compañeros del grupo. En un experimento con ovinos, el uso de un antagonista (p-Clorofenilalanina) de la síntesis de 5-HT central hizo que la frecuencia de vocalizaciones durante el aislamiento social disminuyera en comparación con el grupo de ovejas testigos (sin antagonista) (Doyle et al., 2011). El antagonista incrementó un estado de depresión o pesimismo en las ovejas, donde la disminución de la concentración de 5-HT cerebral tuvo consecuencias en el comportamiento. Se observó una menor frecuencia de vocalizaciones y, por ende, una desmotivación social del individuo para reincorporarse con sus congéneres (Doyle et al., 2011). Por lo tanto, la serotonina tendría un rol importante en lo que son los afectos positivos entre los animales.

Las catecolaminas, y en especial la dopamina, se han relacionado con características de comportamiento, miedo, agresión, aprendizaje, motivación y personalidad o temperamento en humanos y animales (Jonsson et al., 2003). La dopamina y la respuesta de estrés también están asociadas; el estrés psicosocial induce liberación de dopamina centralmente (Pruessner et al., 2004). Ovinos en aislamiento presentaron mayores concentraciones plasmáticas de dopamina que aquellos alojados en grupos (Guesdon et al., 2015), lo que sugiere que la concentración de dopamina en sangre puede ser un indicador de estrés social en ovinos. En corderos también se

observaron mayores concentraciones de dopamina luego del estrés del transporte (Kadim et al., 2007).

En la vía dopaminérgica existen polimorfismos del gen de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), de los transportadores de dopamina (DAT) y de los receptores de dopamina (DR) (Qiu et al., 2016). Sin embargo, hay poca información de los polimorfismos de los genes TH y DAT. Se han identificado 5 receptores de dopamina (DRD1-DRD5) de los cuales los receptores DRD2, DRD3 y DRD4 se relacionaron con la personalidad, desórdenes psicológicos y rasgos del comportamiento (Jonsson et al., 2003, Hamidovic et al., 2009). Recientemente, en ovejas merino australiano se reportaron el SNP483 y SNP939 (C/T: posición 483 en exón 3 y T/C: posición 939 en exón 6) del gen para DRD2 en relación con las líneas seleccionadas por su temperamento calmo o nervioso (Qiu et al., 2016). Las frecuencias alélicas del SNP483 no fueron diferentes entre las dos líneas de temperamento, mientras que el alelo T del SNP939 se encontró en mayor frecuencia en ovejas con temperamento calmo que en nerviosas. Las ovejas que tenían el genotipo nervioso (SNP939) (T/C, C/C) vocalizaron con mayor frecuencia, aumentaron su locomoción y presentaron mayores registros en las pruebas de comportamiento que las ovejas calmas (T/T). El SNP939 también estuvo asociado con la cognición, además de la reactividad fisiológica y comportamental (Qiu et al., 2016).

1.4.2. Polimorfismos vinculados al eje HHA

El cortisol es el producto final de la vía HHA y su concentración plasmática en respuesta al estrés está asociada al temperamento en ovinos (Hawken et al., 2013, Hough et al., 2013a). La magnitud de la secreción del cortisol en respuesta al estresor puede variar marcadamente entre individuos del mismo sexo y de la misma especie (Tilbrook y Clarke, 2006). La existencia de polimorfismos que afecten la síntesis de cortisol puede determinar diferencias en el comportamiento y clasificar a los animales de acuerdo a su temperamento (Hawken et al., 2013).

En la biosíntesis del cortisol se han descrito polimorfismos de genes de la CRH. Los polimorfismos, SNP (-201 C/T; -248 C/T) y SNP del gen de su receptor CRH-R1, han sido asociados con estresores ambientales y psicosociales, respuesta de cortisol y alteraciones de comportamiento (Bohus et al., 1987, Rivier y Rivest, 1991). En la síntesis del cortisol participa la enzima mitocondrial citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa (CYP17) (Miller y Auchus, 2011), la cual se expresa en la corteza de la glándula adrenal y es clave en la síntesis de esteroides. Se conoce que en cabras y ovejas merino de Sudáfrica los polimorfismos en el gen CYP17 afectan la actividad de la enzima CYP17 y, por lo tanto, la respuesta del cortisol a un estresor (Storbeck et al., 2007, Storbeck et al., 2008, Hough et al., 2013). El polimorfismo SNP628 de CYP17 (mutación A-G de un sólo nucleótido en la posición 628) se utilizó como marcador para seleccionar diferentes genotipos y probar la respuesta del cortisol a una prueba de ACTH (Qiu et al., 2016). De esta manera, se identificó que ovejas que tenían mayor concentración de cortisol correspondían al genotipo A/A, y aquellas de menor concentración, a ovejas con genotipo G/G, siendo el genotipo CYP17 SNP628 A/A tres veces más frecuente en animales con temperamento nervioso versus calmo (Qiu et al., 2016, 2017). En este mismo estudio, se analizó de forma conjunta el receptor 2 de dopamina (DRD2) y la combinación de genotipos. El alelo C del polimorfismo DRD2 SNP939 y el genotipo CYP17 SNP628 A/A podrían ser utilizados como marcador genético del temperamento nervioso, y una combinación de DRD2 SNP939 T/T y CYP17 SNP628 G/G podría usarse como un marcador genético para el temperamento calmo (Qiu et al., 2016, 2017). Además, al evaluar la combinación de estos genes, se determinó que actúan de forma independiente sobre la reactividad del comportamiento y la respuesta en la concentración plasmática del cortisol, y podrían ofrecer vías para mejorar la producción y el BA (Hough et al., 2013b).

1.5. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN UTILIZANDO LA METODOLOGÍA SSGWAS

El estudio de asociación genómico (*Genome Wide Association Studies*, GWAS) es un método para determinar la asociación estadística entre marcadores genéticos distribuidos en el genoma y características fenotípicas. El uso de la selección genómica en los programas de reproducción puede acelerar la mejora genética y proporcionar una mejor precisión del valor de cría (VC). A lo largo del tiempo, se propusieron varios métodos para la predicción genómica del VC, pero la mayoría de ellos asumen que todos los animales deben estar genotipados. Sin embargo, en la práctica, no todos los animales están genotipados y, por lo tanto, los métodos deben adaptarse a esta situación (Christensen y Lund, 2010).

El estudio de asociación del genoma completo en un solo paso, o, en inglés, *Single Step Genome Wide Association Studies* (ssGWAS), es una metodología que combina información de genotipos, fenotipos y pedigrí en una sola evaluación. Desde el 2009 se propuso una nueva implementación de mejora genética, *Single Step Genomic Best Linear Unbiased Predictor* (ssGBLUP), que utiliza SNP para construir una matriz de parentesco genómico entre animales, la matriz **[G]**. Esta metodología permite integrar de manera conjunta, a través de procedimientos estadísticos, el parentesco genealógico (la matriz **[A]**) con el parentesco genómico. El parentesco genealógico que se refleja en la matriz **[A]** se puede entender como el parentesco esperado entre los individuos, mientras que el parentesco genómico es la estimación de parentesco observado. El resultado de combinar la información genómica (SNP) y genealógica es una nueva matriz de relaciones, la matriz **[H]**, donde la información molecular de animales genotipados se proyecta, a través de los parientes, a individuos que no están genotipados (Aguilar et al., 2010, Misztal et al., 2018). Así, todos los SNP se consideran simultáneamente junto con todos los fenotipos de los animales genotipados y los no genotipados (Aguilar et al., 2010, Wang et al., 2014), y permiten integrar toda la información registrada históricamente en un

programa de mejora. La robustez de esta metodología radica en que se pueden considerar datos sobre animales genotipados y no genotipados, brindando la oportunidad de calcular evaluaciones genómicas precisas (Lourenco et al., 2020).

El software BLUPF90 es una familia de programas para la estimación de componentes de la varianza y para la evaluación genética (Misztal et al., 2020). Una interfaz para el procesamiento de la información genómica con los programas de BLUPF90 es utilizar el programa PREGSF90, que conduce el procesamiento del control de calidad de los genotipos, construye la matriz **[G]** y una matriz **[A₂₂]** para animales genotipados e incluye un control de calidad hasta 150.000 genotipos (Aguilar et al., 2020). El control de calidad se hace para SNP monomórficos, frecuencias alélicas, *call rate* (SNP y muestras de individuos) y conflictos mendelianos (SNP y muestras). Para todos estos parámetros, el control de calidad se hace por defecto; sin embargo, es posible cambiar los criterios utilizando las opciones adecuadas en el archivo de parámetros que modula las corridas en el software (Aguilar et al., 2020). El POSTGSF90 es otro programa que agrega el cálculo de la conversión del VC a los efectos SNP (Wang et al., 2012), cálculo de varianza explicada por SNP, los p-valores de los SNP y creación de *Manhattan plots* (Lourenco et al., 2020, Misztal et al., 2020). Este último es una representación gráfica de un estudio de asociación. El ssGBLUP del paquete de software BLUPF90 se ha utilizado para evaluaciones genómicas en todo el mundo (Lourenco et al., 2020) y tiene en cuenta la estructura de la población.

1.6. HIPÓTESIS

La hipótesis de este estudio es que existen SNP vinculados al rasgo de temperamento en ovinos de la raza merino australiano en Uruguay.

1.7. OBJETIVOS

El objetivo principal fue identificar SNP que explicaran la mayor varianza genética del fenotipo de temperamento en ovinos de la raza merino

australiano. El objetivo secundario fue identificar genes candidatos y realizar un análisis de enriquecimiento funcional para conocer las vías de señalización de genes implicados en el temperamento.

2) MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. FENOTIPOS, GENOTIPOS Y PEDIGRÍ

Se consideraron un total de 4317 registros fenotípicos de temperamento para corderos merino australiano (ambos sexos, cuatro generaciones: años 2010, 2011, 2018 y 2019). Estos registros están incluidos en la base de datos del Sistema uniforme de levantamiento de registros (SULAR) y pertenecen a las evaluaciones genéticas nacionales. Del total fenotípico, 1060 datos corresponden a mediciones realizadas durante el presente estudio (generaciones 2018 y 2019) en cuatro establecimientos de Uruguay, de los cuales dos eran estaciones experimentales y dos eran cabañas comerciales. El resto de datos fueron obtenidos en un estudio de investigación anterior (Zambra et al., 2015). El temperamento de los 4317 animales se midió con el TCA (Blache y Ferguson, 2005a; 2005b; figura 1). No hubo selección previa de animales, es decir, los animales se enfrentaron por primera vez al TCA. El grado de agitación del cajón (movimientos y vocalizaciones) se registró individualmente con el agitómetro previamente calibrado. El objetivo de la calibración fue comparar los resultados de EA entre mediciones en el día, entre días y entre establecimientos (Blache y Ferguson, 2005a). El coeficiente de variación (CV %) dentro de los diferentes establecimientos fue de 9,4 % y 8 % para el EA bajo y alto, respectivamente. El CV entre los diferentes lugares fue del 10 % y 8,9 % para el EA bajo y alto, respectivamente. Todos los corderos nacieron en la primavera y fueron criados al pie de la madre en condiciones extensivas. Luego del destete, en tres de los cuatro establecimientos, los corderos conformaron un lote único; en la otra cabaña se separaron por sexo. El protocolo experimental n.º 020300-000653-18-ID CHEA 701 contó con la aprobación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República.

Se tomaron muestras de sangre de corderos evaluados con el TCA y se realizó una extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica.

Este procedimiento se llevó a cabo en el Banco de ADN Genómico, Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, según protocolo de Medrano et al. (1990) con modificaciones. Se dispuso de información molecular de 1702 individuos usando el panel GGP_50k_ovi (GeneSeek® Genotyping Profile; Illumina, San Diego, California). Estos genotipados corresponden a los animales medidos en el presente estudio y otros animales incluidos en el SULAR. El panel contiene información de 43705 SNP distribuidos a lo largo del genoma ovino. La genealogía incluyó 10799 entradas con la información del individuo, padre y madre, abuelo y abuela, bisabuelo y bisabuela (profundidad de pedigrí de nivel tres).

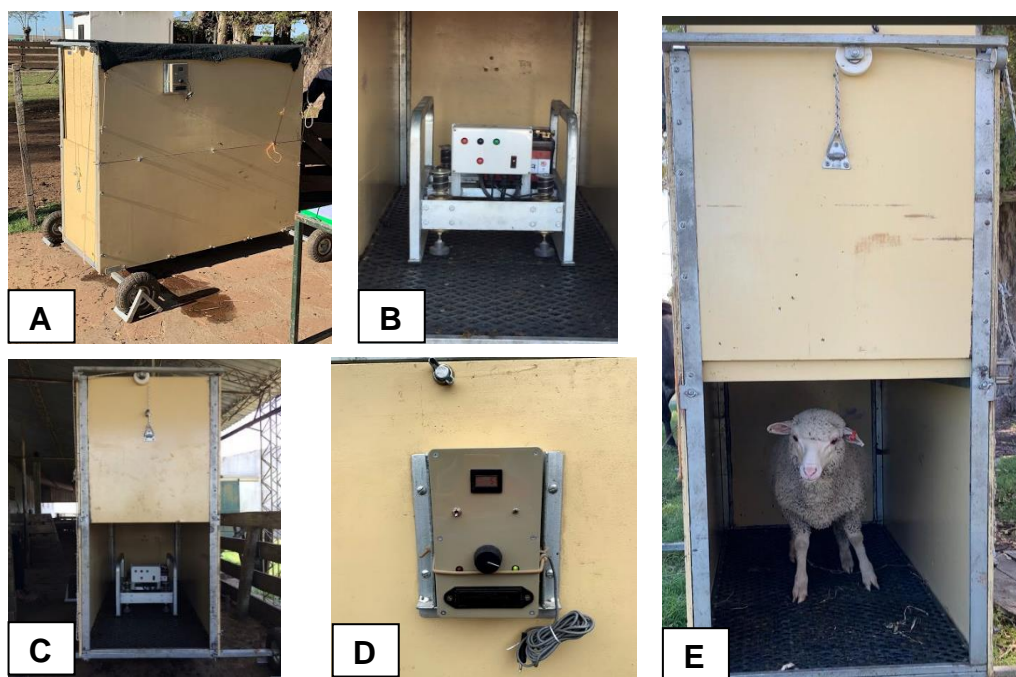


Figura 1: herramienta para estimación fenotípica del temperamento: (A) vista lateral del test del cajón de aislamiento (TCA); (B) unidad electrónica de calibración; (C) calibración del agitómetro para alto (nervioso) y bajo (calmo) puntaje de agitación; (D) agitómetro, sensor de vibraciones (vocalizaciones, movimientos) y (E) cordero listo para salir del interior de TCA

2.2. ESTADÍSTICA

2.2.1. Modelo univariado para temperamento

En programas de mejoramiento animal, los modelos para realizar un GWAS consideran la presencia de efectos fijos ambientales y genéticos, además de efectos aleatorios. El siguiente modelo para la estimación de parámetros genéticos fue el propuesto por Zambra et al. (2015). Los efectos fijos considerados fueron: grupo contemporáneo (año-establecimiento-lote de manejo-sexo), edad de la madre y tipo de nacimiento. Como covariable se consideró la edad del cordero al momento de la medición con el TCA. A través de métodos computacionales se pudo incorporar la información genómica a este modelo para obtener los VC genómicos para temperamento y los efectos de los SNP.

$$y_{ijklm} = GC_i + tn_j + em_k + \beta la_{ijklm} + a_m + e_{ijklm}$$

donde y es el dato de temperamento del cordero m ; GC es el grupo contemporáneo (73 niveles) (i : año-establecimiento-lote de manejo-sexo); tn es el tipo de nacimiento del cordero (j : único (1), mellizo (2)); em es la edad de la madre del cordero subdividida en 3 clases (k : 1 = < 2 años; k : 2 = 2-3 años y k : 3 = > 3 años); β es el coeficiente de regresión de la edad del cordero sobre el temperamento; la es la covariable de edad del cordero al momento de la medición; a es el efecto aditivo del animal con distribución $a_m \sim N(0, \sigma_a^2 A)$ donde σ_a^2 es la varianza aditiva del temperamento, A es una matriz de relación aditiva, y e es el efecto aleatorio del error con distribución normal independiente entre las observaciones con varianza $\sigma^2 e$.

Por otro lado, se graficaron los residuales del modelo utilizando el paquete estadístico SAS (SAS® 9.4V; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) y se realizó la prueba de ajuste de los residuales para distribución Normal, Lognormal, Weibull y Gama con los test Kolmogorov-Smirnov, Cramér-von Mises y Anderson-Darling.

2.2.2. Estimación de componentes de la varianza

Los componentes de la varianza para realizar el ssGWAS se estimaron con el software airemlf90 versión 1.148 de BLUPF90.

La heredabilidad (h^2) del temperamento se estimó como:

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{(\sigma_a^2 + \sigma_e^2)}$$

donde σ_a^2 es la varianza genética aditiva y σ_e^2 es la varianza residual.

2.3. SINGLE STEP GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY (SSGWAS)

A través del software BLUPF90 (versión 1.71), la matriz genómica utilizada fue (VanRaden, 2008):

La matriz **[G]**:

$$G = \frac{ZDZ'}{\sum_{i=1}^M 2p_i(1-p_i)}$$

donde Z es una matriz de incidencia ajustada por frecuencias alélicas; D es la matriz diagonal de peso para la varianza de los SNP; Z' es la transpuesta de la matriz Z ; M es el número de SNP; y p_i representa la frecuencia del alelo menor para cada SNP.

Dado que la integración de la información de pedigrí y genotípica en la matriz $[H]$ es compleja, se simplificó a su inversa $[H^{-1}]$ (Aguilar et al., 2010, Christensen y Lund, 2010):

$$H^{-1} = A^{-1} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G^{-1} - A_{22}^{-1} \end{bmatrix}$$

donde $[A^{-1}]$ es la matriz inversa de pedigrí, $[G^{-1}]$ es la inversa de la matriz de relación genómica (para animales genotipados, la proporción de alelos compartidos entre animales) y $[A_{22}^{-1}]$ es la inversa de la matriz de parentesco para animales genotipados.

El porcentaje de la varianza genética explicada por una región de 0,5 *million base pairs* (mbp) se calculó de la siguiente manera (Wang et al., 2014):

$$\frac{Var(a_i)}{\sigma_a^2} \times 100 \% = \frac{Var(\sum_{j=1}^{20} Z_j \hat{u}_j)}{\sigma_a^2} \times 100 \%$$

donde a_i es el valor genético de la i -ésima región que consta de 20 SNP contiguos; σ_a^2 es la varianza genética total; Z_j es el vector del contenido génico del j -ésimo SNP para todos los individuos, y \hat{u}_j es el efecto marcador del j -ésimo SNP dentro de la i -ésima región.

Los efectos SNP se estimaron como (Stranden y Garrik, 2009):

$$\hat{a} = \frac{1}{2 \sum p_i q_i} Z' G^{-1} \hat{u}_2$$

donde Z' es la transpuesta de la matriz Z ; G es la matriz genómica; \hat{u}_2 es el VC genómico para animales genotipados y $p_i q_i$ son las frecuencias alélicas.

2.4. CONTROLES DE CALIDAD: FILTRADO DE MUESTRAS Y SNP

Una práctica estándar de un GWAS son los controles de calidad que son necesarios para excluir muestras o individuos a los que les faltan datos de información molecular en más de un porcentaje predefinido de los SNP tipificados. Para el control de calidad de la información genómica, se utilizó el software PREGSF90. Los criterios para remover muestras de baja calidad fueron: SNP con *call rate* < 85 %; SNP con *Minor Allele Frequency* (MAF) < 0,05 %; SNP monomórficos (son aquellos invariables en todos los animales estudiados) y animales con *call rate* < 90 % (es decir, se eliminan los individuos a los que les falten datos de genotipo para más del 10 % de los SNP tipificados). El *call rate* para los SNP se define como la proporción de los individuos para los que no falta la información del SNP correspondiente,

por lo que un filtro de 85 % significa que se retienen los SNP para los que falta menos del 15 % de los datos. Se removieron individuos con conflictos mendelianos (individuos sin alelos compartidos entre su padre y su progenie para un SNP dado). Los cromosomas sexuales no se incluyeron en el análisis. Luego de estos controles de calidad, se retuvo un total de 1697 animales genotipados y 38268 SNP efectivos distribuidos a lo largo de los 26 cromosomas, para análisis genómicos posteriores.

2.5. SELECCIÓN DE SNP Y REGIONES GENÓMICAS

Para identificar marcadores asociados al temperamento con evidencia estadística sólida, se trabajó con el p-valor de los SNP y la varianza genética explicada por ventanas o segmentos adyacentes de 0,5 mbp. Estos argumentos estadísticos fueron obtenidos con el programa POSTGSF90 de BLUP (Aguilar et al., 2020). El p-valor representa la probabilidad de obtener un valor de mayor magnitud como resultado del azar bajo una prueba de hipótesis nula de no asociación entre el SNP y el temperamento. Una vez realizado el análisis, se dispuso de numerosos p-valores, tanto como SNP, que se representaron de forma logarítmica a lo largo del genoma en un *Manhattan plot*. La asociación estuvo representada por el $-\log_{10}(p)$ para cada marcador y el umbral de significancia para el conjunto de datos, cuando el p-valor fuese inferior al umbral. Este último se estableció mediante la técnica estadística del ajuste de Bonferroni (1936):

$$[-\log_{10}(\alpha / n)]$$

donde α es el nivel de significancia ($p < 0,05$) y n es el número de SNP después del control de calidad (Mancin, 2020). De esta manera, el umbral de significancia del genoma fue $-\log_{10}(0,05/38268) = 5,88$. Sin embargo, con el objetivo de poder abarcar más información y contemplando la falta de conocimiento sobre mecanismos biológicos asociados al rasgo de temperamento, se propuso un corte horizontal más flexible del $-\log$ en el

valor de 5,0. Para definir la significancia de un SNP según el porcentaje de la varianza genética que explica, se tuvo como referencia el umbral estadístico utilizado por Brunet et al. (2020) y Sigdel et al. (2021), varianza genética mayor o igual a 0,5 %. Tanto del p-valor como del porcentaje de la varianza, se obtuvo un listado de marcadores de interés para ser explorados en el genoma, ver su posición y su relacionamiento con posibles genes candidatos que podrían estar involucrados con el rasgo de temperamento. Para los gráficos de *Manhattan plot* del p-valor y del porcentaje de la varianza genética, se utilizó el *R.Script* salida de POSTGSF90 (Aguilar et al., 2020).

2.6. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO

El análisis de enriquecimiento genético es una herramienta para relevar los términos biológicos y moleculares asociados a un fenotipo de interés. Para dicho análisis se seleccionó el 5 % de SNP con mayor efecto (Sigdel et al., 2021, Jara et al., 2022). Luego, para asignar los SNP a los genes, se utilizaron procedimientos informáticos con un script *ad hoc* en el programador R (versión 4.1.0) (R Core Team, 2021), el paquete de BiomaRt (versión 2.48.3) (Durinck et al., 2005, Durinck et al., 2009) y el conjunto de datos del genoma de referencia ovino *Ovis_aries_v3.1* (<https://www.ensembl.org>; Cunningham et al., 2022). Un SNP fue asignado a un gen cuando se ubicó dentro de un gen o dentro de una distancia genómica de 5 kb *up-stream* y *down-stream* (Brunet et al., 2020, Sigdel et al., 2021). Por lo tanto, un gen se asoció al temperamento si contenía al menos un SNP cuyo efecto estuviera en el 5 % superior de la distribución. Posteriormente, para asignar los genes a categorías funcionales, se utilizó DAVID (del inglés *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*, versión disponible 6.8), una base de datos que proporciona un conjunto integral de herramientas de anotación funcional para comprender el significado biológico detrás de una lista de genes de interés. Se utilizaron las bases de datos Ontología Génica (GO, del inglés *Gene Ontology*) y *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) para definir los conjuntos de genes funcionales. Las categorías de anotación de ontología génica (GO)

consideradas en este estudio fueron procesos biológicos (BP, del inglés *Biological Process*), función molecular (MF, del inglés *Molecular Function*) y componentes celular (CC, del inglés *Celular Component*). El objetivo de este análisis fue conocer las implicancias funcionales de los genes. La significancia estadística de los términos enriquecidos se cuantificó con el umbral de p-valor enriquecido $\leq 0,05$, tal como lo brinda la plataforma DAVID. El p-valor enriquecido considera la proporción de genes bajo estudio en relación con el total de genes que tiene la vía. La base de datos Ensembl es otra plataforma que se utilizó con el objetivo de hacer un mapeo, es decir, a partir de una variante significativa, ver en qué posición está, qué contexto genómico tiene asociado y relevar genes candidatos.

3) RESULTADOS

3.1. DATOS FENOTÍPICOS DE TEMPERAMENTO

La frecuencia de los puntajes de agitación se concentró hacia la derecha (distribución sesgada) (figura 2). La media de agitación para el total de la población evaluada fue de 42, con una mediana de 37. El mínimo puntaje fue uno y el máximo 190. Los puntajes por encima de la media tendieron a dispersarse. En el gráfico de la distribución de los residuales del modelo se observa una distribución aproximada a una campana de Gauss (figura 3). La edad promedio de los corderos evaluados fue de 160 ± 38 días al momento de realizar la prueba con el TCA.

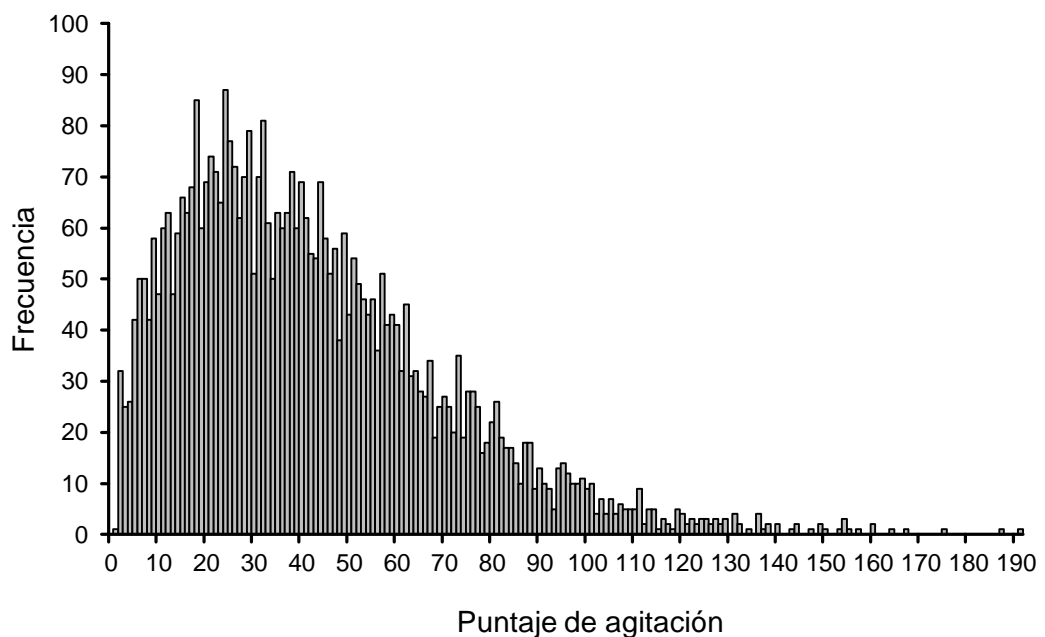


Figura 2: frecuencia de los puntajes de agitación obtenidos con el TCA para los 4317 corderos merino australiano en respuesta al aislamiento social

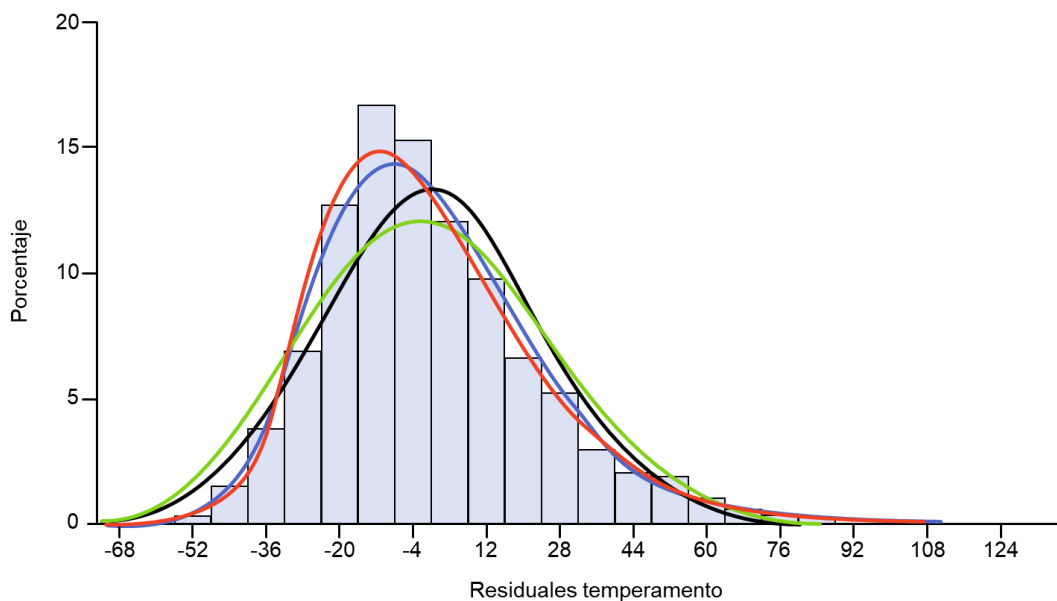


Figura 3: análisis de los residuales del modelo de temperamento para distribución Normal (color negro), logaritmo de la distribución Normal (color rojo), distribución Weibull (color verde) y distribución Gama (color azul)

3.2. ESTIMACIÓN DE COMPONENTES DE LA VARIANZA

La varianza genética aditiva fue 111,79 ($\pm 22,88$) y la varianza residual fue 472,60 ($\pm 20,80$). La estimación de la h^2 fue de 0,19 ($\pm 0,038$), lo cual, acorde al criterio establecido por Cardellino y Rovira (1989), se considera una heredabilidad moderada.

3.3. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GENÓMICO

Los marcadores con mayor asociación estadística según el $-\log_{10}(p)$ para cada SNP se encontraron en los cromosomas 2, 3, 6, 8 y 18 (figura 3), cuya identificación y ubicación en el genoma ovino se presentan en la tabla 1. Los SNP Chr3:491375 y Chr6:5216258 se buscaron en las bases de datos SNP para ver si había información de estos en otros mapas, y efectivamente no lo han usado en otros paneles, lo que indica que sería un marcador de prueba y, por ende, carece de información. Ninguna de las variantes con relevancia estadística estuvieron asociadas a un gen en particular, sino a un gen cercano a la posición del SNP (SNP OAR2_184566519.1, gen

ENSOARG00000010922; SNP s19585.1, gen ENSOARG00000000620; SNP s04767.1, gen ENSOARG00000000920; SNP OAR8_76247205.1, gen ENSOARG00000002177). Los genes cercanos a los marcadores **rs415857290** (chr3) y **rs412291714** (chr8) (Tabla 1) se reportan con funciones de interés asociados a las proteínas **W5NS18** y **W5NVV2**, respectivamente. El gen ENSOARG00000000920 (W5NS18) está asociado a la actividad catalítica en el metabolismo de los lípidos, y el gen ENSOARG00000002177 (W5NVV2), al sistema inmune, la organización mitocondrial, la diferenciación mitocondrial y la actividad de la GTPasa.

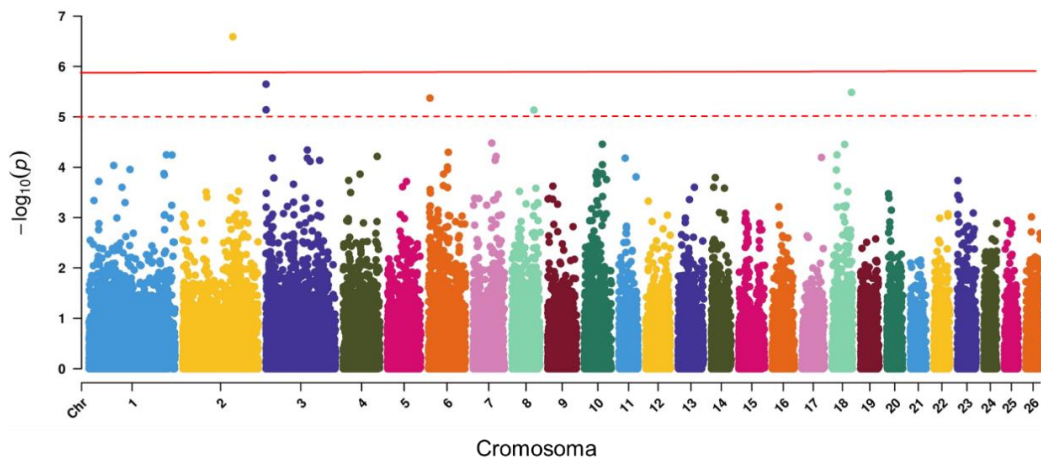


Figura 4: *Manhattan plot* de 38268 SNP efectivos para 1697 animales genotipados pertenecientes a las evaluaciones genéticas nacionales, incluidos en la base de datos del Sistema uniforme de levantamiento de registros (SULAR). Número de cromosoma y umbral de significancia estadística del $-\log_{10}(p)$ según ajuste de Bonferroni (línea horizontal continua) y ajuste estratégico (línea horizontal discontinua) para los SNP asociados al rasgo de temperamento

Tabla 1: principales SNP detectados en el ssGWAS para 1697 animales genotipados merino australiano, código de referencia de los SNP, tipo de variante, significancia estadística del p-valor transformado a $-\log_{10}$, número de cromosoma y posición en el genoma de referencia en pares de bases

Nombre del SNP	Código rs	Tipo de variante	$-\log_{10}(p)$	CHR	Pos (pb)
OAR2_184566519.1	rs427386870	Intergenic	6,59	2	174139621
Chr3:491375	-	-	5,64	3	-
s19585.1	rs429171258	Intergenic	5,48	18	63268669
Chr6:5216258	-	-	5,37	6	-
s04767.1	rs415857290	Intron	5,13	3	500114
OAR8_76247205.1	rs412291714	Intergenic	5,13	8	71065708

SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*; rs = reference snp; $-\log_{10}(p)$ = expresión logarítmica del p_valor ($P \leq 0,05$); CHR = cromosoma; Pos (pb) = posición del SNP en el genoma de referencia (versión oar_v3.1) en pares de bases. Los animales genotipados pertenecen a las evaluaciones genéticas nacionales y están incluidos en la base de datos del Sistema uniforme de levantamiento de registros (SULAR).

Por otro lado, la estrategia de analizar la varianza genética explicada por segmentos o ventanas de 0,5 mbp de SNP adyacentes identificó regiones genómicas de interés asociadas al cromosoma 6, 10 y 21 (% var $\geq 0,5$) (figura 5). Se destaca la región del cromosoma 21 que determinó la máxima varianza para los SNP (1,4991 %).

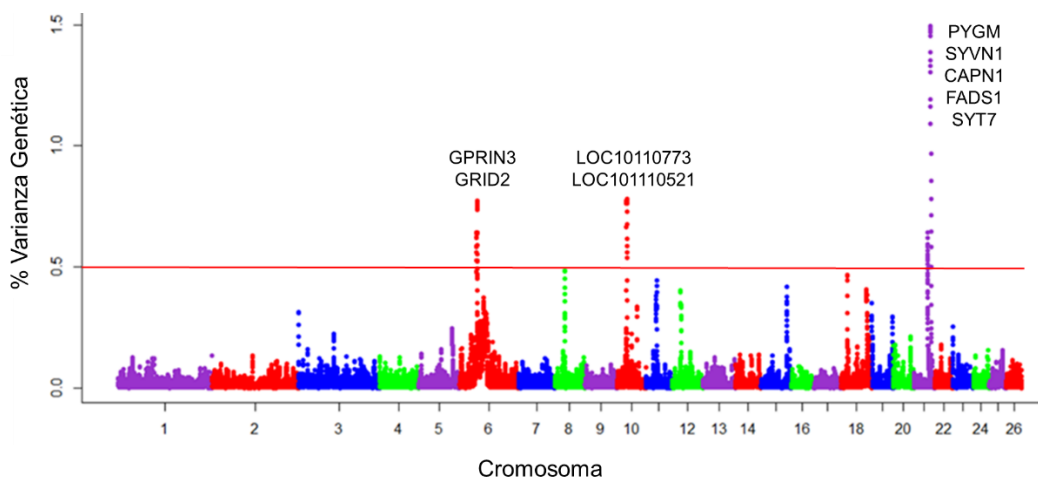


Figura 5: *Manhattan plot* de 38268 SNP efectivos para 1697 animales genotipados merino australiano, pertenecientes a las evaluaciones genéticas nacionales, incluidos en la base de datos del Sistema uniforme de levantamiento de registros (SULAR). Número de cromosoma y porcentaje de varianza genética aditiva explicada por segmentos adyacentes de 0,5 mbp. Umbral de significancia estadística (línea horizontal, % var \geq 0,5 %) y nueve genes candidatos con sus respectivos nombres en los cromosomas 6, 10 y 21

La información de los SNP más relevantes encontrados en esas regiones demuestra que existen nueve genes candidatos para el rasgo de temperamento (tabla 2). Estos son: **PYGM** (21:42,295,599-42,307,126), **SYVN1** (21:42,650,559-42,655,527), **CAPN1** (21:42,712,976-42,740,799), **LOC10110773** (10:29,275,771-29,457,586), **LOC10110521** (10:28,986,741-29,188,660), **GRID2** (6:30,768,380-31,534,647), **FADS1** (21:39,652,537-39,665,108), **SYT7** (21: 39,390,965-39,426,334) y el gen **GPRIN3** (6:35,511,293-35,513,635). En el cromosoma 6 y 10 se identifican 2 genes candidatos posicionales en cada uno, en el cromosoma 21 se identifican 5 genes candidatos posicionales (tabla 3). El 51,3 % de marcadores corresponden al tipo de variante intrónica y, a su vez, más de uno se identifica con el mismo gen candidato cuando se encuentran en igual cromosoma (tabla 2).

Tabla 2: marcadores con mayor varianza genética aditiva detectados en el ssGWAS para 1697 animales merino australiano genotipados, código de referencia de los SNP, posición en el genoma, número de cromosoma, tipo de variante y genes candidatos posicionales detectados con los marcadores

Código rs	pos (pb)	CHR	% Var	Tipo de variante	Gen candidato
rs402505013	42,295,749	21	1,4691	Splice acceptor var	<i>PYGM</i>
rs419347404	42,601,748	21	1,4519	Intron variant	-
rs161627521	42,654,067	21	1,3288	Intron variant	<i>SYVN1</i>
rs413708295	42,714,381	21	1,1617	Intron variant	<i>CAPN1</i>
rs421553713	42,714,613	21	1,0906	Intron variant	<i>CAPN1</i>
rs161627624	42,715,850	21	0,8537	Synonymous variant	<i>CAPN1</i>
rs408317317	29,353,089	10	0,7803	Intron variant	<i>LOC101110773</i>
rs428995675	29,072,930	10	0,7738	Intron variant	<i>LOC101110521</i>
rs407693533	35,491,698	6	0,7722	Intron variant	-
rs422603241	31,453,177	6	0,7688	Intron variant	<i>GRID2</i>
rs422288687	29,304,176	10	0,7678	Intron variant	<i>LOC101110773</i>
rs427220269	29,054,709	10	0,7670	Intron variant	<i>LOC101110521</i>
rs421383362	29,188,403	10	0,7636	Intron variant	<i>LOC101110521</i>
rs409829992	29,162,222	10	0,7624	Intron variant	<i>LOC101110521</i>
rs399382510	29,202,499	10	0,7619	Intergenic variant	-
rs411759303	35,511,497	6	0,7430	Missense variant	<i>GPRIN3</i>
rs400430030	29,421,760	10	0,6745	Intron variant	<i>LOC101110773</i>
rs419116702	29,030,595	10	0,6646	Intron variant	<i>LOC101110521</i>
rs398879843	35,191,867	6	0,6423	Intergenic variant	-
rs161618576	39,638,962	21	0,6420	Downstream gene variant	-
rs424142667	35,511,899	6	0,6415	Missense variant	<i>GPRIN3</i>
rs410592527	35,184,703	6	0,6228	Intergenic variant	-
rs408222545	39,642,723	21	0,6204	Upstream gene variant	-
rs419203432	29,415,140	10	0,6173	Intron variant	<i>LOC101110773</i>
rs161618641	39,646,260	21	0,5915	Upstream gene variant	-
rs416558978	35,254,368	6	0,5873	Intergenic variant	-
rs417392501	39,651,749	21	0,5832	Downstream gene variant	-
rs404318469	42,719,476	21	0,5826	Intron variant	<i>CAPN1</i>
rs403363266	39,653,383	21	0,5657	3 prime UTR variant	<i>FADS1</i>
rs419203432	29,415,140	10	0,5595	Intron variant	<i>LOC101110773</i>
rs403382566	35,512,106	6	0,5508	Missense variant	<i>GPRIN3</i>
rs421709693	39,432,569	21	0,5434	Intergenic variant	<i>SYT7</i>
rs427110197	39,654,860	21	0,5384	Intron variant	<i>FADS1</i>
rs398157763	29,455,959	10	0,5363	3 prime UTR variant	<i>LOC101110773</i>
rs399480023	31,217,615	6	0,5249	Intron variant	<i>GRID2</i>
rs399060511	35,275,766	6	0,5247	Intergenic variant	-
rs406335698	35,276,244	6	0,5219	Intergenic variant	-

rs = *reference snp*; pb = pares de bases, posición del SNP en el genoma de referencia (versión oar_v3.1); CHR = cromosoma; % Var = expresión porcentual de la varianza genética; (-) = no se detectó gen candidato para la posición del SNP. Los animales genotipados pertenecen a las evaluaciones genéticas nacionales y están incluidos en la base de datos del Sistema uniforme de levantamiento de registros (SULAR).

Tabla 3: genes candidatos localizados en las regiones del genoma definidas por ventanas de 0,5 mbp y que explican una varianza genética $\geq 0,5$ %. Número de cromosoma y su posición en pares de bases en el genoma ovino de referencia versión oar_v3.1

Cromosoma	Inicio	Fin	Genes candidatos
6	35,138,403	35,512,106	<i>GRID2, GPRIN3</i>
10	29,030,595	29,455,959	<i>LOC101110773, LOC101110521</i>
21	39,432,569	42,419,476	<i>PYGM, SYVN1, CAPN1, FADS1, SYT7</i>

3.4. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO

El conjunto de SNP de mayor efecto definió un set de 900 genes únicos en el genoma de referencia ovino. El p-valor enriquecido de cada término biológico indicó la importancia del término con respecto al set de genes analizados (tabla 4, figura 6). Se identificaron varias rutas metabólicas significativas (*KEGG pathways*) (p-valor $\leq 0,05$) que fueron agrupadas en cuatro categorías: señalización, metabolismo, esteroidogénesis y otros (tabla 4). En el análisis de enriquecimiento funcional en la categoría de anotación de procesos biológicos, se seleccionaron algunos términos para explorar, basados en la asociación del temperamento con la calidad de carne (PB: regulación positiva de la señalización mediada por calcio); diferencia en reactividad entre los temperamentos extremos (PB: locomoción y comportamiento) y la asociación diferencial en la partición de energía (PB: metabolismo de lípidos y carbohidratos).

Tabla 4: principales rutas metabólicas detectadas en el análisis de enriquecimiento funcional con la plataforma DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) a partir de la lista de genes candidatos posicionales con el 5 % de SNP de mayor efecto y su clasificación en 4 clases asociadas al p-valor de enriquecimiento

Rutas metabólicas	P-valor enriquecido
Señalización	
Sistema de señalización de fosfatidilinositol	0,0042
Unión Adherente	0,0094
Vía de señalización de la fosfatasa D	0,0240
Vías en el cáncer	0,0310
Guía de axón	0,0370
Vía de señalización del calcio	0,0480
Metabolismo	
Biosíntesis de glicosaminoglicanos-sulfato de heparina/heparina	0,0070
ECM-interacción con el receptor	0,0270
Vías metabólicas	0,0340
Esteroidogénesis	
Esteroidogénesis en el ovario	0,0170
Otros	
Miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho	0,0370



Figura 6: categorías de anotación de ontología génica representada por funciones moleculares (color celeste), componentes celulares (color violeta) y procesos biológicos (color verde), para el set de genes candidatos posicionales con el 5 % de SNP de mayor efecto en función del $-\log$ del p-valor enriquecido

4) DISCUSIÓN

El presente estudio contribuyó a dilucidar la base genética del temperamento en ovinos, especialmente en la búsqueda de polimorfismos que se asocien a este rasgo fenotípico. El ssGWAS confirmó la hipótesis de que existen polimorfismos de SNP que están asociados estadísticamente al rasgo de temperamento y, a su vez, que la variabilidad genética aditiva no se distribuye homogéneamente a lo largo del genoma, sino que existen regiones asociadas a una mayor variabilidad. Se consideran estos resultados valiosos y relevantes debido a lo siguiente: 1) se trabajó con una población de animales que no estaban previamente seleccionados por temperamento, 2) se utilizó un panel molecular completo e informativo que brinda datos reportados por grupos de investigadores australianos, europeos y estadounidenses (GGP_50k_ovi), y 3) el tamaño de la muestra de animales genotipados y en genealogía estuvo acorde a metodología utilizada. Por lo tanto, la fuente de información para realizar el estudio de asociación fue confiable y robusta y contempló la estructura de la población al incluir las matrices de genotipado y la de genealogía. Como parte de los resultados de este estudio, se detectaron 9 genes candidatos posicionales, conjuntos de genes funcionales, procesos biológicos y vías de señalización de genes que subyacen al temperamento en la raza merino australiano, varios de los cuales no han sido reportados previamente. Por lo tanto, esta tesis aporta al conocimiento del polimorfismo de SNP asociados al temperamento en ovinos y abre nuevas ventanas de exploración para futuros trabajos.

4.1. TEMPERAMENTO Y HEREDABILIDAD

La distribución de los puntajes de agitación medidos con el TCA se concentró por debajo del promedio de los datos, y la frecuencia de animales con mayor puntaje fue la menos abundante. La media estuvo por debajo de los valores reportados para otras razas en Australia, medidos también con el TCA (55 para poll dorset; 63 para border leicester; 65 para merino, 62 para

poll merino y 88 para white Suffolk (Blache y Ferguson, 2005a). Estos valores sugieren que los animales merino australiano en Uruguay serían más calmos que los merinos de Australia y, a su vez, los menos reactivos al compararlos con las otras razas.

La heredabilidad estimada del temperamento según el criterio de clasificación de Cardellino y Rovira (1989) es moderada, y demuestra que sería factible incluir este rasgo en un esquema de selección. El valor estimado (0,19) es consistente con la h^2 para ovejas adultas (0,20, Plush et al., 2011) y se asemeja a la h^2 para corderos de la raza corriedale (0,18, Zambra et al., 2015). En un estudio anterior donde se consideró una subpoblación de los datos utilizados, la h^2 para corderos merino australiano fue de $0,31 \pm 0,06$ (dos generaciones, $n = 2952$ animales, Zambra et al., 2015). La diferencia con el valor estimado puede deberse a un aumento de la población y a la inclusión de la información genómica de los animales, lo que se traduce en una mayor precisión. Por otro lado, en un reporte australiano donde incluyeron más razas de ovinos, la h^2 fue mayor: merino australiano 0,38; poll dorset 0,41; white suffolk 0,29; poll merino 0,41 (Blache y Ferguson, 2005a). La h^2 del temperamento para otras especies productivas no se aleja mucho al valor estimado (bovinos: 0,22 – 0,26, Le Neindre et al., 1995, Burrow et al., 1988; equinos: 0,23, Oki et al., 2007). A pesar de que el temperamento no está económicamente valorado, varios estudios confirman su incidencia en caracteres productivos (Voisinet et al., 1997, Wulf et al., 2002, Sart et al., 2004, Bickell et al., 2010, Van Lier et al., 2017), sin embargo, existe la necesidad de validar la selección de animales según su temperamento y la correlación con otros rasgos productivos.

4.2. CROMOSOMA 21 Y GENES CANDIDATOS

En el cromosoma 21, entre los pares de bases 39,432,569 y 42,419,476, se detectó una región del genoma que determinó la mayor varianza genética (1,4691 %) para el rasgo temperamento. Se consideraron 5 genes que se describen a continuación. El gen **PYMG** (intervalo 42,295,599-42,307,126 pb) codifica para la enzima glucógeno fosforilasa muscular, una enzima alostérica con actividad catalizadora del glucógeno que juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa celular y del organismo (Tan et al., 1997). La deficiencia de dicha enzima fue reportada en humanos y en ovinos como causante de síntomas de intolerancia al ejercicio, ya que habría menos glucosa disponible para la contracción muscular (Tan et al., 1997). La consecuencia de tener menor disponibilidad de energía para el organismo afecta negativamente la respuesta de estrés, donde el principal objetivo de los cambios fisiológicos es aumentar la disponibilidad de energía para «luchar o huir» como respuesta al estresor (Sapolsky et al., 2000, Damián et al., 2015). De esta manera, animales con diferencias en esta enzima podrían responder de diferente manera al estrés, incluso no poder superar el desafío. Esto también podría repercutir en la terneza de la carne posfaena, ya que deficiencias de glucógeno muscular impiden su correcta acidificación por producir menor cantidad de ácido láctico (Soria y Corva, 2004). Por lo tanto, por vía de este gen, el temperamento podría afectar la terneza de la carne (Del Campo et al., 2011), una de las características organolépticas más valoradas comercialmente por la industria y por el consumidor (Torino, 2013).

En este mismo sentido, tres variantes, **rs413708295** (21:42,714,381 bp), **rs421553713** (21:42,714,613 bp) y **rs161627624** (21:42,715,850 bp), se asociaron al gen **CAPN1** (intervalo 42,712,976-42,740,799 bp), gen de las proteínas proteolíticas que codifica para la subunidad mayor de m-calpaína I (Speck et al., 1993, Page et al., 2002). Varios resultados de la investigación describen y asocian la importancia de este gen con la calidad del producto (Casas et al., 2000, Page et al., 2002), ya que el proceso de proteólisis *post*

mortem sería el mayor responsable de la variación de la ternera (Koohmaraie et al., 1995). Dos SNP localizados en los exones 9 y 14 en un toro piemontés-angus originó una sustitución de aminoácidos en la proteína de *CAPN1*. El cambio de citocina por guanina en el exón 9 provocó la sustitución de alanina por glicina en la posición 316 de la secuencia proteica ($A^{316} \text{® } G^{316}$), mientras que el cambio de guanina por alanina determinó la sustitución de valina por isoleucina en la posición 530 ($V^{530} \text{® } I^{530}$) (Page et al., 2002). El análisis de los genotipos reveló que los alelos (G^{136} / I^{530}) produjeron carne menos tierna en comparación con los genotipos con alelos (A^{136} / V^{530}) (Page et al., 2002). El gen *CAPN1* podría influenciar en el temperamento y provocar diferencias en la calidad de la carne.

La variante **rs161627521** (21:42,654,067 bp) identificó al gen **SYVN1** (intervalo 42,650,559-42,655,527 bp), un gen que codifica para la proteína W5PTU3 (*RING-type E3 ubiquitin transferase*) con actividad catalítica, vinculada a las vías de ubiquitinación y modificación proteica, que es parte de la modificación de proteínas (The UniProt Consortium, 2021). Otro gen registrado por dos marcadores **rs403363266** (21:39,653,383 bp) y **rs427110197** (21:39,654,860 bp) fue el gen **FADS1** (intervalo 39,652,537-39,665,108 bp), asociado a la proteína W5PWA9 en ovinos. Esta proteína forma parte del metabolismo de los lípidos, de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (The UniProt Consortium, 2021), específicamente es un punto de control en la velocidad de desaturación y elongación para generar PUFA de cadena larga (Athinarayanan et al., 2020). El último gen candidato del cromosoma 21 es el **SYT7** (intervalo 39,390,965-39,426,334 bp) y se asoció a la variante **rs421709693** (21:39,432,569 bp). Las funciones moleculares y procesos biológicos vinculados a este gen están asociadas al calcio (por ejemplo, regulación, activación dependiente para la fusión de vesículas sinápticas, exocitosis de neurotransmisores, reparación de la membrana plasmática, regulación de la secreción de dopamina, secreción de glucagón, secreción de insulina, entre otros) (The UniProt Consortium, 2021). Las principales enzimas de la proteólisis

dependen del calcio (Koochmaraie, 1992, Muir et al., 1998) y, por lo tanto, todo lo que esté relacionado a las concentraciones plasmáticas del calcio podría estar implicado en la calidad de la carne. Además, en la literatura hay genes que fueron asociados con rasgos de comportamiento y que también se encuentran dentro o cerca de la región genómica de interés del cromosoma 21. Es el caso del gen *CHRM1* (21:37,9-48,4 Mb), receptor colinérgico muscarínico, que estaría vinculado con la locomoción, la cognición y el sistema nervioso (Tanda et al., 2007). Por lo tanto, los SNP del cromosoma 21 encontrados en el presente estudio podrían ser usados como marcadores moleculares para futuros estudios enfocados en genes candidatos asociados al temperamento o a rasgos de comportamiento que afecten la reactividad y que estén asociados a la calidad de la carne.

4.3. CROMOSOMA 10 Y GENES CANDIDATOS

La región de interés en el cromosoma 10 está comprendida entre los pares de bases 29,030,595 y 29,455,959. Las variantes **rs408317317** (10:29,353,089 bp), **rs422288687** (10:29,304,176 bp), **rs400430030** (10:29,421,760 bp), **rs419203432** (10:29,415,140 bp) y **rs398157763** (10:29,455,959 bp) identificaron el gen **LOC101110773** (*EEF1A1*) (intervalo 29,275,771-29,457,586 bp), vinculado a funciones moleculares de actividad energética. Específicamente, la proteína codificada W5PD15 (factor de elongación alfa 1) promueve la unión dependiente de GTP de aminoacil-tARN al sitio A de los ribosomas durante la biosíntesis de proteínas (The UniProt Consortium, 2021). También se detectó el gen **LOC101110521** (intervalo 28,986,741-29,188,660 bp) y los cinco marcadores asociados fueron **rs427220269** (10:29,054,709 bp), **rs421383362** (10:29,188,403 bp), **rs409829992** (10:29,162,222 bp), **rs428995675** (10:29,072,930 bp) y **rs419116702** (10:29,030,595 bp). Este gen en la plataforma Ensembl está descrito como gen **FRY**. Un estudio fenotípico en ovejas de raza merino y derivadas de merino menciona este gen vinculado a los rasgos fenotípicos de la calidad de lana, el peso de vellón y el largo de mecha (Megdiche et al.,

2019). En este mismo estudio también está descrito el gen *EEF1A1* (*LOC101110773*) como parte de un set de genes de interés biológico que contribuye a dilucidar la base genética del fenotipo merino (Megdiche et al., 2019). La mitad de los SNP del cromosoma 10 que aportan a la varianza genética del temperamento se asoció a funciones moleculares de actividad energética. Esto concuerda con aspectos de reactividad como respuesta fisiológica al estrés, donde el animal reconoce la amenaza a la homeostasis y se activan respuestas biológicas para restablecer la función normal de homeostasis y el bienestar (Moberg, 2000).

4.4. CROMOSOMA 6 Y GENES CANDIDATOS

En la región del cromosoma 6, que comprende más del 0,5 % de la varianza genética (intervalo 35,138,403 - 35,512,106 bp), se identificó el gen candidato ***GPRIN*** de la subfamilia número 3 (*GPRIN3*) (intervalo 35,511,293-35,513,635 bp) asociado a las variantes **rs111759303** (6:35,511,497 bp), **rs424142667** (6:35,511,899 bp) y **rs403382566** (6:35,512,106 bp). Este gen está altamente expresado en la glándula adrenal y codifica para la proteína W5NQE9 en ovinos, pero actualmente no hay muchos estudios en profundidad acerca de esta. Sin embargo, se considera un hallazgo relevante dado que la glándula adrenal interviene en la respuesta al estrés (ejes SAM y HHA, Moberg, 2000, Sapolsky et al., 2000, Selye, 1939, Sapolsky et al., 2000) y existen diferencias en la frecuencia del polimorfismo según el tipo de temperamento (Qiu et al., 2016). El genotipo A/A del polimorfismo tipo SNP628 del gen *CYP17* involucrado específicamente en la producción de cortisol fue más frecuente en ovejas de la línea nerviosa, mientras que el genotipo G/G lo fue en ovejas de la línea calma (Qiu et al., 2016).

Otro gen candidato fue el ***GRID2*** (intervalo 30,768,380-31,534,647 bp), asociado a dos marcadores, **rs399480023** (6:31,217,615 bp) y **rs422603241** (6:31,453,17 bp). Este gen codifica para la proteína W5QA32 (receptor del glutamato, GLU), que está relacionada a procesos biológicos vinculados a la

regulación de la transmisión sináptica (The UniProt Consortium, 2021). Particularmente el receptor de GLU funciona como un canal iónico en el sistema nervioso central y juega un papel muy importante en la excitación de la transmisión (The UniProt Consortium, 2021). El GLU es un aminoácido esencial y es el neurotransmisor más abundante en el cerebro, implicado además en la regulación de procesos comportamentales, sociales, de aprendizaje, memoria, sensitivos y cognitivos (Giménez et al., 2018). El GLU está descrito como uno de los aminoácidos neuroestimuladores de la reproducción que favorece la secreción pulsátil de GnRH y LH (Mahesh y Bran, 2005), y regula el comportamiento sexual mediante la dopamina, debido a su acción en las neuronas hipotalámicas de la GnRH (Iremonger et al., 2010). Investigaciones recientes en ovinos demostraron que la inclusión de aminoácidos específicos en la dieta, como son arginina, glutamina, leucina y glicina, tiene efectos beneficiosos sobre la supervivencia y crecimiento embrionario y fetal (Wu, 2010, Saevre et al., 2011, Crane et al., 2016). Por lo tanto, los SNP detectados en el cromosoma 6 comprenden dos genes relevantes, uno que se expresa en el eje vinculado a la respuesta de estrés (eje HHA, gen *GPRIN3*) y otro que se expresa centralmente (gen *GRID2*). El temperamento es clave en ambos escenarios, ya que una mayor reactividad afecta negativamente el funcionamiento del eje endócrino reproductivo (Dobson y Smith, 2000, Damián et al., 2015).

4.5. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL

El análisis de enriquecimiento funcional permitió identificar varias rutas metabólicas enmarcadas por conjuntos de genes funcionales. Cualquier gen dado se asocia con un conjunto de términos de anotación. Si los genes comparten un conjunto similar de esos términos, lo más probable es que estén involucrados en mecanismos biológicos similares. La plataforma DAVID brinda un algoritmo referenciado a estadísticas kappa, que cuantifica el grado de concordancia de los genes que comparten términos de anotación similares. El resultado de Kappa varía de cero a uno (mayor valor, mayor

concordancia). En la vía de señalización del calcio ($p\text{-val} = 0,048$) se agruparon varios genes, dentro de los cuales se destacan tres: gen *HTR5A*, receptor de serotonina; gen *DRD1*, receptor de dopamina y gen *GRM1*, receptor 1 de glutamato. Una exploración más cercana de la señalización del calcio derivó en los siguientes términos de anotación: contracción muscular cardíaca ($kappa = 0,42$); señalización de oxitocina ($kappa = 0,41$); sinapsis del glutamato ($kappa = 0,35$) y sinapsis de dopamina ($kappa = 0,31$). Los neurotransmisores dopamina y serotonina están involucrados en la respuesta al estrés en una variedad de especies, mediante la activación de sus diferentes receptores (Reif y Lesch, 2003, Noblett y Coccaro, 2005). Por su parte, el GLU es un neurotransmisor involucrado en la reproducción debido a su acción favorable sobre neuronas hipotálamicas para la secreción de GnRH (Iremonger et al., 2010), además de estar involucrado en procesos sociales, sensitivos y cognitivos (Giménez et al., 2018). La oxitocina es un regulador importante de comportamientos sociales (Damián et al., 2021) como el comportamiento maternal (Meyer-Lindenberg et al., 2011) y el reconocimiento en humanos (Kumsta y Heinrichs, 2013). Variaciones en el gen del receptor de oxitocina se asociaron al temperamento, la reactividad a los factores estresantes y los comportamientos agresivos (Malik et al., 2012 Tost et al., 2010, Rodríguez et al., 2009). En consecuencia, el set de genes definido por los SNP de mayor efecto determinó que la vía enriquecida de señalización del calcio tiene un estrecho relacionamiento con el temperamento, ya que involucra varios aspectos moduladores de este rasgo y de sus efectos fisiológicos, como se ha descrito anteriormente en aspectos reproductivos (Bickell et al., 2010, Van Lier et al., 2017).

En la vía metabólica de esteroidogénesis en el ovario ($p\text{-val} = 0,0170$) se agruparon los genes *CYP2J* (citocromo P450); gen del receptor de la hormona folículo estimulante (*FSHR*); gen de la enzima hidroxisteroide 17-beta deshidrogenasa (*HSD17B2*) y dos genes asociados a la síntesis de prostaglandina (*PGFS*, *PTGS2*). Estos genes vinculados con la reproducción reafirman la asociación del temperamento con características reproductivas

y que afecta varios niveles del funcionamiento del eje endócrino-reproductivo: hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) (Dobson y Smith, 2000, Von Borell et al., 2007, Damián et al., 2015, Narayan y Parisella, 2017). Se destaca el gen *ACTN2* en la vía de miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (p-val = 0,037). Este gen codifica para la proteína actinin alfa 2, reportada para humanos, que se expresa tanto en músculos esqueléticos como en los cardíacos y su función en el anclaje de filamentos delgados de actina miofibrilar (Beggs et al., 1992, Murphy y Young, 2015, Ribeiro et al., 2014). Recientemente se ha encontrado una variante en la región reguladora de este gen que conduce a deficiencias cardíacas (Arvanitis et al., 2020). Sin embargo, su asociación con el rasgo temperamento en ovinos no ha sido reportado aún.

Uno de los procesos biológicos enriquecidos consideró el término regulación positiva de la señalización mediada por calcio (GO:0050850, p-val = 0,001), donde se observó el gen del receptor de FSH y otros (*CD24*, *CDH13*, *SYK*, *LOC101112639*). El término *locomotory behavior* (GO:0007626, p-valor = 0,036) considera el movimiento específico de un lugar a otro del animal en respuesta a estímulos externos o internos y/o una combinación del estado interno y las condiciones externas de ese animal. Un *subset* de este *GO_term* se vincula directamente con el término *behavior* (GO:0007610), descrito como las respuestas de un animal a estímulos internos o externos (acciones o inacciones), a través de un mecanismo que involucre la actividad del sistema nervioso. Otro *GO_term* *regulation of ERK1 and ERK2 cascade* (GO:0070372, p-val = 0,032) participa en varias respuestas biológicas. Este término se asocia a varios procesos que modulan la frecuencia, la tasa o el alcance de la transducción de señales mediada por la cascada de *ERK1* y *ERK2* (*Extracellular-Signal-Regulated Kinase*). Esta cascada de señalización es una ruta formada por proteínas quinasas activadas por mitógenos que regulan una amplia variedad de procesos celulares como la proliferación y la diferenciación, o respuestas biológicas como la supervivencia y el estrés (Herrero, 2012). También se

releva el *GO_term* vinculado a los procesos metabólicos de carbohidratos (GO:0005975, p-val = 0,013) por la asociación que presenta la disponibilidad de energía para hacer frente a un estresor, específicamente las respuestas fisiológicas al estrés que incluyen un aumento de la tasa metabólica y del gasto energético, así como también un incremento en el catabolismo de lípidos y degradación de proteínas. Estos cambios fisiológicos en el animal ayudan a mantener la disponibilidad de energía y oxígeno de forma inmediata (Sapolsky et al., 2000, Damián et al., 2015), y son la base de lo que se conoce como respuesta de «lucha o huida», primera respuesta autónoma del individuo para hacer frente al estresor o para escapar de este (Cannon, 1914).

5) CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió conocer SNP asociados al rasgo temperamento en ovinos. Dichos SNP no fueron reportados previamente, lo cual abre una ventana de exploración para futuros trabajos no sólo vinculados al temperamento, sino también a diferentes vías metabólicas que podrían repercutir en aspectos de producción y bienestar.

La varianza genética de los SNP reveló que existen regiones del genoma asociadas a una mayor variabilidad y que el temperamento no está regulado por el efecto de un gen mayor, sino que es una característica multigénica. Estas regiones con mayor influencia en la variabilidad genética aditiva permitieron detectar nueve genes candidatos asociados a los cromosomas 6, 10 y 21 (*GRID2*, *GPRIN3*, *LOC101110773*, *LOC101110521*, *PYGM*, *SYVN1*, *CAPN1*, *FADS1*, *SYT7*), vinculados con la actividad energética del organismo, la transmisión sináptica, la ternura de la carne y la actividad del calcio. La identificación de estos genes y rutas metabólicas y sus respectivas funciones podría contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos genéticos que regulan el rasgo temperamento en ovinos.

El análisis de enriquecimiento funcional permitió identificar funciones de genes y complementar los resultados del estudio de asociación. El 5 % de los SNP de mayor efecto determinó un set de 900 genes vinculados con varias rutas metabólicas, donde el análisis de la ontología génica muestra que hay varios procesos vinculados a la regulación de ATP, del calcio, la actividad celular, la locomoción y el comportamiento, el metabolismo de lípidos y carbohidratos, la modulación de la transmisión sináptica, entre otros. Varias de estas rutas metabólicas resultan de interés para el rasgo temperamento y conducen a la necesidad de seguir explorando.

6) **BIBLIOGRAFÍA**

- Aguilar I, Misztal I, Johnson DL, Legarra A, Tsuruta S, Lawlor TJ. 2010. Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 743-752. doi: 10.3168/jds.2009-2730
- Aguilar I, Misztal I, Tsuruta S, Legarra A, Wang H, Legarra A. 2020. PREGSF90 – POSTGSF90: Computational Tools for the Implementation of Single-step Genomic Selection and Genome-wide Association with Ungenotyped Individuals in BLUPF90 Programs. 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP), Aug 2014, Vancouver, Canadá. American Society of Animal Science. Proceedings. <https://hal.inrae.fr/hal-02743809>
- ANSES (Administración Nacional de la Seguridad Social). 2018. Definition of animal welfare and sets the foundation for its research and expert appraisal work. [En línea]. 12 mayo 2022. Disponible en: <https://www.anses.fr/en/content/anses-proposes-definition-animal-welfare-and-sets-foundation-its-research-and-expert>
- Arvanitis M, Tampakakis E, Zhang Y. 2020. Genome-wide association and multi-omic analyses reveal ACTN2 as a gene linked to heart failure. *Nat Commun* 11, 1122 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14843-7>
- Baldock NM, Sibly RM. 1990. Effects of handling and transportation on the heart rate and behaviour of sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, 28(1-2), 15-39. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(90\)90044-E](https://doi.org/10.1016/0168-1591(90)90044-E)
- Barbieri V, Fernández MA, Laguzzi M. 2016. Cambios comportamentales en ovejas preñadas y vacías luego de la esquila invernal. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 41 p.
- Beggs AH, Byers TJ, Knoll JH, Boyce FM, Bruns GA, Kunkel LM. 1992. Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *Journal of Biological*

Chemistry, 267(13), 9281-9288.

Bickell S, Durmic Z, Blache D, Vercoe PE, Martin GB. 2010. Rethinking the management of health and reproduction in small ruminants. Updates on Ruminant Production and Medicine (Proceedings of the 26th World Buiatrics Congress), 14-17 November 2010, Santiago, Chile.

Bickell SL, Nowak R, Poindron P, Sèbe F, Chadwick A, Ferguson D, Blache D. 2009a. Temperament does not affect the overall establishment of mutual preference between the mother and her young in sheep measured in a choice test. *Developmental Psychobiology*, 51(5), 429-438. <https://doi.org/10.1002/dev.20382>

Bickell S, Poindron P, Nowak R, Chadwick A, Ferguson D, Bloche D. 2009b. Genotype rather than non-genetic behavioural transmission determines the temperament of Merino lambs. *Animal Welfare*, 18(4), 459-466.

Bickell S, Poindron P, Nowak R, Ferguson D, Blackberry M, Blache D. 2011. Maternal behaviour and peripartum levels of oestradiol and progesterone show little difference in Merino ewes selected for calm or nervous temperament under indoor housing conditions. *Animal*, 5(4), 608-614. <https://doi.org/10.1017/S175173111000217X>

Blache D, Ferguson D. 2005a. Genetic Estimates for Temperament traits in sheep Breeds. *Reproduction*, 364. 19 p.

Blache D, Ferguson D. 2005b. Increasing sheep meat production efficiency and animal welfare by selection for temperament Meat. *Meat and Livestok Australia* , 364: 1-22.

Blache D, Bickell SL. 2010. Temperament and reproductive biology: emotional reactivity and reproduction in sheep. *Revista Brasileira de Zootecnia*. (39): 401-408.

Bohus B, Benus RF, Fokkema DS, Koolhaas JM, Nyakas C, Van Ortmerssen GA, Steffens AB. 1987. Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses. *Progress in Brain Research*, 72,57-70.

doi:10.1016/S0079-6123(08)60196-X

- Boissy A, Bouix J, Orgeur P, Poindron P, Bibé B, Le Neindre P. 2005. Genetic analysis of emotional reactivity in sheep: Effects of the genotypes of the lambs and of their dams. *Genetics Selection Evolution*, 37(4), 381-401. doi:10.1051/gse:2005007
- Bortolato M, Pivac N, Muck Seler D, Nikolac Perkovic M, Pessia M, Di Giovanni G. 2013. The role of the serotonergic system at the interface of aggression and suicide. 2013. *Neuroscience*. 236:160-85. doi:doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.015.
- Breen KM, Billings HJ, Wagenmaker ER, Wessinger EW, Karsch FJ. 2005. Endocrine Basis for Disruptive Effects of Cortisol on Preovulatory Events. *Endocrinology*, 146(4): 2107-2115. doi:10.1210/en.2004-1457.
- Brookes AJ. 1999. The essence of SNPs. *Gene*, 234, 177-186. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00219-X.
- Brown DJ, Fogarty NM, Iker CL, Ferguson DM, Blache D, Gaunt GM. 2016. Genetic evaluation of maternal behaviour and temperament in Australian sheep. *Animal Production Science*. 56:767-74. doi:10.1071/AN14945.
- Brunes LC, Baldi F, Lopes FB, Lôbo RB, Espigolan R, Costa MF, Stafuzza N, Magnabosco CU. 2020. Weighted single-step genome-wide association study and pathway analyses for feed efficiency traits in Nellore cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 138(1), 23-44. doi:10.1111/jbg.12496.
- Burrow H, Seifert G, Corbet N. 1988. A New Technique for Measuring Temperament in Cattle. *Proceeding of the Australian Society of Animal Production*. 17:154-157.
- Burrow HM. 1997. Measurements of temperament and their relationships with performance traits of beef cattle. *Animal Breeding Abstracts*. 65, 477-495. (p. 19).

- Cannon B. 1929. Reviews. *Physiological Reviews*, IX(3), 399-431.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1929.9.3.399>
- Cannon WB. 1914. The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *American Journal of Physiology Legacy Content*, 33(2), 356-372.
<https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajplegacy.1914.33.2.356>
- Cardellino R, Rovira J. 1989. Mejoramiento genético animal. Montevideo: Hemisferio Sur. 253.
- Cassini M, Hermitte G. 1994. Etología aplicada a la producción animal. In: *Etología: Introducción a la ciencia del comportamiento*. Universidad de Extremadura, España. P. 469-491.
- Christensen O, Lund M. 2010. Genomic relationship matrix when some animals are not genotyped. *Genetics Selection Evolution*, 42(2), 1-8.
- Clarke AS, Boinski S. 1995. Temperament in nonhuman primates are not genotyped. *American Journal of Primatology*, 37(2), 103-25.
doi:10.1002/aip.1350370205
- Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. 1998. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res*. 8, 1229-1231. [En línea]. Consultado 17 noviembre 2022. Disponible en: <https://genome.cshlp.org/content/8/12/1229.full.pdf>
- Côté F, Thévenot E, Fligny C, Fromes Y, Darmon M, Ripoche M, Bayard E, Hanoun N, Saurini F, Lechat P. 2003. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 100:13525-30.
- Crane AR, Redden RR, Van Emon ML, Neville TL, Reynolds LP, Caton JS, Schauer CS. 2016. Impacts of supplemental arginine on the reproductive performance of fall lambing ewes. *Journal of Animal Science*. 94: 3540-3549. ISSN: 1525-3163. doi: 10.2527/jas.2016-0379

Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Ridwan M, Armean I, Irimoloye OA, Azov AG, Barnes I, Bennett R, Berry A, Bhai J, Bignell A, Billis K, Boddu S, Brooks L, Charkhchi M, Cummins C, Da Rin Fioretto L, Davidson C, Dodiya K, Donaldson S, El Houdaigui S, El Naboulsi T, Reham F, Garcia Giron C, Genez T, Gonzalez J, Guijarro-Clarke C, Gymer A, Hardy M, Hollis Z, Hourlier T, Hunt T, Juettemann T, Kaikala V, Kay M, Lavidas I, Le T, Lemos D, Marugán JC, Mohanan S, Mushtaq A, Naven M, Ogeh D, Parker A, Parton A, Perry M, Piližota I, Prosovetskaia I, Sakthivel MP, Abdul Salam AI, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Pérez-Silva JG, Stark W, Steed E, Sutinen K, Sukumaran R, Sumathipala D, Suner MM, Szpak M, Thormann A, Tricomi FF, Urbina-Gómez D, Veidenberg A, Walsh TA, Walts B, Willhoft N, Winterbottom A, Wass E, Chakiachvili M, Flint B, Frankish A, Giorgetti S, Haggerty L, Hunt SE, Ilsley GR, Loveland JE, Martin FJ, Moore B, Mudge JM, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Tate J, Thybert D, Trevanion SJ, Dyer S, Harrison PW, Howe KL, Yates AD, Zerbino DR, Flicek P. Ensembl 2022, *Nucleic Acids Research*, Volume 50, Issue D1, 7 January 2022, Pages D988–D995.
doi:10.1093/nar/gkab1049

Clarke AS, Boinski S. 1995. Temperament in nonhuman primates. *American Journal of Primatology*, 37(2), 103-125. doi:10.1002/ajp.1350370205

Damián JP. 2011. Estrés y jerarquía social en carneros : respuestas endócrinas, bioquímicas, fisiológicas y comportamentales a diferentes estresores. Tesis DMTV. Montevideo, Uruguay. Facultad de Veterinaria. 116 p.

Damián JP, Hotzel MJ, Banchemo G, Ungerfeld R. 2013. Behavioural response of grazing lambs to changes associated with feeding and separation from their mothers at weaning. *Research in Veterinary Science* 95:913-918.

Damián JP, Bausero M, Bielli A. 2015. Acute stress, hypothalamic-

hypophyseal-gonadal axis and testicular function-a review. *Annals of Animal Science* (Vol. 15, Issue 1, pp. 31-50). doi:10.2478/aoas-2014-0084

Damián JP, De Soto L, Espindola D, Gil J, Van Lier E. 2021. Intranasal oxytocin affects the stress response to social isolation in sheep. *Physiology and Behavior*, 230: 8. doi:10.1016/j.physbeh.2020.113282

Del Campo M. 2011. El bienestar animal en nuestros sistemas de producción, enfoque de la investigación a nivel nacional. En: INIA Tacuarembó. Unidad Experimental Glencoe. Día de campo, setiembre 2011, Paysandú, Uruguay. Propuestas tecnológicas para el incremento de la productividad, la valorización y el ingreso económico para sistemas ganaderos de basalto. Tacuarembó (Uruguay): INIA, 2011. pp. 59-60.

Del Campo M, Manteca X, Soares de Lima JM, Britoa G, Hernández P, Sañudo C, Montossi F. 2011. Temperamento, productividad y calidad del producto. *Revista INIA*, marzo 2011. p. 11-17

Del Campo M, Hernández S, Ferrón M, Soares de Lima JM, Botero S, Piñeriro J, Rodríguez H, Moreira E, Rovira, Frugoni J, Levratto J, Mondragón J, Albernaz F, Barreto J, Presa A, Arce F, De Barbieri I. 2018. Evaluación de la respuesta biológica de estrés de corderos, frente a diferentes métodos de castración y descole. En: Asociación Uruguaya de Producción Animal (6.º, 2018, Tacuarembó, Uruguay). *Proceedings. INIA*. 145.

Ding L, Maloney SK, Wang M, Rodger J, Chen L, Blache D. 2020. Association between temperament related traits and single nucleotide polymorphisms in the serotonin and oxytocin systems in Merino sheep. *Genes, Brain and Behavior*, 1-32. doi:10.1111/gbb.12714

Dobson H, Smith RF. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science*. 60-61, 743-752

Dobson H, Ghuman S, Prabhakar S, Smith R. 2003. A conceptual model of

- the influence of stress on female reproduction. *Reproduction*, 125(2), 151-163. doi:10.1530/rep.0.125015
- Dodd CL, Pitchford WS, Hocking Edwards JE, Hazel SJ. 2012. Measures of behavioural reactivity and their relationships with production traits in sheep: A review. *Applied Animal Behaviour Science*, 140(1-2), 1-15. doi:10.1016/j.applanim.2012.03.018
- Doyle RE, Hinch GN, Fisher AD, Boissy A, Henshall JM, Lee C. 2011. Administration of serotonin inhibitor p-Chlorophenylalanine induces pessimistic-like judgement bias in sheep. *Psychoneuroendocrinology*, 36(2), 279-288. doi:10.1016/j.psyneuen.2010.07.018
- Durinck S, Moreau Y, Kasprzyk A, Davis S, De Moor B, Brazma A, Huber W. 2005. BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis. *Journal of Leukocyte Biology*. 21: 3439-3440. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti525>
- Durinck S, Spellman P, Birney E, Huber W. 2009. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nature Protocols* 4, 1184-1191.
- Ehnert K, Moberg G. 1991. Disruption of oestrous behaviour in ewes by dexamethasone or management-related stress. *Journal of Animal Science*. 69: 2988-2994.
- Esposito E, Di Matteo V, Di Giovanni G. 2008. Serotonin-dopamine interaction: an overview. In: Di Giovanni G, Di Matteo V, Esposito E, editors. *Serotonin-Dopamine interaction: Experimental evidence and therapeutic relevance*. Elsevier Publishing. pp. 3-44. UK.
- Forkman B, Boissy A, Meunier-salaün M, Canali E, Jones RB. 2007. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. 92, 340-374. doi:10.1016/j.physbeh.2007.03.016
- Giménez C, Zafra F, Aragón C. 2018. Fisiopatología de los transportadores de glutamato y de glicina: nuevas dianas terapéuticas. *Revista de*

Neurología;67 (12):491-504. doi: 10.33588/rn.6712.2018067

- Guesdon V, Meurisse M, Chesneau D, Picard S, Lévy F, Chaillou E. 2015. Behavioral and endocrine evaluation of the stressfulness of single-pen housing compared to group-housing and social isolation conditions. *Physiology Behavior*. 147:63-70.
- Hamidovic A, Dlugos A, Skol A, Palmer AA, De Wit H. 2009. Evaluation of genetic variability in the dopamine receptor D2 in relation to behavioral inhibition and impulsivity/sensation seeking: An exploratory study with d-amphetamine in healthy participants. *Experimental Clinical Psychopharmacology*, 17, 374-383. doi: 10.1037/a0017840
- Haskell MJ, Simm G, Turner SP. 2014. Genetic selection for temperament traits in dairy and beef cattle. *Frontiers in Genetics*, 5: 1-18. doi:10.3389/fgene.2014.00368
- Hawken PA, Luckins N, Tilbrook A, Fiol C, Martin GB, Blache D. 2013. Genetic selection for temperament affects behaviour and the secretion of adrenal and reproductive hormones in sheep subjected to stress. *Stress*, 16(1), 130-142. doi: 10.3109/10253890.2012.690114
- Hawken P, Williman M, Milton J, Kelly R, Nowak R, Blache, D. 2012. Nutritional supplementation during the last week of gestation increased the volume and reduced the viscosity of colostrum produced by twin bearing ewes selected for nervous temperament. *Small Ruminant Research*, 105(1-3), 308-314. doi: 10.1016/j.smallrumres.2012.01.011
- Herrero A. 2012. Especificidad espacio-temporal de las señales Ras-ERK en la determinación de respuestas biológicas. Tesis Doc. Bioquímica. Cantabria, España. Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria.
- Hough D, Cloete S, Storbeck AC, Swart P. 2013. Cortisol production in sheep is influenced by the functional expression of two cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) isoforms, *Journal of Animal*

Science 91. 1193-1206.

- Hough D, Swart P, Cloete S. 2013a. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to improve animal welfare by means of genetic selection: Lessons from the South African Merino. *Animals*, 3(2): 442-474. <https://doi.org/10.3390/ani3020442>
- Hough D, Swart P, Africa S. 2013b. Searching for SNP that affect sheep robustness: CYP17 SNP affect behavioural responses to psychological stress. 2009, 503-506.
- Illian MA, Gilmour RS, Bickerstaffe R. 1998. Quantification of ovine and bovine calpain I, calpain II and calpastatin mRNA by ribonuclease protection assay. *Journal of Animal Science*, 76: 853-864.
- Illian MA, Morton JD, Kent MP, Le Couteur CE, Hickford J, Cowley R, Bickerstaffe R. 2001. Intermuscular variation in tenderness: Association with the ubiquitous and muscle-specific calpains. *Journal of Animal Science*. 79:122
- Iremonger KJ, Constantin S, Liu X, Herbison AE. 2010. Glutamate regulation of GnRH neuron excitability. *Brain Research*. 1364: 35-43. ISSN: 0006-8993. doi: 10.1016/j.brainres.2010.08.071
- Jara E, Peñagaricano F, Armstrong E, Ciappesoni G, Iriarte A, Navajas A. 2022. Revealing the genetic basis of eyelid pigmentation in Hereford cattle, *Journal of Animal Science*, Volume 100, Issue 5, May 2022, skac110. doi:10.1093/jas/skac110
- Jonsson EG, Cichon S, Gustavsson JP, Grunhage F, Forslund K, Mattila-Evenden M, Nothen MM. 2003. Association between a promoter dopamine D2 receptor gene variant and the personality trait detachment. *Biological Psychiatry*, 53, 577-584. doi: 10.1016/S0006-3223(02)01732-8
- Kadim IT, Mahgoub O, Alkindi AY, Al-Marzooqi W, Al-Saqri NM, Almaney M, Mahmoud IY. 2007. Effect of transportation at high ambient

- temperatures on physiological responses, carcass and meat quality characteristics in two age groups of Omani sheep, Asian-Australas. Journal of Animal Science. 3:424-431.
- King DA, Schuehle CE, Randel RD, Welsh TH, Oliphint RA, Baird BE, Curley KO, Vann RC, Hale DS, Savell JW. 2006. Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. Meat Science. 74:546-56.
doi:10.1016/j.meatsci.2006.05.004.
- Kumsta R, Heinrichs M. 2013. Oxytocin, stress and social behavior: neurogenetics of the human oxytocin system. Current Opinion in Neurobiology. 23: 11-6.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.09.004>
- Koohmaraie M. 1992. Effect of pH, temperature, and inhibitors of autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle m-calpain. Journal of Animal Science. 70:3071
- Koohmaraie M. 1995. The biological basis of meat tenderness and potential genetic approaches for its control and prediction. Proc. Annu. Meat Conf. 48:69.
- Le Neindre P, Trillat G, Sapat J, Mbissiert F, Bonnet J, Chupins M. 1995. Individual Differences in Docility in Limousin Cattle. Journal of Animal Science. 73:2249-2253.
- Lonergan HE, Wangang Z, Lonergan SM. 2010. Biochemistry of postmortem muscle. Lessons on mechanisms of meat tenderization. Meat Science 86, 184-195.
- Lourenco D, Legarra A, Tsuruta S, Masuda Y, Aguilar I, Misztal I. 2020. Single-step genomic evaluations from theory to practice: using snp chips and sequence data in blupf90. Genes, 11(7), 1-32.
doi:10.3390/genes11070790
- Macfarlane MS, Breen KM, Sakurai H, Adams BM, Adams TE. 2000. Effect

of duration of infusion of stress-like concentrations of cortisol on follicular development and the preovulatory surge of LH in sheep. *Animal Reproduction Science*, 63:167-175

Malik AI, Zai CC, Abu Z, Nowrouzi B, Beitchman JH. 2012. The role of oxytocin and oxytocin receptor gene variants in childhood-onset aggression. *Genes Brain Behavior*. 11:545-51. doi:10.1111/j.1601-183X.2012.00776.x.

Mancin, E. 2020. Can single-step genome-wide association analysis (ssGWAA) account for population structure?. *Journal of Animal Science*, Volume 98, Issue Supplement_4, November 2020, Pages 9-10. doi:10.1093/jas/skaa278.018

Mann JJ. 1999. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology* 1999: 21.

Manteca X. 1998. Neurophysiology and Assessment of Welfare. *Meat Science*, 49(98), S205-S218. doi:10.1016/s0309-1740(98)00085-0

Matteri R, Carroll C, Dyer C. 2009. Neuroendocrine Responses to Stress. In: Moberg G.P and Mench J.A (eds). *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishing, pp. 43-76. Columbia, Missouri, USA.

Medrano JF, Aasen E, Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8(1):43.

Megdiche S, Mastrangelo S, Hamouda M, Lenstra J, Ciani E. 2019. Merino and Merino-derived sheep breeds: a further look at genome-wide selection signatures for wool traits. *Frontiers in Genetics*, 10. doi:10.3389/fgene.2019.01025.

Meyer-Lindenberg A, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M. 2011. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nature Reviews Neuroscience*, 12:524-38. doi:10.1038/nrn3044.

- Miller WL, Auchus RJ. 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Research*. 32:81-151.
- Minton JE. 1994. Function of the Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis and the Sympathetic Nervous System in Models of Acute Stress in Domestic Farm Animals. *Journal Animal Science*, 72(7): 1891-1898. doi: 10.2527/1994.7271891x.
- Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Tsuruta S, Lourenco DA, Fragomeni B, Zhang X, Muir WM, Cheng HH, Wing T, Hawken RR, Zumbach B, Fernando R. 2020. GWAS using ssGBLUP I. 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production GWAS, 5, 1-6. doi:10.1109/CGames.2013.6632596
- Misztal I, Tsuruta S, Lourenco D, Masuda Y, Aguilar I, Legarra A, Vitezica Z. 2018. Manual for BLUPF90 family of programs.
- Moberg GP. 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg G.P, and Mench J.A, editors. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishing, pp. 1-22. Wallingford, Oxon, UK.
- Moberg GP, Anderson CO, Underwood TR. 1980. Ontogeny of the adrenal and behavioral responses of lambs to emotional stress. *Journal of Animal Science*. 51(1).138-142. doi:10.2527/jas1980.511138x
- Mohammad-zadeh L, Moses L, Gwaltney-Brant S. 2008. Serotonin : a review. 1957, 187-199. doi:10.1111/j.1365-2885.2008.00944.x.
- Muir PD, Deaker JM, Brown DM. 1998. Effects of forage and grain based feeding system on beef quality: A review. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 41:623.
- Murphy PM, Purvis JW, Lindsay DR, Le Neindre, P. 1994. Measures of temperament are highly repeatable in Merino sheep and some are related to maternal behaviour. *Proceedings Australian Society of Animal*

Production, 20 (January 2019), 247-250.

Murphy PM. 1999. Maternal behaviour and rearing ability of Merino ewes can be improved by strategic feed supplementation during late pregnancy and selection for calm temperament. PhD Thesis, University of Western Australia, Perth.

Murphy AC, Young PW. 2015. The actinin family of actin cross-linking proteins - a genetic perspective. *Cell & Bioscience*, 5, 49.
doi:10.1186/s13578-015-0029-7

Murray TL, Blache DB, Bencini R. 2009. The selection of dairy sheep on calm temperament before milking and its effect on management and milk production. *Small Ruminant Research*, 87(1-3), 45-49.
doi:10.1016/j.smallrumres.2009.10.005

Narayan E, Parisella S. 2017. Influences of the stress endocrine system on the reproductive endocrine axis in sheep (*Ovis aries*), *Italian Journal of Animal Science*, 16:4, 640-651, doi:10.1080/1828051X.2017.1321972

New AS, Gelernter J, Yovell Y, Trestman RL, Nielsen DA, Silverman J, Siever LJ. 1998. Tryptophan hydroxylase genotype is associated with impulsive-aggression measures: A preliminary study. *American Journal of Medical Genetics*, 81,13-17. doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19980207)81:1%3C13::AID-AJMG3%3E3.0.CO;2-O

Nielsen DA, Virkkunen M, Lappalainen J, Eggert M, Brown GL, Long JC, Linnoila M. 1998. A tryptophan hydroxylase gene marker for suicidality and alcoholism. *Archives of General Psychiatry*, 55, 593-602.
doi:10.1001/archpsyc.55.7.593

Noblett KL, Coccaro EF. 2005. Molecular genetics of personality. *Current Psychiatry Reports*, (7)73-80. doi:10.1007/s11920-005-0028-1

Oddy VH, Harper GS, Greenwood PL, McDonagh MB. 2001. Nutritional and developmental effects on the intrinsic properties of muscles as they relate to the eating quality of beef. *Australian Journal of Experimental*

Agriculture. 41: 921

Oki H, Kusunose R, Nakaoka H, Nishiura A, Miyake T, Sasaki Y. 2007. Estimation of Heritability and Genetic Correlation for Behavioural Responses by Gibbs Sampling in the Thoroughbred Racehorse. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 124: 185-191.

Orgeur P, Bernard S, Naciri M, Nowak R, Benoist S, Lévy F. 1999. Psychobiological consequences of two different weaning methods in sheep. *Reproduction Nutrition Development*, 39(2): 231-244. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00900297>.

Page BT, Casas E, Heaton MP, Cullen NG, Hyndman DL, Morris CA, Crawford AM, Wheeler TL, Koochmaraie M, Keele JW, Smith TP. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science* 80(12):3077-3085. doi:10.2527/2002.80123077x.

Plush K, Hebart M, Brien F, Hynd P. 2011. The Genetics of Temperament in Merino Sheep and Relationships with Lamb Survival. *Applied Animal Behaviour Science*. 134:130-135.

Ponzoni RW. 1997. Genotipo y ambiente: ¿cuál es la combinación adecuada? *Revista Argentina de Producción Animal*. vol. 17-n.º 3. issn 0326- 0550. Pp. 227-239.

Price E, Thos J. 1980. Behavioral responses to short-term social isolation in sheep and goats. *Applied Animal Ethology*, 6(4), 331-339. doi:10.1016/0304-3762(80)90133-9

Pruessner JC, Champagne F, Meaney MJ, Dagher A. 2004. Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life maternal care: a positron emission tomography study using [¹¹C]raclopride. *Journal of Neuroscience*. 24:2825-2831.

Qiu X, Ledger J, Zheng C, Martin GB, Blache D. 2016. Associations between temperament and gene polymorphisms in the brain dopaminergic

- system and the adrenal gland of sheep. *Physiology and Behavior*, 153, 19-27. doi:10.1016/j.physbeh.2015.10.022
- Qiu X, Martin GB, Blache D. 2017. Gene polymorphisms associated with temperament. *Journal of Neurogenetics*, 31(1-2), 1-16. doi:10.1080/01677063.2017.1324857
- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [En línea] Disponible en: <https://www.R-project.org/>.
- Reif A, Lesch KP. 2003. Toward a molecular architecture of personality. *Behavioral Brain Research*, 139,1-20. doi: 10.1016/S0166-4328(02)00267-X
- Ribeiro EA, Pinotsis N, Ghisleni A, Salmazo A, Konarev PV, Kostan J, Sjöblom B, Schreiner C, Polyansky AA, Gkougkoulia EA, Holt MR, Aachmann FL, Zagrović B, Bordignon E, Pirker KF, Svergun DI, Gautel M, Djinović-Carugo KB. 2014. The structure and regulation of human muscle alpha-actinin. *Cell*, 159(6), 1447-1460. doi:10.1016/j.cell.2014.10.056
- Rivier C, Rivest S. 1991. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: Peripheral and central mechanisms. *Biology of Reproduction*, 45, 523-532. doi: 10.1095/ biolreprod45.4.523
- Rodriguez SM, Saslow LR, Garcia N, John OP, Keltner D. 2009. Oxytocin receptor genetic variation relates to empathy and stress reactivity in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.106:21437-41. doi:10.1073/pnas.0909579106
- Romeyer A, Bouissou M. 1992. Assessment of fear reactions in domestic sheep , and influence of breed and rearing conditions. *Applied Animal Behaviour Science*, 34: 93-119.
- Saevre C, Meyer AM, Van Emon ML, Redmer DA, Caton JS, Kirsch JD, Luther JS, Schauer CS. 2011. Impacts of arginine on ovarian function

and reproductive performance at the time of maternal recognition of pregnancy in ewes. Sheep Research Report. North Dakota State University, Fargo. 52: 13-16. [En línea]. Consultado 23 febrero 2023.

Disponible en:

<https://pdfs.semanticscholar.org/c540/63c9f5742fd22198d92d5cf367aed3343f01.pdf>

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21(1), 55-89. doi:10.1210/er.21.1.55

Sapolsky RM. 2004. Social status and health in humans and other animals. *Annual Review of Anthropology*, 33, 393-418. doi:10.1146/annurev.anthro.33.070203.144000

Sart S, Bencini R, Blache D, Martin GB. 2004. Calm Ewes Produce Milk With More Protein Than Nervous Ewes. *Animal Production in Australia*. 25: 307.

SAS Institute Inc. 2021. SAS University Edition [Software]. Retrived from https://www.sas.com/en_us/software/on-demand-for-academics.html

Selye H. 1939. The effect of adaptation to various damaging agents in the female sex organs in the rat. *Endocrinology*. 25(4): 615-624.

Sen S, Burmeister M, Ghosh D. 2010. Meta analysis of the association between a serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) and anxiety-related personality traits. *American Journal of Medical Genetics*. 15(1): 85-89. doi:10.1002/ajmg.b.20158

Sigdel A, Bisinotto RS, Peñagaricano F. 2021. Genes and pathways associated with pregnancy loss in dairy cattle. *Science Reproduction*. 11(1): 13329. doi:10.1038/s41598-021-92525-0

Soria LA, Corva PM. 2004. Factores genéticos y ambientales que determinan la ternera de la carne bovina. *Archivos Latinoamericanos*

de Producción Animal. 12(2): 73-88

Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. 1994 Structure and physiological function of calpains. *Biochemistry Journal*. 328:721.

Speck PA, Collingwood KM, Bardsley RG, Tucker GA, Gilmour RS, Buttery PJ. 1993. Transient changes in growth and in calpain and calpastatin expression in ovine skeletal muscle after short-term dietary inclusion of cimaterol. *Biochimie*. 75(10):917-23. doi: 10.1016/0300-9084(93)90049-x. PMID: 7906151.

Stranden I, Garrick DJ. 2009. Technical note: Derivation of equivalent computing algorithms for genomic predictions and reliabilities of animal merit. *Journal of Dairy Science*. 92(6): 2971– 2975. doi:10.3168/jds.2008-1929.

Storbeck KH, Swart AC, Slabbert JT, Swart P. 2007. The identification of two CYP17 α -1 alleles in the South African Angora goat, *Drug Metabolism Reviews*. 39: 467-480.

Storbeck KH, Swart AC, Snyman MA, Swart P. 2008. Two CYP17 genes in the South African Angora goat (*Capra hircus*)-the identification of three genotypes that differ in copy number and steroidogenic output. *The FEBS Journal*. 275: 3934-3943.

Tanda G, Ebbs AL, Kopajtic TA, Elias LM, Campbell BL, Newman AH, Katz JL (2007) Effects of muscarinic M-1 receptor blockade on cocaine-induced elevations of brain dopamine levels and locomotor behavior in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 321(1): 334–344. doi:10.1124/jpet.106.118067.

Tan P, Allen JG, Wilton SD, Akkari PA, Huxtable CR, Laing NG. 1997. A splice-site mutation causing ovine McArdle's disease. *Neuromuscular Disorders*. 7(5): 336-342. doi:10.1016/S0960-8966(97)00062-X.

The UniProt Consortium (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research* (49)1:480-489.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>

Tilbrook AJ, Clarke IJ. 2006. Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo pituitary adrenal axis to stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 27(3): 285-307.

Torino LM. 2013. Evaluación de la ternera con dos métodos de medición en carne de novillos Brangus en distintos tiempos de maduración [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. [En línea]. Consultado 20 febrero 2023. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/evaluacion-ternera-medicion-novillos-brangus.pdf>

Tost H, Kolachana B, Hakimi S, Lemaitre H, Verchinski BA, Mattay VS, Weinberger DR, Meyer-Lindenberg A. 2010. A common allele in the oxytocin receptor gene (OXTR) impacts prosocial temperament and human hypothalamic-limbic structure and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 107:13936-41. doi:10.1073/pnas.1003296107.

Ungerfeld R, Freitas de Melo A. 2021. Esquila en ovinos: adaptaciones fisiológicas, estrés y bienestar animal. [En línea]. Consultado 8 setiembre 2022. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/350185588_ESQUILA_EN_OVINOS_ADAPTACIONES_FISIOLOGICAS_ESTRES_Y_BIENESTAR_ANIMAL

Van Lier E, Regueiro M, Pérez R, Andersson H, Kindahl H, Forsberg M. 1999. Effects of adrenocorticotropic hormone (ACTH) and progesterone on luteinising hormone (LH) in recently castrated rams. *Animal Reproduction Science* 1999, 55:115-126.

Van Lier E, Hart KW, Viñoles C, Paganoni B, Blache D. 2017. Calm Merino ewes have a higher ovulation rate and more multiple pregnancies than

- nervous ewes. *Animal*, 11(7), 1196-1202.
doi:10.1017/S1751731117000106.
- Vandenheede M, Bouissou MF, Picard M. 1998. Interpretation of behavioural reactions of sheep towards fear-eliciting situations. *Applied Animal Behaviour Science*, 58: 293-310.
- VanRaden PM. 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. *Journal of Dairy Science*. 91(11): 4414-4423.
doi:10.3168/jds.2007-0980.
- Veissier I, Boissy A, Désiré L, Greiveldinger L. 2009. Animals emotions: studies in sheep using appraisal theories. *Animal Welfare*. 18(4): 347-54. doi:10.1017/S0962728600000749.
- Veissier I, Boissy A. 2007. Stress and welfare: two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view. *Physiology & Behavior*. 92(3): 429-33. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.11.008.
- Voisinet BD, Grandin T, Tatum JD, O'Connor SF, Struthers JJ. 1997. Feedlot Cattle with Calm Temperaments Have Higher Average Daily Gains Than Cattle with Excitable Temperaments. *Journal of Animal Science*. 75(4): 892-896. doi: 10.2527/1997.754892x.
- Von Borell E, Dobson H, Prunier A. 2007. Stress, behaviour and reproductive performance in female cattle and pigs. *Hormones and Behavior*. 52(1): 130-138. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.03.014.
- Wang H, Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Muir WM. 2012. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. *Genetic Research (Camb)*. 94(2): 73-83.
doi:10.1017/S0016672312000274.
- Wang H, Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Fernando RL, Vitezica Z, Okimoto R, Wing T, Hawken R, Muir WM. 2014. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes in a single-step (ssGWAS) for 6-week body weight in broiler chickens. *Frontiers in*

Genetics. doi:10.3389/fgene.2014.00134.

Wulf DM, Emnett RS, Leheska JM, Moeller SJ. 2002. Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palatability, *Journal of Animal Science*. 80(7): 1895–1903. doi:10.2527/2002.8071895x.

Wu G. 2010. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. American Society for Nutrition. *Advances in Nutrition*. 1(1): 31-37. doi:org/10.3945/an.110.1008.

Zambra N, Gimeno D, Blache D, Van Lier E. 2015. Temperament and its heritability in Corriedale and Merino lambs. *Animal*. 9(3): 373-379. doi:10.1017/S1751731114002833.

Zhang Y, Lin-Sen Z, Hong-Bao W, Ya-Ping X, Adoligbe JA. 2010. Effect of sex on meat quality characteristics of Qinchuan cattle. *African Journal of Biotechnology*. 9(28): 4504-4509.

7) ANEXOS

CANDIDATE GENES AND PATHWAYS ASSOCIATED WITH TEMPERAMENT TRAIT IN SHEEP

Estefanía Romaniuk ^{ab}; Brenda Vera ^c; Pablo Peraza ^c; Gabriel

Ciappesoni ^c; Juan Pablo Damián ^d; Elize van Lier ^{ab}

^a Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Avda. Garzón 780, 12900, Montevideo, Uruguay. Contacto: romaniuk@fagro.edu.uy

^b Estación Experimental Facultad de Agronomía Salto, Ruta 31, km 21, 50000, Salto, Uruguay

^c Sistema Ganadero Extensivo, INIA Las Brujas, Ruta 48, km 10, 90200, Canelones, Uruguay

^d Departamento de Biociencias Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 8, km 21, 13000, Montevideo, Uruguay

ABSTRACT

Temperament can be defined as the emotional variability among animals of the same species in response to the same stimulus, thus being able to group animals by reactivity as nervous, intermediate or calm. The main objective was to identify the SNP associated with the temperament phenotype; the secondary was to identify candidate genes and pathways. The database used for the ssGWAS consisted of 4,317 phenotyped animals, 1,697 animals genotyped and 10,799 animals in the pedigree. The estimated heritability was 0.19 ± 0.03 (\pm SEM). After quality control 38,268 effective SNP were used. The ssGWAS identified three genomic regions that explained the greatest percentage of the genetic variance, resulting in 25 SNP associated with nine candidate genes on chromosomes 6, 10 and 21. The candidate genes were *PYMG* gene (**rs402505013**, %var=1.46) linked to glycogen energy metabolism; *CAPN1* gene (**rs413708295**, %var=1.16; **rs421553713**, %var=1.09; **rs161627624**, %var=0.85; **rs404318469**, %var=0.58) associated with meat tenderness; *GRID2* gene (**rs422603241**, %var=0.76; **rs399480023**, %var=0.52) glutamate receptor, related to biological processes of synaptic transmission and *SYT7* gene (**rs421709693**, %var=0.54), associated with calcium metabolism. The detected SNP could be used as molecular markers for future studies associated with temperament trait or behavioral associated to stress.

Keywords: ssGWAS, *ovis aries*, *PYMG*, *CAPN1*, *GRID2*, *SYT7*

1) INTRODUCTION

Temperament is a tool to understand animal behavior and could be defined as the emotional variability among animals of the same species in response to the same stimulus (Blache and Bickell 2010). The animals perceive and react to environmental stimuli, such as novelty, uncertainty, challenge or change (Clarke and Boinski 1995). Furthermore, temperament refers to individuals' consistent behavioral styles or tendencies and can be represented in opposites as shy or bold, sociable or aggressive, restless or quiet (Southerland et al. 2012). Different physiological and behavioral responses have been used as indicators to classify animals according to their temperament (Veissier et al. 2009), and can be described as calm, nervous, or neutral.

The heritability of sheep temperament in Australia, measured with the Isolation Box Test (IBT), is between 0.14 and 0.41 depending on the breed (Blache and Ferguson 2005a). In Uruguay, with the same phenotypic test (IBT), heritability ranges from 0.18 to 0.31 for the Corriedale and Australian Merino breeds, respectively (Zambra et al. 2015). However, it is a trait that has not been economically valued, despite having an influence on traits of productive interest, such as ovulatory rate (Bickell et al. 2010; Van Lier et al. 2017), meat quality (Wulf et al. 2002), animal weight gain (Voisinet et al. 1997), milk and colostrum quality (Sart et al. 2004; Hawken et al. 2012), favoring animal welfare (Del Campo 2011) and providing safety to the operator associated with a less reactive animals or of a calmer temperament (Haskell et al. 2014).

Variability in animal temperament may be influenced by polymorphism of genes that are expressed in the brain, or along the sympathetic-adreno-medullary axis (SAM) of the autonomic nervous system and hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA) (Qiu et al. 2016, 2017). The SNP is the most common type of polymorphism where a single base is changed for another (e.g. GGTACC/GGTGCC) at a frequency greater than 1 % in a population

(Brookes 1999). A very powerful tool called Single Step Genomic Wide Association Study (ssGWAS), which identifies SNP for the phenotype of interest, has been developed for the inclusion of genomics in selection programs (Aguilar et al. 2010). The ssGWAS method uses genomic breeding values (GEBV) based on the combined pedigree, genomic and phenotypic information and its conversion to SNP marker effect. Through computational tools, the SNP effects, genetic variance and the p-value of SNP associated with temperament trait can be calculated (Wang et al. 2012). Therefore, we proposed to use this methodology with a set of genealogical, phenotypic and genomic data to explore the temperament trait in Merino sheep in Uruguay. The working hypothesis of this study is that there are SNP associated with the temperament trait in Australian Merino sheep. The main objective of this study was to identify the SNP associated with the temperament phenotype that explained the greatest genetic variance and to subsequently do gene-set analyses to identify candidate genes, functional gene-sets and gene signaling pathways implicated in temperament of sheep.

2) MATERIALS AND METHODS

2.1. PHENOTYPE DATA

A total of 4,317 lambs were tested for temperament between one and three months post-weaning, including four progeny: 2010, 2011, 2018 and 2019. The records of temperament scores were included in the genetic database (SULAR, Uniform System of Survey and Records Storage, of the National Genetic Evaluation). Temperament was measured using the Isolation Box Test (IBT) (Blache and Ferguson 2005a and 2005b). The dimensions of the box were 1.50 m (L) x 1.50 m (H) x 0.75 m (W). Each lamb was gently pushed inside the box, held there for 30 seconds, and agitation was objectively measured by an agitation meter. The agitation meter registered the vibrations of the box induced by the lamb's movements and high-pitched vocalizations. The higher the agitation score, the more nervous the sheep. The IBT was calibrated with an electronic unit to high and low agitation score. The intra-test coefficients of variation (CV %) of the IBT were 7.17 % and 7.93 % for the high and low setting, respectively. The inter-test CV % of the IBT were 9.37 % and 9.29 % for the high and low setting, respectively. There was no previous selection of animals and they had no previous experience with IBT. All procedures were approved by the Honorary Commission for Animal Experimentation (Comisión Honoraria de Experimentación Animal, CHEA, protocol N° 020300-000653-18-ID, CHEA 701), Universidad de la República.

2.2. GENOTYPE DATA

A total of 1,697 lambs were genotyped for 43,705 SNP and the molecular information was obtained using the Geneseek Genotyping Profile panel (GeneSeek® Genotyping Profile, GGP, Illumina, San Diego, California). Quality Control (QC) was conducted using PREGSF90 by animals and SNP. Animals were removed from the analysis when the call rate was < 95 % and when presenting Mendelian conflicts. The SNP were removed when the call rate was < 90 %; SNP with Minor Allele Frequency < 95 % (MAF) and

monomorphic SNP. Sex chromosomes were not included in the analysis. After QC, a total of 38,268 effective SNP were retained for subsequent genomic analyses.

2.3. PEDIGREE DATA

Pedigree data of 10,799 Merino sheep was used and the Off-Diagonal correlation between genomic information and pedigree data was 0.86. The genealogy level considered was level 3.

2.4. STATISTICAL ANALYSIS

The mixed model to perform a ssGWAS included fixed effects (genetic and environmental) and random effects. The fixed effects were contemporary group (year, flock, sex and rearing group), dam age (< 2 years, 2 to 3 years or > 3 years) and type of birth (single or twin).

The age of the lamb at the time of measurement with the IBT was considered as a co-variable. Through BLUP suite programs, it was possible to include the genomic information into this model to obtain the genomic estimated breeding value (GEBV) for temperament and the SNP effects.

The following model was used (Zambra et al., 2015):

$$y_{ijklm} = \mathbf{CG}_i + \mathbf{tb}_j + \mathbf{am}_k + \beta \mathbf{la}_{ijkm} + \mathbf{am} + \mathbf{e}_{ijklm}$$

where: \mathbf{Y} is the temperament data of the lamb m ; \mathbf{CG}_i is the contemporary group (i : year-flock-sex-rearing group; 73 levels), \mathbf{tb}_j the type of birth of lamb (j : single (1), twin (2)), \mathbf{am}_k the age of dam of lamb subdivided into 3 classes ($k_1 = < 2$ years ewe, $k_2 = 2$ to 3 years ewe and $k_3 = > 3$ years ewe), β is the regression coefficient of the age of the lamb on temperament, \mathbf{la} is the co-variable of lamb age at the time of measurement, \mathbf{a} is the additive effect of the animal with distribution $\mathbf{am} \sim N(0, \sigma^2_A A)$, where σ^2_A is the additive variance of temperament, A is an additive relationship matrix, and \mathbf{e} is the random effect of the error with independent normal distribution between the observations with variance σ^2_e .

2.4.1. Estimation of Genetic Parameters

The variance components necessary for the model were estimated by airemlf90 program version 1.148 of BLUPF90.

The heredability was calculated as:

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{(\sigma_a^2 + \sigma_e^2)}$$

where σ_a^2 is the genetic variance and σ_e^2 is the residual variance.

2.5. SINGLE STEP GENOME WIDE ASSOCIATION STUDIES (SSGWAS)

The main reason for using a ssGWAS was the ability to combine all the available pedigree, phenotype and genotypes information into a single evaluation. The result of combining the genomic (SNP) and pedigree information is the matrix [H], where the molecular information of genotyped animals is projected, through relatives, to individuals that are not genotyped (Misztal et al. 2018). Here, the classical pedigree relationship matrix [A] is replaced by matrix [H]. Thus, all the SNP are considered simultaneously together with all the phenotypes of the genotyped and non-genotyped animals (Aguilar et al. 2010; Wang et al. 2014). This genomic study is possible with the use of the BLUPF90 software, which is a family of programs for the estimation of variance components and for genetic evaluation (Misztal et al. 2020). The matrix [H] is complex; it can be simplified to its inverse [H⁻¹] (Aguilar et al. 2010; Christensen and Lund 2010) as follows:

$$H^{-1} = A^{-1} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G^{-1} - A_{22}^{-1} \end{bmatrix}$$

where G⁻¹ is the inverse of genomic relationship matrix (it is for genotyped animals, proportion of alleles shared between animals); A⁻¹ is the inverse of pedigree relationship matrix; and A₂₂⁻¹ is the inverse of the pedigree relationship matrix for genotyped animals. The genomic matrix was created as follows (VanRaden 2008):

$$G = \frac{ZDZ'}{\sum_{i=1}^M 2p_i(1-p_i)}$$

where Z is an incidence matrix adjusted for allele frequencies; D is a diagonal matrix of weights for SNP variances; Z' is the transpose; M is the number of SNP; and p_i represents the minor allele frequency of each SNP.

The percentage of genetic variance (% var) explained by a given 0,5 Mb region has been calculated as follows (Wang et al. 2014):

$$\frac{Var(a_i)}{\sigma_a^2} \times 100\% = \frac{Var(\sum_{j=1}^{20} Z_j \hat{u}_j)}{\sigma_a^2} \times 100\%$$

where a_i is genetic value of the i-th region that consist of contiguous 20 SNP; σ_a² is the total genetic variance; Z_j is vector of gene content of the j-th SNP for all individuals, and ũ_j is marker effect of the j-th SNP within the i-th region.

The SNP effects were estimated as follows (Stranden and Garrik 2009):

$$\hat{a} = \frac{1}{2 \sum p_i q_i} Z' G^{-1} \hat{u}_2$$

where Z' is the transpose of Z matrix; G is the genomic matrix for genotyped animal; ũ₂ is the genomic breeding value for genotyped animals and p_iq_i are the allele frequencies.

2.6. SNP SELECTION AND GENOMIC REGIONS

To identify markers associated with temperament, we worked with the p-value of the SNP and the % var explained by windows or adjacent segments of 0.5 mbp. These statistical arguments were obtained with the BLUP POSTGSF90 program (Aguilar et al. 2020). Once the analysis was carried out, numerous p-values were available, as well as SNP, which were plotted logarithmically along the genome in a Manhattan plot. The association was represented by the -log₁₀(p) for each marker and the significance threshold for the data set was established using the statistical technique of Bonferroni adjustment (1936):

$$[-\log_{10}(\alpha / n)]$$

where α is the significance level ($p < 0.05$) and n is the number of SNP after quality control (Mancin 2020). Thus, the genome significance threshold was $-\log_{10}(0.05/38,268) = 5.88$. However, with the aim of being able to cover more information and considering the lack of knowledge about biological mechanisms associated with the temperament trait, a more flexible horizontal threshold of the $-\log$ value of 5.0 was proposed. The statistical threshold used by Brunes et al. (2020) and Sigdel et al. (2021), $\% \text{ var} \geq 0.5 \%$, was used to define the significance of a SNP according to the $\% \text{ var}$ that it explained. A list of markers of interest was obtained, both from the p-value and from the $\% \text{ var}$, to explore in the genome, to find their position and their relationship with possible candidate genes that could be involved with the temperament trait. The R.Script output from POSTGSF90 (Aguilar et al. 2020) was used for The Manhattan plot graphs of the p-value and the $\% \text{ var}$.

2.7. GENETIC ENRICHMENT

We used genetic enrichment analysis as a tool to identify the biological and molecular terms associated with a phenotype of interest. For this analysis, the 5 % of SNP with the greatest effect were selected (Sigdel et al. 2021; Jara et al. 2022).

2.7.1. Mapping SNP to Genes

To assign SNP to genes, computational procedures were used with an ad hoc script in the R programmer (version 4.1.0) (R Core Team 2021), the BiomaRt package (version 2.48.3) (Durinck et al. 2005; Durinck et al. 2009) and the Ovis_aries_v3.1 ovine reference genome data set (<https://www.ensembl.org>; Cunningham et al. 2022). An SNP was assigned to a gene when it was located within a gene or within a genomic distance of 5 kb upstream or downstream (Brunes et al. 2020; Sigdel et al. 2021). Therefore, a gene was associated with temperament if it contained at least one SNP whose effect was in the top 5 % of the distribution.

2.7.2. Assignment of Genes to Functional Categories

From the two approaches (% var and SNP effect), a list of genes was obtained. To assign the genes to functional categories, the DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, latest available version 6.8) was used. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) databases were used to define functional gene sets. The gene ontology (GO) annotation categories considered in this study were Biological Process (BP), Molecular Function (MF), and Cellular Component (CC). Finally, GO terms of enriched genes with a threshold p-value ≤ 0.05 were considered significant. The objective of this analysis was to know in which metabolic pathways the genes would be involved and quantify it through the enriched p-value, which considers the proportion of genes under study (gene list) in relation to the total number of genes that have the pathway (enriched p-value ≤ 0.05). The Ensembl databases is another public and free platform that centralizes genomic information about different species. It is constantly updated thanks to bioinformatics collaboration between institutions and scientists. The aim was to map a SNP and know its genetic context.

3) RESULTS

3.1. ESTIMATION OF GENETIC PARAMETERS

The genetic variance was 111.78 ± 22.8 (SEM) and the residual variance was 472.6 ± 20.80 (SEM). The heredability (h^2) of the temperament trait was 0.19 ± 0.038 (SEM). The h^2 can be classified as moderate, according to the Cardellino and Rovira (1989) criterion.

3.2. SINGLE STEP GENOME WIDE ASSOCIATION STUDIES (SSGWAS)

The SNP with highest statistical association to the $-\log p$ value were found on chromosomes 2, 3, 6, 8 and 18 (Figure 1A). Another approach of analyzing the genetic variance explained by windows of 0.5 mbp of adjacent SNP identified genomic regions of interest associated with chromosomes 6, 10 and 21 ($\text{var} \geq 0.5$) (Figure 1B).

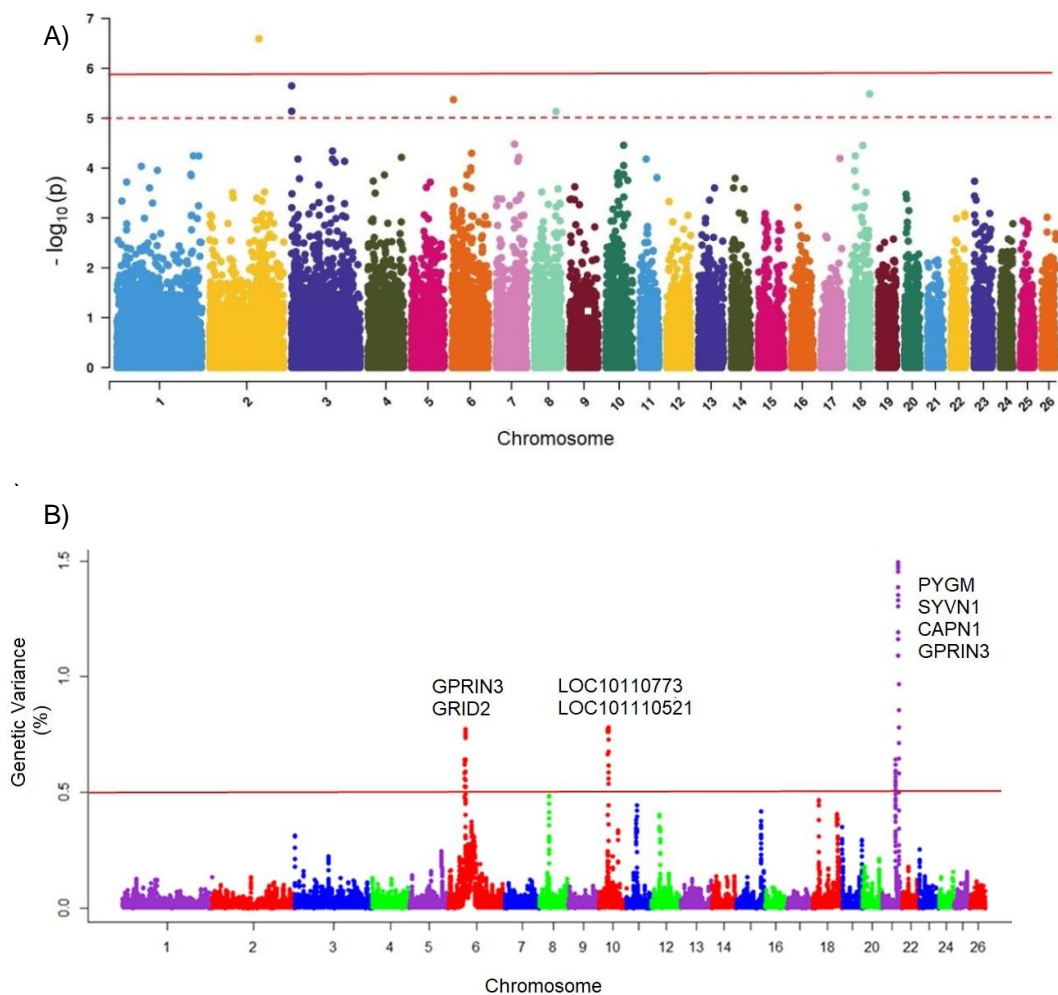


Figure 1A: Manhattan plot of 38,268 effective SNP for 1,697 Australian Merino genotyped animals belonging to the National Genetic Evaluation, included in the database of the Uniform Registry Collection System (SULAR). Chromosome number and statistical significance threshold of $-\log_{10}(p)$ according to Bonferroni adjustment (solid horizontal line) and strategic adjustment (dashed horizontal line). 1B) Manhattan plot for temperament according to the % variance explained by adjacent segments of 0.5 mbp single nucleotide polymorphism (SNP) windows. The solid horizontal line is the threshold, $\% \text{ var} \geq 0.5\%$. The nine candidate genes involved in the

temperament trait on chromosomes 6, 10 and 21 were inserted with their respective codes within each chromosome.

The information on the most relevant SNP found in these regions about % var shows that there are nine candidate genes for the temperament trait (Table 1), which are: **PYGM** (21:42,295,599-42,307,126), **SYVN1** (21:42,650,559-42,655,527), **CAPN1** (21:42,712,976-42,740,799), **LOC101110773** (10:29,275,771-29,457,586), **LOC101110521** (10:28,986,741-29,188,660), **GRID2** (6:30,768,380-31,534,647), **FADS1** (21:39,652,537-39,665,108), **SYT7** (21:39,390,965-39,426,334) and the **GPRIN3** gene (6:35,511,293-35,513,635). The genes and annotation of the regions on chromosomes 6, 10 and 21 is shown in Table 2.

Table 1: SNP detected in the GWAS with the greatest genetic variance, rs code, chromosome, position in the reference genome version oar_v3.1 in base pairs, type of variant and candidate genes

rs code	pos (bp)	CHR	% Var	Variant type	Candidate gene
rs402505013	42295749	21	1.4691	Splice acceptor var	<i>PYGM</i>
rs419347404	42601748	21	1.4519	Intron variant	-
rs161627521	42654067	21	1.3288	Intron variant	<i>SYVN1</i>
rs413708295	42714381	21	1.1617	Intron variant	<i>CAPN1</i>
rs421553713	42714613	21	1.0906	Intron variant	<i>CAPN1</i>
rs161627624	42715850	21	0.8537	Synonymous variant	<i>CAPN1</i>
rs408317317	29353089	10	0.7803	Intron variant	<i>LOC101110773</i>
rs428995675	29072930	10	0.7738	Intron variant	<i>LOC101110521</i>
rs407693533	35491698	6	0.7722	Intron variant	-
rs422603241	31453177	6	0.7688	Intron variant	<i>GRID2</i>
rs422288687	29304176	10	0.7678	Intron variant	<i>LOC101110773</i>
rs427220269	29054709	10	0.7670	Intron variant	<i>LOC101110521</i>
rs421383362	29188403	10	0.7636	Intron variant	<i>LOC101110521</i>
rs409829992	29162222	10	0.7624	Intron variant	<i>LOC101110521</i>
rs399382510	29202499	10	0.7619	Intergenic variant	-
rs411759303	35511497	6	0.7430	Missense variant	<i>GPRIN3</i>
rs400430030	29421760	10	0.6745	Intron variant	<i>LOC101110773</i>
rs419116702	29030595	10	0.6646	Intron variant	<i>LOC101110521</i>
rs398879843	35191867	6	0.6423	Intergenic variant	-
rs161618576	39638962	21	0.6420	Downstream gene variant	-
rs424142667	35511899	6	0.6415	Missense variant	<i>GPRIN3</i>
rs410592527	35184703	6	0.6228	Intergenic variant	-
rs408222545	39642723	21	0.6204	Upstream gene variant	-
rs419203432	29415140	10	0.6173	Intron variant	<i>LOC101110773</i>
rs161618641	39646260	21	0.5915	Upstream gene variant	-
rs416558978	35254368	6	0.5873	Intergenic variant	-
rs417392501	39651749	21	0.5832	Downstream gene variant	-
rs404318469	42719476	21	0.5826	Intron variant	<i>CAPN1</i>
rs403363266	39653383	21	0.5657	3 prime UTR variant	<i>FADS1</i>
rs419203432	29415140	10	0.5595	Intron variant	<i>LOC101110773</i>
rs403382566	35512106	6	0.5508	Missense variant	<i>GPRIN3</i>
rs421709693	39432569	21	0.5434	Intergenic variant	<i>SYT7</i>
rs427110197	39654860	21	0.5384	Intron variant	<i>FADS1</i>
rs398157763	29455959	10	0.5363	3 prime UTR variant	<i>LOC101110773</i>
rs399480023	31217615	6	0.5249	Intron variant	<i>GRID2</i>
rs399060511	35275766	6	0.5247	Intergenic variant	-
rs406335698	35276244	6	0.5219	Intergenic variant	-

rs = snp reference; bp = base pairs, position of the SNP in the reference genome (versión oar_v3.1); CHR = chromosome; % Var = percentage of the genetic variance; (-) = no candidate gene was detected for the SNP position

Table 2: Genes located in the regions of the genome defined by windows of 0.5 mbp and that explain a genetic variance $\geq 0.5\%$, chromosome and its position

Chromosome	Start	End	Genes
6	35,138,403	35,512,106	<i>GRID2, GPRIN3</i>
10	29,030,595	29,455,959	<i>LOC101110773, LOC101110521</i>
21	39,432,569	42,419,476	<i>PYGM, SYVN1, CAPN1, FADS1, SYT7</i>

3.3. ENRICHMENT ANALYSIS

The association study evaluated 38,268 SNP contained in the GGP_50k_ovi panel. For the enrichment analysis, 2,185 SNP were considered (5 % SNP greatest effect). This set of SNP defined a set of 908 genes in the sheep reference genome. The enriched p-value of each biological term indicated the importance of the term with respect to the set of genes analyzed (Table 3, Figure 2). Several significant metabolic pathways ($p\text{-value} \leq 0.05$) were identified and grouped into four categories: signaling, metabolism, steroidogenesis, and others (Table 3).

Table 3: Pathways detected in DAVID from the list of capture genes with the 5 % of SNP with the greatest effect and their classification into 4 classes associated with the p-value of enrichment

Pathways	P-valor
Signaling	
Phosphatidylinositol signaling system	0.0042
Adherens junction	0.0094
Phosphatidylinositol 3-OH kinase signaling pathway	0.0240
Pathways in cancer	0.0310
Axon guidance	0.0370
Calcium signaling pathway	0.0480
Metabolism	
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparin sulfate/heparin	0.0070
ECM - receptor interaction	0.0270
Metabolic pathway	0.0340
Steroidogenesis	
Ovarian steroidogenesis	0.0170
Others	
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	0.0370

The gene ontology of functional enrichment is shown in Figure 3. There are several terms linked to the regulation of ATP, calcium, cell activity, locomotion and behavior, lipid and carbohydrate metabolism, modulation of synaptic transmission, GTPase activity, among others.

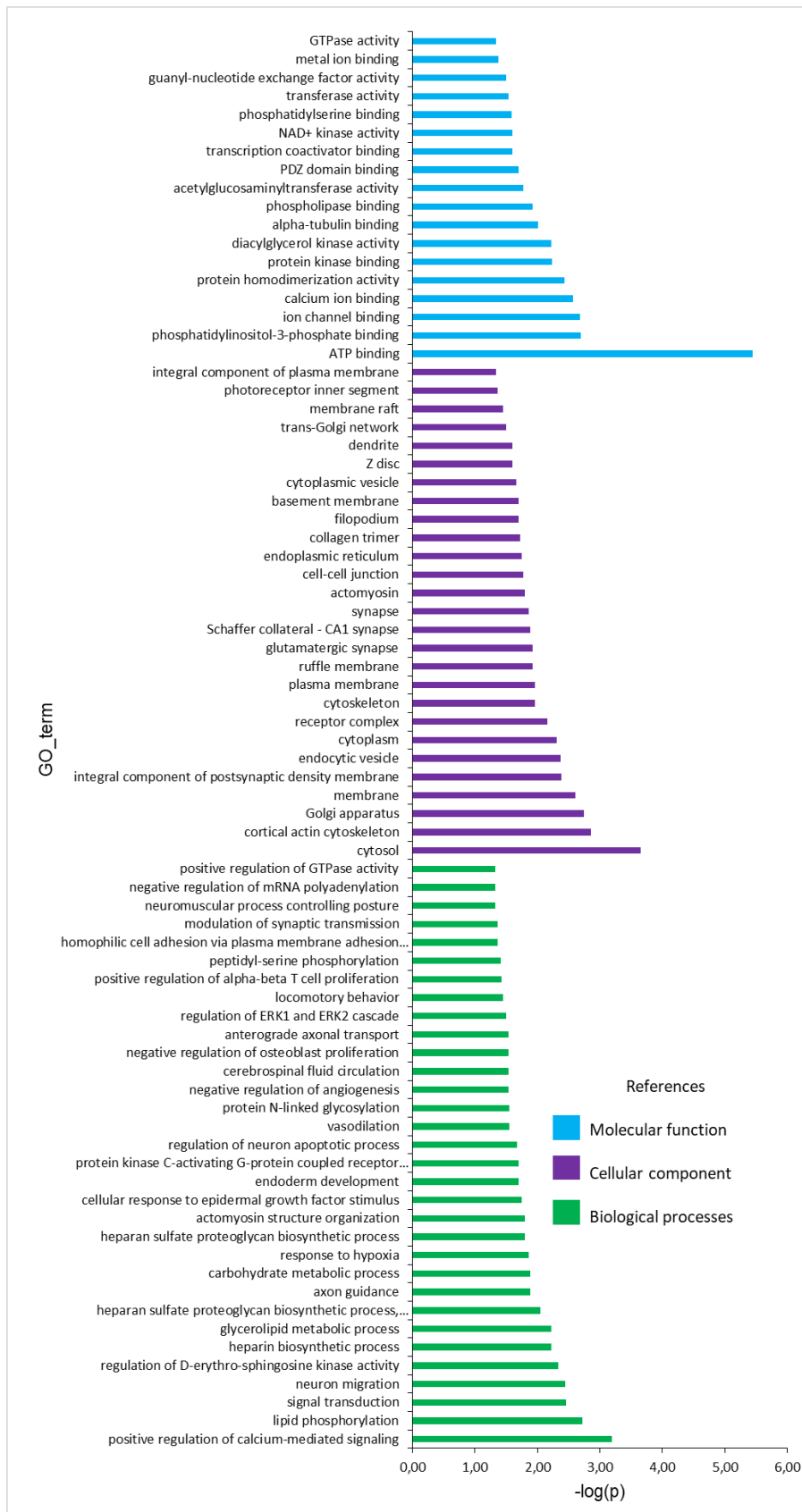


Figure 2: Gene ontology categories represented by molecular functions (light blue color), cellular component (purple color) and biological processes (green color), for the set of positional candidate genes with the 5 % of SNP with the greatest effect in function del $-\log$ of the enriched p-value

4) DISCUSSION

The present study helps to know the genetic basis of temperament in sheep, especially in the search for polymorphisms associated with this phenotypic trait. The hypothesis that there are SNP polymorphisms associated to temperament trait was confirmed. The genetic variance of the SNP showed that there are regions of the genome of sheep associated with greater variability and that temperament is not regulated by the effect of a major gene, but rather is a multigenic characteristic. So, several genomic regions with small effects are implicated in the temperament trait. These results were considered valuable and relevant due to the following: 1) we worked with a population of animals that were not previously selected for temperament, 2) we utilized a molecular panel and information that provided data reported by groups of Australian, European and American researchers (GGP_50k_ovi), and 3) the size of the sample of animals genotyped and in genealogy was consistent with the methodology used. Therefore, the source of information to carry out the association study is reliable, robust, and considers the structure of the population by including the genotyping and genealogy matrices.

The estimated heritability of temperament was 0.19 ± 0.038 , it is a moderate h^2 according to the classification criteria of Cardellino and Rovira (1989). This value of h^2 shows that it would be feasible to include the temperament trait in a selection program. In another sheep study considering a subpopulation of the phenotypic data used in the present study, the h^2 was 0.31 ± 0.06 (two generations, $n = 2952$ animals) (Zambra et al. 2015). The difference in the estimated value of h^2 may be due to an increase in the population and the inclusion of genomic information from the animals, which translates into higher precision. Despite the fact that temperament is not economically valued, several studies confirm its incidence in productive characters (Voisinet et al. 1997; Wulf et al. 2002; Sart et al. 2004; Bickell et al. 2010; Van Lier et al. 2017). As part of the results of this study, nine positional candidate genes, functional gene sets, biological processes, and gene

signaling pathways underlying temperament in the Australian Merino sheep were detected, several of which have not been previously reported.

Therefore, this thesis contributes to the knowledge of the SNP polymorphism associated with temperament in sheep and opens new exploration windows for future work.

Several genomic regions explaining more than 0.5 % of the additive genetic variance were identified. Genes that could be related to temperament trait according to their functions were highlighted below.

4.1. CHROMOSOME 21 AND CANDIDATE GENES

On chromosome 21, the region of interest with more than 0.5 % of the genetic variance is between base pairs 39,432,569 and 42,719,476. The variant rs402505013 (21:42,295,749) determined the greatest genetic variance (1.4691 %). Five candidate genes were detected. The *PYMG* gene (21:42,295,599-42,307,126) encodes the enzyme muscle glycogen phosphorylase, an allosteric enzyme with glycogen-catalysing activity that plays a central role in maintaining cellular and body glucose homeostasis (Tan et al. 1997). The deficiency of this enzyme has been reported in humans and sheep as the cause of symptoms of intolerance to exercise, since less glucose would be available for muscle contraction. The consequence of having less energy available for the organism negatively affects the stress response, where the main objective of the physiological changes is to increase the availability of energy for the “fight or flight” response to the stressor (Sapolsky et al. 2000; Damián et al. 2015). In this way, it could be said that animals with differences in this enzyme could respond differently to stress, and perhaps not being able to overcome the challenge.

The three variants, rs413708295 (21:42,714,381), rs421553713 (21:42,714,613) and rs161627624 (21:42,715,850), identified the *CAPN1* gene (21:42,712,976-42,740,799). This gene is associated with proteolytic proteins directly linked to the tenderness of meat, since the activity of calpain

and calpastatin is very important in the process of transforming muscle into meat (Speck et al. 1993). The differential gene expression of *CAPN1* among animals of different temperaments may be directly involved a lower meat quality for the more reactive animals. The rs161627521 (21:42,654,067) variant identified the *SYVN1* gene (21:42,650,559-42,655,527), a gene that codes for the W5PTU3 protein (RING-type E3 ubiquitin transferase) with catalytic activity, linked to the ubiquitination and protein modification pathways, which is part of protein modification (The UniProt Consortium 2021). Another gene identified by two markers rs403363266 (21:39,653,383) and rs427110197 (21:39,654,860), was the *FADS1* gene (21:39,652,537-39,665,108), associated with the W5PWA9 protein in sheep (The UniProt Consortium 2021). This protein is part of lipid metabolism, of the polyunsaturated fatty acid (PUFA) biosynthesis pathway (The UniProt Consortium 2021), specifically it is a control point in the rate of desaturation and elongation to generate long-chain PUFA (Athinarayanan et al. 2020). The last candidate gene *SYT7* (21:39,390,965-39,426,334) was associated with the variant rs421709693 (21:39,432,569). The molecular functions and biological processes linked to this gene are associated with calcium (e.g. regulation, dependent activation for the fusion of synaptic vesicles, exocytosis of neurotransmitters, repair of the plasmatic membrane, regulation of dopamine secretion, glucagon secretion, secretion of insulin, among others) (The UniProt Consortium 2021). On the other hand, there are genes in the literature that were associated with behavioral traits and that are also found within or near the genomic region of interest on chromosome 21. This is the case of the *CHRM1* gene (21:37.9-48.4 Mb), muscarinic cholinergic receptor, which would be linked to locomotion, cognition and the nervous system (Tanda et al. 2007). Therefore, the SNP of chromosome 21 found in the present study could be used as molecular markers for future studies focused on candidate genes associated with temperament or behavioral traits that affect reactivity and that are associated with meat quality.

4.2. CHROMOSOME 10 AND CANDIDATE GENES

The region of interest on chromosome 10 is between base pairs 29,030,595 and 29,455,959. The variants rs408317317 (10:29,353,089), rs422288687 (10:29,304,176), rs400430030 (10:29,421,760), rs419203432 (10:29,415,140) y rs398157763 (10: 29,455,959) identified the gene *LOC101110773 (EEF1A1)* (10:29,275,771-29,457,586), linked to molecular functions of energetic activity. Specifically, the encoded protein W5PD15 (elongation factor alpha 1) promotes GTP-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A-site of ribosomes during protein biosynthesis (The UniProt Consortium 2021). Another gene detected on chromosome 10 was the *LOC101110521* (10:28,986,741-29,188,660) and the five associated markers were rs427220269 (10:29054709), rs421383362 (10:29,188,403), rs4098299992 (10:29,162,222) and rs419116702 (10:29,030,595). This gene on the Ensembl platform is described as the *FRY* gene. A phenotypic study in Merino and Merino derived sheep reported this gene as one of the major signals in the genome linked to the phenotypic traits of wool (Megdiche et al. 2019). In this same study, the *EEF1A1* gene (*LOC101110773*) is also described as part of a set of genes of biological interest that contributes to elucidating the genetic basis of the Merino phenotype. Half of the SNP of chromosome 10 that contribute to the genetic variance of temperament were associated with molecular functions of energetic activity. This is consistent with aspects of reactivity such as physiological response to stress, where the animal recognizes the threat to homeostasis and biological responses are activated to restore normal homeostasis function and welfare (Moberg 2000).

4.3. CHROMOSOME 6 AND CANDIDATE GENES

On chromosome 6, the region of interest with more than 0.5 % of the genetic variance is between base pairs 35,138,403 and 35,512,106. In this region, the *GPRIN* candidate gene of subfamily number 3 (*GPRIN3*) (6:35,511,293-35,513,635) associated with the variants rs111759303 (6:35,511,497), rs424142667 (6:35,511,899) and rs403382565 (6:35,511,899) was identified.

This gene is highly expressed in the adrenal gland and codes for the W5NQE9 protein, but actually there is not a lot of information about it. However, it is a relevant finding given that the adrenal gland is involved in the stress response (SAM and HPA axes, Moberg 2000; Sapolsky et al. 2000; Selye 1939; Sapolsky et al. 2000) and there are differences in the frequency of polymorphism according to the type of temperament (Qiu et al. 2016). The A/A genotype of the SNP628 type polymorphism of the CYP17 gene specifically involved in cortisol production was more frequent in sheep of the nervous line, while the G/G genotype was in sheep of the calm line (Qiu et al. 2016).

The other candidate gene on chromosome 6 is GRID2 (6:30,768,380-31,534,647) associated with two markers, rs399480023 (6:31,217,615) and rs422603241 (6:31,453,177). This gene codes for the W5QA32 protein (glutamate receptor), which is related to biological processes linked to the regulation of synaptic transmission (The UniProt Consortium 2021). Particularly, the glutamate receptor functions as an ion channel in the central nervous system and plays a very important role in transmission excitation (The UniProt Consortium 2021). The GLU is an essential amino acid and is the most abundant neurotransmitter in the brain, also involved in the regulation of behavioral, social, learning, memory, sensory and cognitive processes (Giménez et al. 2018). The GLU is described as one of the neurostimulatory amino acids of reproduction that favors the pulsatile secretion of GnRH and LH (Mahesh and Bran 2005), and regulates sexual behavior through dopamine, due to its action on hypothalamic GnRH neurons (Iremonger et al. 2010). Recent research in sheep demonstrated that the inclusion of specific amino acids in the diet, such as arginine, glutamine, leucine and glycine, has beneficial effects on embryonic and fetal survival and growth (Wu 2010; Saevre et al. 2011; Crane et al. 2016). Therefore, the SNPs detected on chromosome 6 identified two relevant genes, one that is expressed in the axis linked to the stress response (HHA axis, *GPRIN3* gene) and another that is expressed centrally (*GRID2* gene). Temperament

is key in both scenarios, since greater reactivity negatively affects the functioning of the reproductive endocrine axis (Dobson and Smith 2000; Damián et al. 2015).

4.4. FUNCTIONAL ENRICHMENT ANALYSIS

Enrichment analysis revealed several functional pathways and biological processes associated with the temperament trait. The gene-set is associated with a set of annotation terms. If the genes share a similar set of those terms, they are involved in similar biological mechanisms. The DAVID platform provides an algorithm that adopts kappa statistics, which enables the quantitative measurement of the degree of agreement of genes that share similar annotation terms. The Kappa result ranges from zero to one (higher value, higher agreement). In the calcium signaling pathway (p-val = 0.048), several genes were grouped, but three are the most important: *HTR5A* gene, serotonin receptor; *DRD1* gene, dopamine receptor and *GRM1* gene, glutamate receptor 1. A closer exploration of calcium signaling was associated the following annotation terms: cardiac muscle contraction (kappa = 0.42); oxytocin signaling (kappa = 0.41); glutamate synapse (kappa = 0.35) and dopamine synapse (kappa = 0.31). The neurotransmitters dopamine and serotonin are involved in the stress response in a variety of species, through the activation of their different receptors (Reif and Lesch 2003; Noblett and Coccaro 2005). The GLU is a neurotransmitter involved in reproduction due to its favorable action on hypothalamic neurons for the secretion of GnRH (Iremonger et al. 2010), in addition to being involved in social, sensitive and cognitive processes (Giménez et al. 2018). Oxytocin is an important regulator of social behaviors (Damián et al. 2021) such as maternal behavior (Meyer-Lindenberg et al. 2011) and recognition in humans (Kumsta and Heinrichs 2013), polymorphism in the oxytocin receptor gene were associated with temperament, reactivity to stressors, and aggressive behaviors (Malik et al. 2012; Tost et al. 2010; Rodríguez et al. 2009). Therefore, the gene-set revealed that the enriched calcium signaling pathway is closely related to

temperament because it involves many aspects of this trait and its physiological effects, as has been shown previously in reproductive aspects (Bickell et al. 2010; Van Lier et al. 2017).

In the metabolic pathway of steroidogenesis in the ovary (p-val = 0.0170), five genes were identified: *CYP2J* gene (cytochrome P450); follicle stimulating hormone receptor (*FSHR*) gene; gene for the enzyme hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase (*HSD17B2*) and two genes associated with prostaglandin synthesis (*PGFS*, *PTGS2*). These genes linked to reproduction reaffirm the association of temperament with reproductive characteristics and its effect on the reproductive endocrine axis: hypothalamic-pituitary-gonadal (HHG) (Dobson and Smith 2000; Von Borell et al. 2007; Damián et al. 2015; Narayan and Parisella 2017).

In the metabolic pathways, arrhythmogenic cardiomyopathy in the right ventricular (p-val = 0.037) the *ACTN2* gene was found. This gene codes for the protein actinin alpha 2, reported for humans, which is expressed in both skeletal muscles and heart and its function in the anchoring of thin myofibrillar actin filaments (Beggs et al. 1992; Murphy and Young 2015; Ribeiro et al. 2014). A variant in the regulatory region of this gene that leads to heart failure has recently been found (Arvanitis et al. 2020). However, its association with the temperament trait in sheep has not yet been reported.

One of the enriched biological processes considered the term positive regulation of calcium-mediated signaling (GO:0050850, p-val = 0.001), where the FSH receptor gene and others (*CD24*, *CDH13*, *SYK*, *LOC101112639*) were observed. The term locomotory behavior (GO:0007626, p-value = 0.036) considers the specific movement of an animal from one place to another in response to external or internal stimuli and/or a combination of the internal state and external conditions of that animal. A subset of this GO_term is directly linked to the behavior term (GO:0007610), described as an animal's responses to internal or external stimuli (actions or inactions) through a mechanism that involves the activity of

the nervous system. Another GO_term regulation of ERK1 and ERK2 cascade (GO:0070372, p-val = 0.032) participates in various biological responses. This term is associated with several processes that modulate the frequency, rate, or extent of signal transduction mediated by the ERK1 and ERK2 (Extracellular Signal Regulated Kinase) cascade. This signaling cascade is a pathway formed by mitogen-activated protein kinases that regulates a wide variety of processes, as diverse as proliferation, differentiation, survival and stress (Herrero 2012). The GO_term linked to carbohydrate metabolic processes (GO:0005975, p-val = 0.013) is also revealed by the association that presents the availability of energy to face a stressor, specifically the physiological responses to stress that include an increase in metabolic rate and energy, as well as an increase in lipid catabolism and protein degradation. These physiological changes in the animal help to maintain the availability of energy and oxygen immediately (Sapolsky et al. 2000; Damián et al. 2015), and is the basis of the “fight or flight” response, first autonomous response of the individual to face the stressor or to escape from it (Cannon 1914).

5) CONCLUSIONS

The present study allowed to know SNP associated with the temperament trait in sheep. These SNP were not previously reported, which opens an exploration window for future work, not only linked to temperament but also to different metabolic pathways that could have an impact on aspects of production and welfare.

The genetic variance of the SNP revealed that there are regions of the genome associated with greater variability and that temperament is not regulated by the effect of a major gene, but rather is a multigenic characteristic. Nine genes were detected in the genomic regions on the chromosome 6, 10 and 21 (genes: *GRID2*, *GPRIN3*, *LOC101110773*, *LOC101110521*, *PYGM*, *SYVM1*, *CAPN1*, *FADS1*, *SYT7*), linked to the energetic activity of the organism, synaptic transmission, meat tenderness and activity of calcium. The identification of these genes, metabolic pathways and their respective functions should contribute to a better understanding of the genetic mechanisms that regulate the temperament trait in sheep.

The functional enrichment analysis allowed to identify gene functions and complement the results of the association study. The 5 % of the SNP with the greatest effect determined a set of 900 genes linked to various metabolic pathways, where the gene ontology analysis shows that there are several processes linked to the regulation of ATP, calcium, cell activity, locomotion and behavior, lipid and carbohydrate metabolism, modulation of synaptic transmission, among others. Several of these metabolic pathways are of interest for the temperament trait and lead to the need for further exploration.

6) REFERENCES

- Aguilar I, Misztal I, Johnson DL, Legarra A, Tsuruta S, Lawlor TJ (2010) Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. *J Dairy Sci.* 93(2), 743–752. doi: 10.3168/jds.2009-2730.
- Aguilar I, Misztal I, Tsuruta S, Legarra A, Wang H, Legarra A (2020) PREGSF90 – POSTGSF90: Computational Tools for the Implementation of Single-step Genomic Selection and Genome-wide Association with Ungenotyped Individuals in BLUPF90 Programs. 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP), Aug 2014, Vancouver, Canadá. American Society of Animal Science. Proceedings. <https://hal.inrae.fr/hal-02743809>
- Arvanitis M, Tampakakis E, Zhang Y (2020) Genome-wide association and multi-omic analyses reveal ACTN2 as a gene linked to heart failure. *Nat Commun.* 11: 1122. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14843-7>
- Beggs AH, Byers TJ, Knoll JH, Boyce FM, Bruns GA, Kunkel LM (1992) Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *JBC.* 267(13), 9281–9288.
- Bickell S, Durmic Z, Blache D, Vercoe PE, Martin GB (2010) Rethinking the management of health and reproduction in small ruminants. Updates on Ruminant Production and Medicine. 26th World Buiatrics Congress. Proceedings. 14–17 November 2010, Santiago, Chile.
- Blache D, Ferguson D (2005a) Genetic Estimates for Temperament traits in sheep Breeds. Rep. 364. 19 p.
- Blache D, Ferguson D (2005b) Increasing sheep meat production efficiency and animal welfare by selection for temperament meat. *MLA.* 364: 1-22
- Blache D, Bickell SL (2010) Temperament and reproductive biology: emotional reactivity and reproduction in sheep. *Rev Bras Zoo.* (39):

401-408.

Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene*. 234: 177–186. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00219-X.

Brunes LC, Baldi F, Lopes FB, Lôbo RB, Espigolan R, Costa MF, Stafuzza N, Magnabosco CU (2020) Weighted single-step genome-wide association study and pathway analyses for feed efficiency traits in Nellore cattle. *J Anim Bree Genet*. 138(1), 23–44. doi:10.1111/jbg.12496

Cannon WB (1914) The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *Am J Physiol*. 33(2), 356-372. Cardellino R, Rovira J. 1989. Mejoramiento genético animal. Montevideo: Hemisferio Sur. 253.

Christensen O, Lund M (2010) Genomic relationship matrix when some animals are not genotyped. *Genet Sel Evol*. 42(2), 1–8.

Clarke AS, Boinski S (1995) Temperament in nonhuman primates are not genotyped. *Am J Primatol*. 37(2), 103-25. doi:10.1002/aip.1350370205

Crane AR, Redden RR, Van Emon ML, Neville TL, Reynolds LP, Caton JS, Schauer CS (2016) Impacts of supplemental arginine on the reproductive performance of fall lambing ewes. *J Anim Sci*. 94: 3540-3549. ISSN: 1525-3163. doi: 10.2527/jas.2016-0379

Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Ridwan M, Armean I, Irimoloye OA, Azov AG, Barnes I, Bennett R, Berry A, Bhai J, Bignell A, Billis K, Boddu S, Brooks L, Charkhchi M, Cummins C, Da Rin Fioretto L, Davidson C, Dodiya K, Donaldson S, El Houdaigui S, El Naboulsi T, Reham F, Garcia Giron C, Genez T, Gonzalez J, Guijarro-Clarke C, Gymer A, Hardy M, Hollis Z, Hourlier T, Hunt T, Juettemann T, Kaikala V, Kay M, Lavidas I, Le T, Lemos D, Marugán JC, Mohanan S, Mushtaq A, Naven M, Ogeh D, Parker A, Parton A, Perry M, Piližota I, Prosovetskaia I, Sakthivel MP, Abdul Salam AI, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Pérez-Silva JG, Stark W, Steed E,

Sutinen K, Sukumaran R, Sumathipala D, Suner MM, Szpak M, Thormann A, Tricomi FF, Urbina-Gómez D, Veidenberg A, Walsh TA, Walts B, Willhott N, Winterbottom A, Wass E, Chakiachvili M, Flint B, Frankish A, Giorgetti S, Haggerty L, Hunt SE, Ilsley GR, Loveland JE, Martin FJ, Moore B, Mudge JM, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Tate J, Thybert D, Trevanion SJ, Dyer S, Harrison PW, Howe KL, Yates AD, Zerbino DR, Flicek P. Ensembl (2022) *Nucleic Acids Research*. 50, Issue D1, 7 January 2022, Pages D988–D995.
doi:10.1093/nar/gkab1049

Clarke AS, Boinski S (1995) Temperament in nonhuman primates. *Am J Primatol.* 37(2), 103–125. doi:10.1002/ajp.1350370205

Damián JP, Bausero M, Bielli A (2015) Acute stress, hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis and testicular function-a review. *Ann Anim Sci.* 15(1): 31–50. doi:10.2478/aoas-2014-0084

Damián JP, De Soto L, Espindola D, Gil J, Van Lier E (2021) Intranasal oxytocin affects the stress response to social isolation in sheep. *Physiol & Behav.* 230: 8. doi:10.1016/j.physbeh.2020.113282

Del Campo M (2011) El bienestar animal en nuestros sistemas de producción, enfoque de la investigación a nivel nacional. In: INIA Tacuarembó. Unidad Experimental Glencoe. Día de campo, setiembre 2011, Paysandú, Uruguay. Propuestas tecnológicas para el incremento de la productividad, la valorización y el ingreso económico para sistemas ganaderos de basalto. Tacuarembó (Uruguay): INIA, 2011. p. 59-60.

Dobson H, Smith RF (2000) What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Rep Sci.* 60–61, 743–752

Durinck S, Moreau Y, Kasprzyk A, Davis S, De Moor B, Brazma A, Huber W (2005) BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological

- databases and microarray data analysis. *J Leukocyte Biol.* 21(16): 3439-3440. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti525>
- Durinck S, Spellman P, Birney E, Huber W (2009) Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc.* 4: 1184-1191.
- Giménez C, Zafra F, Aragón C (2018) Fisiopatología de los transportadores de glutamato y de glicina: nuevas dianas terapéuticas. *Rev Neurol.* 67(12): 491-504. doi: 10.33588/rn.6712.2018067
- Haskell MJ, Simm G, Turner SP (2014) Genetic selection for temperament traits in dairy and beef cattle. *Front Genet.* 5: 1–18. doi:10.3389/fgene.2014.00368
- Hawken P, Williman M, Milton J, Kelly R, Nowak R, Blache D (2012) Nutritional supplementation during the last week of gestation increased the volume and reduced the viscosity of colostrum produced by twin bearing ewes selected for nervous temperament. *Small Rum Res.* 105(1–3): 308–314. doi: 10.1016/j.smallrumres.2012.01.011
- Herrero A (2012) Especificidad espacio-temporal de las señales Ras-ERK en la determinación de respuestas biológicas. Tesis Doc. Bioquímica. Cantabria, España. Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria.
- Iremonger KJ, Constantin S, Liu X, Herbison AE (2010) Glutamate regulation of GnRH neuron excitability. *Brain Res.* 1364: 35-43. doi:10.1016/j.brainres.2010.08.071
- Jara E, Peñagaricano F, Armstrong E, Ciappesoni G, Iriarte A, Navajas A (2022) Revealing the genetic basis of eyelid pigmentation in Hereford cattle. *J Anim Sci.* 100(5). doi:10.1093/jas/skac110
- Kumsta R, Heinrichs M (2013) Oxytocin, stress and social behavior: neurogenetics of the human oxytocin system. *Curr Opin Neurobiol.* 23:11–6. doi:<https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.09.004>

- Malik AI, Zai CC, Abu Z, Nowrouzi B, Beitchman JH (2012) The role of oxytocin and oxytocin receptor gene variants in childhood-onset aggression. *Genes Brain Behav.* 11:545–51. doi:10.1111/j.1601-183X.2012.00776.x.
- Mancin E (2020) Can single-step genome-wide association analysis (ssGWAA) account for population structure? *J Anim Sci.* 98(4): 9–10. doi:10.1093/jas/skaa278.018.
- Megdiche S, Mastrangelo S, Hamouda M, Lenstra J, Ciani E (2019) Merino and Merino-derived sheep breeds: a further look at genome-wide selection signatures for wool traits. *Front Genet.* 10. doi:10.3389/fgene.2019.01025.
- Meyer-Lindenberg A, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M (2011) Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nat Rev Neurosci.* 12:524–38. doi:10.1038/nrn3044.
- Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Tsuruta S, Lourenco DA, Fragomeni B, Zhang X, Muir WM, Cheng HH, Wing T, Hawken RR, Zumbach B, Fernando R (2020) GWAS using ssGBLUP I. 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production GWAS, 5, 1–6. doi:10.1109/CGames.2013.6632596.
- Misztal I, Tsuruta S, Lourenco D, Masuda Y, Aguilar I, Legarra A, Vitezica Z (2018) Manual for BLUPF90 family of programs.
- Moberg GP (2000) Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg G.P and Mench J.A (editors). *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare.* CABI Publishing, pp. 1–22. Wallingford, Oxon, UK.
- Murphy AC, Young PW (2015) The actinin family of actin cross-linking proteins - a genetic perspective. *Cell Biosci.* 5(49). doi:10.1186/s13578-015-0029-7.

- Noblett KL, Coccaro EF (2005) Molecular genetics of personality. *Curr Psychiatry Rep.* 7(1): 73–80. doi:10.1007/s11920-005-0028-1.
- Qiu X, Ledger J, Zheng C, Martin GB, Blache D (2016) Associations between temperament and gene polymorphisms in the brain dopaminergic system and the adrenal gland of sheep. *Physiol & Behav.* 153: 19–27. doi:10.1016/j.physbeh.2015.10.022.
- Qiu X, Martin GB, Blache D (2017) Gene polymorphisms associated with temperament. *J Neurogenetics.* 31(1–2): 1–16. doi:10.1080/01677063.2017.1324857.
- Reif A, Lesch KP (2003) Toward a molecular architecture of personality. *Behav Brain Res.* 139(1-2): 1–20. doi: 10.1016/S0166-4328(02)00267-X.
- Ribeiro EA, Pinotsis N, Ghisleni A, Salmazo A, Konarev PV, Kostan J, Sjöblom B, Schreiner C, Polyansky AA, Gkougkoulia EA, Holt MR, Aachmann FL, Zagrović B, Bordignon E, Pirker KF, Svergun DI, Gautel M, Djinić-Carugo KB (2014) The structure and regulation of human muscle alpha-actinin. *Cell.* 159(6): 1447–1460. doi:10.1016/j.cell.2014.10.056.
- Rodríguez SM, Saslow LR, Garcia N, John OP, Keltner D (2009) Oxytocin receptor genetic variation relates to empathy and stress reactivity in humans. *PNAS.* 106(50): 21437–21441. doi:10.1073/pnas.0909579106.
- Saevre C, Meyer AM, Van Emon ML, Redmer DA, Caton JS, Kirsch JD, Luther JS, Schauer CS (2011) Impacts of arginine on ovarian function and reproductive performance at the time of maternal recognition of pregnancy in ewes. *Sheep Res Rep. North Dakota State University, Fargo.* 52: 13-16. [On line]. Consulting february 23, 2023. Available in: <https://pdfs.semanticscholar.org/c540/63c9f5742fd22198d92d5cf367aed3343f01.pdf>

- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 21(1): 55–89. doi:10.1210/er.21.1.55.
- Sart S, Bencini R, Blache D, Martin GB (2004) Calm Ewes Produce Milk With More Protein Than Nervous Ewes. *Anim Prod Aus.* 25: 307.
- Selye H (1939) The effect of adaptation to various damaging agents in the female sex organs in the rat. *Endocr.* 25(4): 615–624.
- Sigdel A, Bisinotto RS, Peñagaricano F (2021) Genes and pathways associated with pregnancy loss in dairy cattle. *Sci Rep.* 11: 13329. doi:10.1038/s41598-021-92525-0.
- Speck PA, Collingwood KM, Bardsley RG, Tucker GA, Gilmour RS, Buttery PJ (1993) Transient changes in growth and in calpain and calpastatin expression in ovine skeletal muscle after short-term dietary inclusion of cimaterol. *Biochim.* 75(10): 917-923. doi:10.1016/0300-9084(93)90049-x. PMID: 7906151.
- Stranden I, Garrick DJ (2009) Technical note: Derivation of equivalent computing algorithms for genomic predictions and reliabilities of animal merit. *J. Dairy Sci.* 92(6): 2971-2975. doi:10.3168/jds.2008-1929.
- Tanda G, Ebbs AL, Kopajtic TA, Elias LM, Campbell BL, Newman AH, Katz JL (2007) Effects of muscarinic M-1 receptor blockade on cocaine-induced elevations of brain dopamine levels and locomotor behavior in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 321(1): 334-344. doi:10.1124/jpet.106.118067.
- Tan P, Allen JG, Wilton SD, Akkari PA, Huxtable CR, Laing NG (1997) A splice-site mutation causing ovine McArdle's disease. *Neuromuscul Disord.* 7(5): 336-342. doi:10.1016/S0960-8966(97)00062-X.

- The UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, *Nucleic Acids Research*, Volume 49, Issue D1, 8 January 2021, Pages D480–D489. doi:10.1093/nar/gkaa1100
- Tost H, Kolachana B, Hakimi S, Lemaitre H, Verchinski BA, Mattay VS, Weinberger DR, Meyer-Lindenberg A (2010) A common allele in the oxytocin receptor gene (OXTR) impacts prosocial temperament and human hypothalamic-limbic structure and function. *Proc Natl Acad Sci*. 107:13936–13941. doi:10.1073/pnas.1003296107.
- Van Lier E, Hart KW, Viñoles C, Paganoni B, Blache D (2017) Calm Merino ewes have a higher ovulation rate and more multiple pregnancies than nervous ewes. *Anim*. 11(7): 1196–1202. doi:10.1017/S1751731117000106.
- VanRaden PM (2008) Efficient methods to compute genomic predictions. *J. Dairy Sci*. 91(11): 4414–4423. doi:10.3168/jds.2007-0980.
- Veissier I, Boissy A, Désiré L, Greiveldinger L (2009) Animals emotions: studies in sheep using appraisal theories. *Anim Welfare*. 18(4): 347–54. doi:10.1017/S0962728600000749.
- Voisinet BD, Grandin T, Tatum JD, O'Connor SF, Struthers JJ (1997) Feedlot Cattle with Calm Temperaments Have Higher Average Daily Gains Than Cattle with Excitable Temperaments. *J Anim Sci*. 75(4): 892–896. doi: 10.2527/1997.754892x.
- Von Borell E, Dobson H, Prunier A (2007) Stress, behaviour and reproductive performance in female cattle and pigs. *Horm Behav*. 52(1): 130–138. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.03.014
- Wang H, Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Muir WM (2012) Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. *Genet Res*. 94(2): 73-83. doi:10.1017/S0016672312000274.
- Wang H, Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Fernando RL, Vitezica Z, Okimoto R, Wing T, Hawken R, Muir WM (2014) Genome-wide association

mapping including phenotypes from relatives without genotypes in a single-step (ssGWAS) for 6-week body weight in broiler chickens. *Front Genet.* 5: 1-10. doi:10.3389/fgene.2014.00134.

Wulf DM, Emnett RS, Leheska JM, Moeller SJ (2002) Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palatability. *J Anim Sci.* 80(7): 1895-1903.
doi:10.2527/2002.8071895x.

Wu G (2010) Functional amino acids in growth, reproduction, and health. American Society for Nutrition. *Adv Nutr.* 1(1): 31-37.
doi:org/10.3945/an.110.1008.

Zambra N, Gimeno D, Blache D, Van Lier E (2015) Temperament and its heritability in Corriedale and Merino lambs. *Anim.* 9(3): 373–379.
doi:10.1017/S1751731114002833.